



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

(21) BR 112020017253-7 A2



(22) Data do Depósito: 22/02/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 22/12/2020

(54) **Título:** LIGANTES PARA GM-CSF OU RECEPTOR GM-CSF PARA USO NO TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA EM UM PACIENTE SUBMETIDO A ALO-HCT

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/24; A61P 37/06.

(30) **Prioridade Unionista:** 07/02/2019 US 16269572; 14/09/2018 EP 18194549.4; 17/08/2018 EP 18189562.4; 22/02/2018 EP 18158169.5.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSITÄT ZÜRICH.

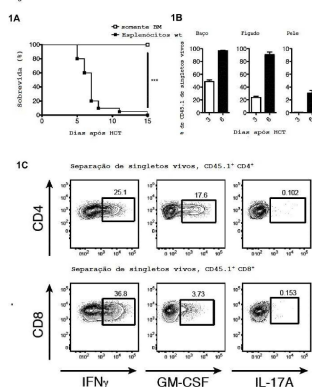
(72) **Inventor(es):** SONIA TUGUES; BURKHARD BECHER.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2019054493 de 22/02/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/162472 de 29/08/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 24/08/2020

(57) **Resumo:** É descrito nesse relatório descritivo o uso de um ligante não agonista, particularmente um anticorpo, que se liga especificamente ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 para uso no tratamento de leucemia em um paciente submetido a alo-HCT ou no tratamento de outras complicações que surgem como consequência de transplante de célula hematopoiética de um doador imunologicamente não idêntico.



LIGANTES PARA GM-CSF OU RECEPTOR GM-CSF PARA USO NO
TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA EM UM PACIENTE
SUBMETIDO A ALO-HCT

Referência cruzada com pedidos relacionados

[0001]É reivindicado benefício para os Pedidos de Patente Europeia N^{os} EP18158169.5, depositado em 22 de fevereiro de 2018; EP18189562.4, depositado em 17 de agosto de 2018; EP18194549.4, depositado em 14 de setembro de 2018 e US16/269.572. O conteúdo dos pedidos de patente é incorporado por referência nesse relatório descritivo em sua totalidade.

Campo

[0002]A presente invenção está relacionada a um ligante não agonista, particularmente um anticorpo, que se liga especificamente ao GM-CSF (CSF-2) ou seu complexo receptor que consiste no CSF2R β (CD131) e CSF2R α (CD116), para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT.

Fundamentos

[0003]Para pacientes que sofrem de malignidades hematológicas, o transplante alogênico de célula hematopoiética (alo-HCT) é uma intervenção potencialmente curativa e poupadora de vidas; no entanto, entre 40 e 60% de todos os pacientes desenvolverão doença enxerto-versus-hospedeiro aguda ou crônica clinicamente significativa (GvHD) que, juntas, carregam uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50%. Células T derivadas de doadores medeiam ambos os processos: células T alo-reativas do enxerto atacam células malignas do hospedeiro, produzindo o efeito benéfico enxerto-versus-leucemia (GvL); embora essa mesma alo-

reatividade possa ser direcionada para tecidos saudáveis (tipicamente para a pele, intestino e fígado), levando ao GvHD. Embora a depleção de células T do material do doador antes do alo-HCT possa evitar/reduzir GvHD, consequentemente isso se faz às custas de atividade de enxerto-versus-leucemia (GvL) diminuída e taxas de recidiva aumentadas. Portanto, há uma necessidade urgente para compreender como os mecanismos de GvL e GvHD podem ser separados no nível de célula T, e modulados para benefício clínico.

[0004]Muitos trabalhos tentaram definir subconjuntos de células T e citocinas cruciais que sustentam GvHD em modelos murídeos, mas até hoje poucas conclusões consistentes foram obtidas. Embora GvHD fosse originalmente proposta como sendo uma patologia mediada por T_H1 , estudos em camundongos mostraram que células T do doador deficientes na citocina T_H1 $IFN\gamma$ podem exacerbar a doença. Células T_H2 podem tanto suprimir GvHD experimental, quanto induzir GvHD que afeta o fígado e pele. Similarmente, enquanto há evidências de que as células T produtoras de IL-17A sejam mediadores proeminentes de dano tecidual em doenças inflamatórias em geral, seu papel na GvHD permanece controverso, na medida em que, em modelos murídeos, IL-17 parece capaz de promover ou melhorar GvHD, dependendo das condições experimentais. Tomadas em conjunto, células T_H polarizadas estão claramente implicadas na emergência e perpetuação de GvHD, mas até agora não foi possível identificar qualquer mediador solúvel específico que possua uma função reprodutível e não redundante na patogênese da doença tanto em modelos murídeos quanto em humanos.

[0005]Como base no acima estado da arte mencionado, o

objetivo da presente invenção é fornecer meios e métodos para atenuar GvHD mantendo, ao mesmo tempo, o efeito GvL benéfico. Esse objetivo é obtido pelo tema das reivindicações independentes do presente relatório descritivo.

Sumário da invenção

[0006]Um primeiro aspecto da invenção está relacionado a um método de tratamento de um paciente que sofre de doença enxerto-versus-hospedeiro, ou um método de prevenção, inibição ou redução da severidade da ocorrência de doença enxerto-versus-hospedeiro, em um paciente que recebeu um transplante alogênico.

[0007]Um segundo aspecto da invenção está relacionado ao método de tratamento de um paciente que sofre de um câncer, particularmente uma malignidade hematológica, e que foi submetido à transferência de célula-tronco hematopoiética alogênica (alo-HCT).

[0008]Os métodos de acordo com qualquer aspecto da invenção compreendem a interferência com a sinalização da citocina imune GM-CSF que desencadeia GvHD. Isso pode ser obtido por inibição de GM-CSF por ligantes, particularmente anticorpos, mais particularmente anticorpos neutralizantes. O objetivo da invenção também pode ser obtido por interferência com ligação de GM-CSF ao seu receptor natural, ou por inibição da cascata de sinalização por administração de ligantes não agonistas a esses receptores, particularmente por administração de anticorpos neutralizantes ao receptor de GM-CSF. Outro mecanismo possível é suprimir, transitoriamente ou por uma duração mais longa, a expressão de um de GM-CSF ou seus receptores por interferência de ácido nucleico (RNAi, anti-senso).

[0009]Em modalidades particulares, a invenção compreende a administração ao paciente de um ligante não agonista, particularmente um anticorpo, mais particularmente um anticorpo neutralizante não agonista reativo ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131.

[0010]Esse aspecto pode, alternativamente, ser formulado como o fornecimento de um agente selecionado de:

- um ligante de polipeptídeo neutralizante, particularmente um anticorpo neutralizante reativo a um de GM-CSF, CD116, CD131 ou ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131, e

- um agente de ácido nucleico que inibe a expressão de GM-CSF, CD116, e/ou CD131 para uso no tratamento ou prevenção de GvHD em um paciente que sofre de uma malignidade hematológica.

Breve descrição das figuras

[0011]Figuras 1A-1H: Células T doadoras secretam GM-CSF e IFN γ durante respostas alogênicas.

[0012]Figura 1A: Sobrevida de camundongos BALB/c CD45.2⁺ letalmente irradiados após alo-HCT com TCD-BM de C57BL/6 WT CD45.1⁺ isoladamente ou combinado com CD45.1⁺ esplenócitos de C57BL/6 WT. Dados reunidos em *pool* de 4 experimentos individuais, cada um com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida, foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), *** p < 0,001. Figura 1B: Frequência de células CD45.1⁺ dentro de singletos vivos no baço, fígado e pele em 3 e 6 dias após alo-HCT. Dados reunidos em *pool* para obter n = 10/grupo. Figura 1C: Frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ que produzem IFN γ , GM-CSF e IL-17A dentro da população

de CD45.1⁺ de fígados de camundongos 3 dias após alo-HCT. São mostrados gráficos representativos de um total de 3 experimentos independentes. Figura 1D: Frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ que produzem IFN γ , GM-CSF e IL-17A dentro das populações de CD45.1⁺ do fígado, baço e pele 3 e 6 dias após alo-HCT. Dados reunidos em *pool* de 3 experimentos individuais, total n = 10/grupo. Figura 1E: Níveis séricos de IFN γ e GM-CSF em camundongos 6 dias após alo-HCT. Dados reunidos em *pool* de 3 experimentos individuais, n = 2-5/grupo. Para comparação das médias, foi usado um teste-T não pareado bicaudado com correção de Welch, * p < 0,05, ** p < 0,01. Figura 1F: IFN γ , GM-CSF e IL-17A em sobrenadantes de coculturas de células T de camundongos C57BL/6 WT com DCs CD11c⁺ esplênicas singênicas (C57BL/6) ou alogênicas (BALB/c). Dados reunidos em *pool* de 3 experimentos individuais, n = 3-5/grupo. Para comparação das médias, foi usado um teste-T não pareado bicaudado com correção de Welch, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Figura 1G: incorporação de timidina tritiada por células T de camundongos C57BL/6 wt *Ifng*^{-/-} *Csf2*^{-/-} ou *Il17a*^{-/-} cocultivadas com DCs CD11c⁺ esplênicas singênicas (C57BL/6) ou alogênicas (BALB/c). Dados reunidos em *pool* de 3 experimentos individuais, n = 2-5/grupo. Para comparação das médias, foi usado ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os dados são exibidos como média +/- DP na Figura 1B e como média +/- SEM nas (Figuras 1D – 1G). Figura 1H: Frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN γ e GM-CSF dentro das populações de CD45.1⁺ do fígado e baço 3 e 6 dias após alo-HCT. Dados representativos reunidos em *pool* de 1 de 3 experimentos são mostrados, n = 3-4/grupo. Abreviações: TCD:

depletado de células T, BM: medula óssea, HCT: transferência de célula hematopoiética, WT: tipo selvagem, Cpm: contagens por minuto.

[0013]Figuras 2A-2K: GM-CSF é crucial para GvHD aguda após alo-HCT com MHC totalmente incompatível.

[0014]Figura 2A: Sobrevida de camundongos BALB/c letalmente irradiados após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT *Csf2*^{-/-}, *Ifng*^{-/-} ou *Il17a*^{-/-}. Dados reunidos em *pool* de 4 experimentos individuais, cada um com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (WT vs. outros grupos), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Figura 2B: Sobrevida de camundongos BALB/c letalmente irradiados após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com células T purificadas de baços de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}. Dados reunidos em *pool* de 3 experimentos individuais cada um com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (WT com *Csf2*^{-/-}), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), *** p < 0,001. Figura 2C: Pontuação histopatológica composta para fígado, intestino delgado e pele de camundongos BALB/c 6 dias após alo-HCT. Dados reunidos em *pool* de 3 experimentos individuais, n = 5/grupo. Para comparação das médias (WT vs. *Csf2*^{-/-}), foi usado um teste-T não pareado bicaudado, * p < 0,05. Figura 2D: Imagens representativas de cortes corados com hematoxilina e eosina de pele e intestino delgado de camundongos 6 dias após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}, n = 4-5/grupo (barra de escala: 100 µm). Figuras 2E-2F: Imagens

representativas de marcação p22phox em cortes de (Figura 2E) fígado e (Figura 2F) intestino delgado (barra de escala: 100 μm) de camundongos 6 dias após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}, n = 4-5/grupo (painéis superiores). Quantificação de % médio de área total marcada positivamente para p22phox por campo visual. Para comparação das médias (WT vs. *Csf2*^{-/-}), foi usado um teste-T não pareado bicaudado, ** p < 0,01. Figura 2G: Sobrevida de camundongos BALB/c letalmente irradiados após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT. Os camundongos foram tratados com PBS, anticorpo de controle de isótipo, ou anticorpo anti-GM-CSF 3 vezes/semana pela duração do experimento, começando 2 dias antes do HCT. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais, cada um com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (aGM-CSF vs. isótipo), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), *** p < 0,001. Os dados são exibidos como média +/- SEM. Figura 2H: Comprimento do cólon em cm de camundongos BALB/c 6 dias após alo-HCT, como descrito em a. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais. Figura 2I: Imagens representativas e quantificação de células apoptóticas (coloração TUNEL) no cólon de camundongos BALB/c 6 dias após alo-HCT, como descrito em a. Dados reunidos em *pool* de 3 experimentos individuais (barra de escala top 50 μm , inferior 20 μm). Figura 2J: Níveis de fosfatase alcalina (AP), alanina aminotransferase (ALT), nitrogênio ureico (BUN) e albumina no soro de camundongos BALB/c 6 dias após alo-HCT. Os dados são representativos de 2 experimentos individuais, com n =

3-5/grupo. Figura 2K: Sobrevida de camundongos BALB/c letalmente irradiados submetidos a alo-HCT com TCD-BM de C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com células T CD4 e CD8 purificadas de baços de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-} (CD4WTCD8WT, CD4WTCD8*Csf2*^{-/-}, CD4*Csf2*^{-/-}CD8WT e CD4*Csf2*^{-/-}CD8*Csf2*^{-/-}). Camundongos tratados com TCD-BM isoladamente foram usados como controles. Dados representativos de 2 experimentos individuais com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (CD4WTCD8WT vs. outros grupos), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), n.s. (não significante), ** p < 0,01. Abreviações: TCD: depletado de células T, BM: medula óssea, HCT: transferência de célula hematopoiética, WT: tipo selvagem.

[0015]Figuras 3A-3H: GM-CSF medeia a patologia da GvHD após alo-HCT com MHC parcialmente incompatível.

[0016]Figura 3A: Sobrevida de camundongos B6D2F1 letalmente irradiados após alo-HCT com MHC parcialmente incompatível com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT, *Csf2*^{-/-} ou *Ifng*^{-/-}. Dados reunidos em *pool* de 5 experimentos individuais, cada um com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (WT vs. outros grupos), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), * p < 0,05, *** p < 0,001. Figura 3B: Sobrevida de camundongos B6D2F1 letalmente irradiados após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com células T purificadas de baços de camundongos C57BL/6 WT, *Csf2*^{-/-} ou *Ifng*^{-/-}. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais, cada um com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (WT vs. outros grupos), foi usado um teste Log-

Rank (Mantel-Cox), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Figura 3C: Pontuação histopatológica composta para cortes de fígado, intestino delgado e pele de camundongos B6D2F1 em 11 dias pós-alo-HCT. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais, $n = 5/\text{grupo}$. Para comparação das médias (WT, *Csf2*^{-/-} e *Ifng*^{-/-}) foi usado ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$. Figura 3D: Imagens representativas de cortes corados com hematoxilina e eosina de pele de camundongos 11 dias após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT, *Ifng*^{-/-} ou *Csf2*^{-/-}, $n = 4-5/\text{grupo}$ (Barras de escala: 100 μm). Figuras 3E-3F: Imagens representativas de marcação com p22phox (painéis superiores) e F4/80 em cortes de (Figura 3E) fígado e (Figura 3F) intestino delgado (barra de escala: 100 μm) de camundongos 9 dias após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}, $n = 4-5/\text{grupo}$. Quantificação da área total marcada positivamente para p22phox ou F4/80 por campo visual. Para comparação das médias (WT vs. *Csf2*^{-/-}), foi usado um teste-T não pareado bicaudado, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. Figura 3G: Níveis séricos de IFN γ e GM-CSF em camundongos 9 dias após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT, *Ifng*^{-/-} ou *Csf2*^{-/-}. Dados reunidos em *pool* de 2-3 experimentos individuais, $n = 4-5/\text{grupo}$. Para comparação das médias (WT vs. *Ifng*^{-/-} ou WT vs. *Csf2*^{-/-}) foi usado um teste-T não pareado bicaudado com correção de Welch, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Os dados são exibidos como média $\pm$ SEM. Figura 3H: Pontuação histopatológica composta para cortes de fígado de

camundongos B6D2F1 em 9 ou 28 dias pós-alo-HCT, como descrito em a. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes, n = 4-6/grupo. Abreviações: TCD: depletado de células T, BM: medula óssea, HCT: transferência de célula hematopoiética, WT: tipo selvagem.

[0017]Figuras 4A-4H: GM-CSF é dispensável para atividade antitumoral após alo-HCT.

[0018]Figuras 4A-4D: Camundongos BALB/c irradiados letalmente foram injetados por via intravenosa com células tumorais A20 que expressam GFP e luciferase, ao mesmo tempo que alo-HCT com MHC incompatível com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com células T purificadas de baços de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}. Camundongos tratados com TCD-BM isoladamente foram usados como controles. (Figura 4A) O crescimento tumoral foi monitorado por imageamento bioluminescente *in vivo*. São mostradas imagens de um experimento representativo de um total de dois. (Figura 4B) Intensidade de sinal na região de interesse (ROI) foi monitorada ao longo do tempo. (Figura 4C) Sobrevida ao longo do tempo e (Figura 4D) causa de morte exibida como percentagem de camundongos em cada grupo de tratamento com GvHD letal (cinza), tumores (preto) ou sobreviventes (branco). Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (WT vs. outros grupos), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), n.s. (não significante), ** p < 0,01. (Figuras 4E-4H) Camundongos BALB/c irradiados letalmente foram injetados por via intravenosa com células tumorais A20 que expressam GFP e luciferase, ao mesmo tempo que alo-HCT com MHC incompatível com TCD-BM de camundongos

C57BL/6 WT isoladamente ou combinada com células T purificadas de baços de camundongos C57BL/6 WT. Camundongos tratados com TCD-BM isoladamente foram usados como controles. Os camundongos foram tratados com controle de isótipo, ou anticorpo anti-GM-CSF 3 vezes/semana pela duração do experimento, começando 2 dias antes do HCT. (Figura 4E) O crescimento tumoral foi monitorado por imageamento bioluminescente *in vivo*. São mostradas imagens de um experimento com $n = 6-7$ /grupo. (Figura 4F) Intensidade de sinal na região de interesse (ROI) foi monitorada ao longo do tempo. (Figura 4G) Sobrevida ao longo do tempo e (Figura 4H) causa de morte exibida como percentagem de camundongos em cada grupo de tratamento com GvHD letal (cinza), tumores (preto) ou sobreviventes (branco). Para comparação de curvas de sobrevida (WT vs. *Csf2*^{-/-}), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox), * $p < 0,05$. Dados exibidos como média $\pm$ SEM. Abreviações: TCD: depletado de células T, BM: medula óssea, HCT: transferência de célula hematopoiética, WT: tipo selvagem, BLI: imageamento bioluminescente, ROI: região de interesse.

[0019]Figuras 5A-5D: Pacientes com GvHD severa expressam níveis elevados de GM-CSF em biópsias intestinais.

[0020]Figura 5A: Expressão relativa de GM-CSF no nível de mRNA em biópsias gastrintestinais de pacientes com graus diferentes de GvHD; veja a Tabela 3. Para comparação das médias, foi usado ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni ** $p < 0,01$. Os dados são exibidos como média $\pm$ SEM. Figura 5B: Imagens de marcação de GM-CSF em biópsias de controle e de GvHD de grau IV do intestino delgado de pacientes de alo-HCT; veja as Tabelas 1 e 2. Marrom: anti-

GM-CSF humano, azul: Hematoxilina. Barras de escala são 100 μm (20 μm em imagens em zoom). São mostradas imagens representativas de 3 amostras individuais de controle e de pacientes. Figura 5C: coloração de imunofluorescência para CD3 (rosa), CD68 (verde) e GM-CSF (vermelho) de biópsias gastrintestinais de pacientes com GvHD de grau IV. É mostrada uma imagem representativa de 3 amostras de pacientes individuais. Os núcleos são retratados em azul (DAPI) (barra de escala superior 50 μm , inferior 20 μm). Figura 5D: Análise citométrica de fluxo de PBMCs coletadas de doadores saudáveis (HD) e pacientes com GvHD (GP), estimuladas por 4 h com PMA/ionomicina. É mostrado um gráfico de FACS representativo de células T que expressam citocinas. Células T CD4⁺ e CD8⁺ que produzem GM-CSF, IFN e IL-17 são apresentadas como frequências individuais. $n = 10-9/\text{grupo}$ * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Abreviações: TCD: depletado de células T, BM: medula óssea, HCT: transferência de célula hematopoiética.

[0021]Figuras 6A-6D: Análise fenotípica comparativa de populações de células T de camundongos WT e *Csf2*^{-/-}.

[0022]Análise citométrica de fluxo de frequências de população de células T esplênicas (Figura 6A), e (Figura 6B) frequências de expressão de marcador de ativação em C57BL/6 camundongos WT e *Csf2*^{-/-} *naïve*. Foi feito um *pool* de dados de 2 experimentos individuais cada um com $n = 3/\text{grupo}$. Figura 6C: Análise citométrica de fluxo de infiltrados de célula T do doador em linfonodos (LN), baço, fígado e pele do receptor, 2 e 5 dias após alo-HCT de camundongos BALB/c letalmente irradiados reconstituídos com TCD-BM de C57BL/6 WT combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}. As células foram separadas em H2-Db e CD45; células

T CD4 e CD8 foram pré-separadas em CD3. É mostrado um experimento com $n = 4$ /grupo. Os dados são exibidos como média $\pm$ SEM. Figura 6D: Análise citométrica de fluxo de infiltrados de célula T do doador em LN e baço do receptor 5 dias após alo-HCT de camundongos BALB/c letalmente irradiados reconstituídos com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}. As células foram separadas em H2-Db e CD45; células T CD4 e CD8. É mostrado um experimento com $n = 4$ /grupo. Os dados são exibidos como média $\pm$ SEM. Abreviações: TCD: depletado de células T, BM: medula óssea, HCT: transferência de célula hematopoiética, WT: tipo selvagem.

[0023]Figuras 7A e 7B: Ensaio de morte com o uso de células tumorais A20 e células T isoladas de baço e linfonodos de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}, respectivamente. Figura 7A: Análise citométrica de fluxo de células mortas por coloração TO-PRO3; são mostrados gráficos representativos. Figura 7B: Lise específica de células tumorais A20 por células T indicadas em proporções alvo:efetor de 1:1, 1:20 e 1:50. Os dados são representativos de dois experimentos com $n = 3$ camundongos por grupo em cada. Os dados são exibidos como média $\pm$ SEM. Abreviações: WT: tipo selvagem.

[0024]Figuras 8A e 8B: Figura 8A: Sobrevida de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{rb-/-} letalmente irradiados após alo-HCT com (TCD)-BM depletada de células T de camundongos Balb/c WT isoladamente ou combinada com esplenócitos de camundongos Balb/c WT. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais, cada um com $n = 5-7$ /grupo. Figura 8B: Sobrevida de camundongos Balb/c WT

letalmente irradiados após alo-HCT com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2rb*^{-/-} isoladamente ou combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais, cada um com n = 5-7/grupo.

[0025]Figuras 9A-9H: GM-CSF dirige GvHD por meio de células mieloides derivadas do doador.

[0026]Figura 9A: Sobrevida de camundongos C57BL/6 WT e *Csf2rb*^{-/-} letalmente irradiados após alo-HCT com MHC incompatível com TCD-BM de camundongos Balb/c WT isoladamente ou combinada com esplenócitos de camundongos Balb/c WT. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais, cada um com n = 5/grupo. Figura 9B: Sobrevida de camundongos Balb/c WT letalmente irradiados após alo-HCT com MHC incompatível com TCD-BM de camundongos C57BL/6 WT ou e *Csf2rb*^{-/-} isoladamente ou combinada com esplenócitos de camundongos C57BL/6 WT. Dados reunidos em *pool* de 2 experimentos individuais, cada um com n = 5/grupo. Para comparação de curvas de sobrevida (WT vs. receptores/doadores *Csf2rb*^{-/-}), foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox) em a e b, ** p < 0,01. Figura 9C: mapa de t-SNE anotado que exibe 200.000 células coletadas aleatoriamente da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e *Csf2rb*^{-/-} que mostra fosforilação de STAT5 (gradiente preto até amarelo) mediante estimulação com GM-CSF, analisada por análise citométrica de fluxo. Dados representam dois experimentos independentes n = 3/grupo. Figura 9D: Frequências de supra-regulação de pSTAT5 induzida por GM-CSF em monócitos e neutrófilos de camundongos C57BL/6 WT e *Csf2rb*^{-/-}, como mostrada sobreposta na Figura 9B. Figura 9E: Análise

citométrica de fluxo de populações diferentes de células mieloides (DCs, neutrófilos, monócitos e MDCs) após HCT. É mostrada uma separação de exemplo para o fígado. Figura 9F: Quantificação de populações de células mieloides (da Figura 9E) no baço (fileira superior) e fígado (fileira inferior). É mostrado um experimento representativo de 3 experimentos individuais, $n = 4-5/\text{grupo}$. (g) Frequência de neutrófilos e monócitos que produzem pró-IL-1 β dentro da população H2Db⁺, CD45⁺, de baços de camundongos 6 dias após alo-HCT. São mostrados gráficos representativos para neutrófilos, monócitos e MDCs (separados como em e). Dados representam dois experimentos independentes $n = 5/\text{grupo}$. Figura 9H: Análise citométrica de fluxo de ROS (reagente CellROX) em camundongos 6 dias após alo-HCT. Histogramas representativos de MFI para neutrófilos, monócitos e MDCs (separados como na Figura 9E). Dados representam um experimento com $n = 5-7/\text{grupo}$. Para comparação das médias, foi usado um teste-T não pareado bicaudado em f-h *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Os dados são exibidos como média $\pm$ SEM. Abreviações: TCD: depletado de células T, BM: medula óssea, HCT: transferência de célula hematopoiética, WT: tipo selvagem.

Breve descrição das sequências descritas

[0027]As sequências nucleicas fornecidas nesse relatório descritivo são mostradas usando as abreviações com letras padronizadas para bases de nucleotídeos como definidas em 37 C.F.R. 1.822. Somente uma fita de cada sequência de ácidos nucleicos é mostrada, mas subentende-se que a fita complementar esteja incluída por qualquer referência à fita exibida. A Listagem de sequências é

submetida como um arquivo de texto em ASCII denominado "protocolo de Sequência uz349wo_ST25.txt", com cerca de 2 KB, que é incorporado por referência nesse relatório descritivo.

[0028]IDS. DE SEQ. N^{os}: 1 e 2: iniciadores diretos e reversos de amplificação por PCR para o gene CSF2.

[0029]IDS. DE SEQ. N^{os}: 3 e 4: *iniciadores diretos e reversos de amplificação por PCR para o gene GAPDH.*

Descrição detalhada da invenção

Termos e definições

[0030]O termo "GvHD", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado à doença enxerto-versus-hospedeiro, uma complicação decorrente de transplante de células imunes em um paciente geneticamente diferente. GvHD está comumente associada com transplantes de célula-tronco, particularmente no contexto de terapia de malignidades hematológicas, mas pode surgir no contexto de outro transplante.

[0031]O termo "alo-HCT", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado ao transplante alogênico de célula hematopoiética.

[0032]O termo "GM-CSF", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado ao fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (Uniprot P04141; N^o CAS 83869-56-1).

[0033]O termo "CD116", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado ao Agrupamento de Diferenciação 116, também conhecido como a cadeia alfa do receptor de GM-CSF (Uniprot P15509). O receptor de GM-CSF é formado por uma cadeia alfa específica para GM-CSF (CD116)

e uma cadeia beta (CD131) que também está presente nos receptores de interleucina IL-3R e IL-5R.

[0034]O ligante de GM-CSF ou um de CD116, CD131 e o receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 de acordo com a invenção é capaz de anular ou neutralizar a transdução de sinal iniciada quando GM-CSF se liga ao seu receptor.

[0035]O termo "CLL", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado à leucemia linfocítica ou linfoblástica aguda ou crônica.

[0036]O termo "ALL", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado à leucemia linfoblástica aguda.

[0037]O termo "CML", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado à leucemia mielógena ou mieloide crônica.

[0038]O termo "AML", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado à leucemia mielógena aguda.

[0039]O termo "AMoL", no contexto do presente relatório descritivo, está relacionado à leucemia monocítica aguda.

[0040]No contexto do presente relatório descritivo, o termo "anticorpo" é usado em seu significado conhecido na técnica de biologia celular e imunologia; ele se refere a anticorpos inteiros incluindo, sem limitação, imunoglobulina tipo G (IgG), tipo A (IgA), tipo D (IgD), tipo E (IgE) ou tipo M (IgM), qualquer fragmento de ligação ao antígeno ou cadeias únicas desta e construções relacionadas ou derivadas. Um anticorpo inteiro é uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto. Cada cadeia pesada é formada por uma região variável da cadeia pesada (V_H) e uma região constante da cadeia pesada (C_H). A

região constante da cadeia pesada é formada por três domínios, C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}. Cada cadeia leve é formada por uma região variável da cadeia leve (abreviada nesse relatório descritivo como V_L) e uma região constante da cadeia leve (C_L). A região constante da cadeia leve é formada por um domínio, C_L. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente do sistema complemento clássico. Similarmente, o termo engloba um denominado *nanobody* ou anticorpo de domínio único, um fragmento de anticorpo que consiste em a single domínio de anticorpo variável monomérico.

[0041]O termo “anticorpo” engloba um anticorpo de camelídeo, particularmente um anticorpo de camelídeo humanizado.

[0042]O termo “molécula do tipo anticorpo”, no contexto do presente relatório descritivo, se refere a uma molécula capaz de ligação específica a outra molécula ou alvo com alta afinidade/uma $K_D \leq 10E-8$ mol/L. Uma molécula do tipo anticorpo se liga ao seu alvo similarmente à ligação específica de um anticorpo. O termo “molécula do tipo anticorpo” engloba uma proteína de repetição, por exemplo, uma proteína de repetição de anquirina projetada (Molecular Partners, Zurique), proteínas miméticas de anticorpo modificadas geneticamente que exibem ligação à proteína-alvo altamente específica e de alta afinidade (veja US2012142611, US2016250341, US2016075767 e US2015368302, todos

incorporados nesse relatório descritivo por referência). O termo “molécula do tipo anticorpo” ainda engloba, sem limitação, um polipeptídeo derivado de proteínas de repetição de tatu, um polipeptídeo derivado de proteínas de repetição ricas em leucina e um polipeptídeo derivado de proteínas de repetição de tetratricopeptídeo.

[0043]O termo “molécula do tipo anticorpo” ainda engloba um polipeptídeo derivado de domínios de proteína A, um polipeptídeo derivado de domínio de fibronectina FN3, um polipeptídeo derivado de domínios de fibronectina de consenso, um polipeptídeo derivado de lipocalinas, um polipeptídeo derivado de dedos de zinco, um polipeptídeo derivado de domínio de homologia Src 2 (SH2), um polipeptídeo derivado de domínio de homologia Src 3 (SH3), um polipeptídeo derivado de domínios PDZ, um polipeptídeo derivado de gama-cristalina, um polipeptídeo derivado de ubiquitina, um polipeptídeo derivado de um polipeptídeo de nó de cisteína e um polipeptídeo derivado de uma notina, um polipeptídeo derivado de uma cistatina, um polipeptídeo derivado de Sac7d, um *coiled-coil* de hélice tripla (também conhecido como *alfabodies*), um polipeptídeo derivado de um domínio de Kunitz de um inibidor de protease do tipo Kunitz e um polipeptídeo derivado de um módulo de ligação a carboidratos 32-2.

[0044]O termo “polipeptídeo derivado de domínios de proteína A” se refere a uma molécula que é um derivado de proteína A e é capaz de se ligar especificamente à região Fc e à região Fab de imunoglobulinas.

[0045]O termo “proteína de repetição de tatu” se refere a um polipeptídeo que compreende pelo menos uma repetição de tatu, em que uma repetição de tatu é caracterizada por um

par de alfa hélices que formam uma estrutura *hairpin*.

[0046]No contexto do presente relatório descritivo, o termo “anticorpo humanizado” é usado em seu significado conhecido na técnica de biologia celular e bioquímica; ele se refere a um anticorpo originalmente produzido por células imunes de uma espécie não humana, cujas sequências de proteínas foram modificadas para aumentar sua similaridade para variantes anticorpo produzidas naturalmente em humanos.

[0047]O termo “anticorpo de camelídeo humanizado”, no contexto do presente relatório descritivo, se refere a um anticorpo que consiste somente na cadeia pesada ou no domínio variável da cadeia pesada (domínio VHH) e cuja sequência de aminoácidos foi modificada para aumentar sua similaridade com anticorpos produzidos naturalmente em humanos e, dessa forma, exibem uma imunogenicidade reduzida quando administrados a um ser humano. Uma estratégia geral para humanizar anticorpos de camelídeos é mostrada em Vincke e cols. “General Strategy to Humanize a Camelid Single-Domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold”, *J. Biol. Chem.*, 30 de janeiro de 2009; 284 (5): 3.273-3.284, e US2011165621 A1.

[0048]No contexto do presente relatório descritivo, o termo “anticorpo quimérico” é usado em seu significado conhecido na técnica de biologia celular e imunologia; ele se refere a uma molécula de anticorpo na qual a região constante, ou uma porção desta, é alterada, substituída ou trocada de modo que o sítio de ligação ao antígeno (região variável) esteja ligado a uma região constante de uma classe, função efetora e/ou espécie diferente ou alterada, ou uma molécula inteiramente diferente que confere novas

propriedades ao anticorpo quimérico, por exemplo, uma enzima, citocina, toxina, hormônio, fator de crescimento, fármaco etc. Por exemplo, um anticorpo pode ser modificado por substituição de sua região constante com uma citocina. Em função da substituição com uma citocina, o anticorpo quimérico pode reter sua especificidade no reconhecimento do antígeno tendo também, ao mesmo tempo, a função, ou parte desta, da molécula de citocina original.

[0049]No contexto do presente relatório descritivo, o termo “constante de dissociação” (K_D) é usado em seu significado conhecido na técnica de química e física; ele se refere a uma constante de equilíbrio que mede a propensão de um objeto maior para se dissociar reversivelmente em componentes menores, como quando um complexo se quebra em suas moléculas componentes. A K_D é expressa em unidades molares [M] e corresponde à concentração de [Ab] na qual os sítios de ligação de [Ag] estão ocupados pela metade. Em outras palavras, a concentração de [Ab] não ligado é igual à concentração do complexo [AbAg]. A constante de dissociação pode ser calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$K_D = \frac{[Ab] * [Ag]}{[AbAg]}$$

[Ab]: concentração de *anticorpo*; [Ag]: concentração de antígeno; [AbAg]: concentração do *complexo antígeno/anticorpo*

[0050]No contexto do presente relatório descritivo, os termos “off-rate” (K_{off} ; [1/s]) e “on-rate” (K_{on} ; [1/s*M]) são usados em seu significado conhecido na técnica de química e física; eles se referem a uma constante da taxa que mede a dissociação (K_{off}) ou associação (K_{on}) de um anticorpo com

seu antígeno-alvo. A *K_{off}* e *K_{on}* podem ser determinadas experimentalmente com o uso de métodos bem estabelecidos na técnica. Um método para determinação da *K_{off}* e *K_{on}* de um anticorpo emprega ressonância de plásmon de superfície. Este é o princípio por trás de sistemas biossensores como, por exemplo, o sistema Biacore® ou o sistema ProteOn®. Eles também podem ser usados para determinar a constante de dissociação *K_D* por utilização da seguinte fórmula:

$$K_D = \frac{[K_{off}]}{[K_{on}]}$$

[0051] Como usado nesse relatório descritivo, o termo “que trata” ou “tratamento” de qualquer doença ou distúrbio (por exemplo, câncer ou doença enxerto versus hospedeiro) se refere, em uma modalidade, à melhora da doença ou distúrbio (por exemplo, tornar mais lento ou interromper ou reduzir o desenvolvimento da doença ou pelo menos de um dos sintomas clínicos desta). Em outra modalidade, “que trata” ou “tratamento” se refere ao alívio ou melhora de pelo menos um parâmetro físico, incluindo aqueles que podem não ser discerníveis pelo paciente. Ainda em outra modalidade, “que trata” ou “tratamento” se refere à modulação da doença ou distúrbio, fisicamente (por exemplo, estabilização de um sintoma discernível), fisiologicamente (por exemplo, estabilização de um parâmetro físico), ou ambos. Métodos para avaliação do tratamento e/ou prevenção de doença são geralmente conhecidos na técnica, salvo especificamente descrito nesse relatório descritivo abaixo.

[0052] No contexto do presente relatório descritivo, o termo “aptâmero” se refere a um oligonucleotídeo ou peptídeo capaz de se ligar especificamente a outra molécula ou alvo

com alta afinidade, possuindo uma $K_D \leq 10E-8$ mol/L. Um aptâmero se liga ao seu alvo similarmente à ligação específica de um anticorpo. O termo “aptâmero” engloba moléculas de RNA ou DNA, análogos de ácido nucleico ou moléculas de peptídeo. Um aptâmero também pode ser acoplado a uma molécula de RNA autoclivável, denominada ribozima. São conhecidos métodos para obtenção de aptâmeros *de novo*; esses incluem a denominada abordagem “selex” e outros métodos baseados na evolução de ligantes específicos de uma seleção aleatória.

[0053] Com o uso de modelos murídeos de HCT com MHC totalmente e parcialmente incompatível, os inventores mostraram que GM-CSF (Csf-2), uma citocina com um papel emergente através de uma gama de distúrbios inflamatórios, é produzido abundantemente por células T do doador precocemente após a transferência. Quando células T do doador não possuem GM-CSF, a GvHD era significativamente melhorada. Curiosamente e surpreendentemente, a ausência de GM-CSF não afetou a habilidade das células T do doador para controlar o crescimento tumoral em camundongos (o efeito GvL), e esse controle foi obtido sem a emergência de GvHD, até mesmo no contexto de incompatibilidade de MHC total. Os inventores também revelaram níveis elevados de GM-CSF em biópsias gastrintestinais de pacientes com GvHD, consistente com um papel paralelo na condição humana. Portanto, os inventores propõem GM-CSF como um novo alvo terapêutico para atenuar GvHD mantendo, ao mesmo tempo, GvL em pacientes que recebem alo-HCT.

[0054] Embora o uso de anticorpos anti-GMCSF ou anti-GMCSFR tenha sido proposto no contexto de GvHD, os dados

apresentados aqui pela primeira vez mostram que GvHD pode ser tratada ou inibida sem afetar o benefício terapêutico de um transplante alogênico, e que há uma lógica clínica para o emprego dos ligantes da invenção para permitir que o corpo monte uma resposta enxerto-versus-leucemia suprimindo, ao mesmo tempo, GvHD (mediada por fagócitos). Isso permitirá a inclusão de pacientes para alo-HCT, que atualmente não são programados para alo-HCT em função do risco imposto pela GvHD, e pode ainda permitir limitar o uso de imunossupressores após alo-HCT.

[0055]Um primeiro aspecto da invenção está relacionado a um ligante não agonista que se liga especificamente ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 para uso no tratamento de leucemia em um paciente submetido à transferência de célula-tronco hematopoiética alogênica (alo-HCT). Em outras palavras, o ligante é usado para o tratamento de leucemia subsequente à transferência alogênica de célula-tronco hematopoiética.

[0056]O ligante não agonista da invenção anula o sinal biológico exercido por GM-CSF em seu receptor, levando aos efeitos a jusante da interação de GM-CSF. Consequentemente, será observado que os métodos descritos nesse relatório descritivo podem ser usados para inibir ou reduzir a severidade de GvHD no contexto de qualquer transplante alogênico no qual GvHD possa ocorrer, mas sem diminuir significativamente o efeito benéfico do transplante alogênico. Em modalidades particulares, são descritos nesse relatório descritivo métodos para o tratamento de uma malignidade hematológica, incluindo leucemia, linfoma ou um mieloma múltiplo, por administração a um paciente do ligante

não agonista descrito concomitantemente ou após fornecimento de um tratamento por alo-HCT para a malignidade. Em outras modalidades, os métodos para inibição ou redução da severidade da GvHD permitem o fornecimento de um transplante alogênico no qual existe o risco para indução de GvHD por células transplantadas que produzem ou induzem GM-CSF suficiente juntamente com o alotransplante. O transplante de fígado é um exemplo não limitante de um transplante desse tipo.

[0057]Em certas modalidades, o ligante não agonista anti-GM-CSF, anti-CD116, anti-CD131 ou anti-receptor de GM-CSF é um anticorpo, fragmento de anticorpo, uma molécula do tipo anticorpo, aptâmero ou uma polipeptídeo derivado de domínios de proteína A. Embora o uso de anticorpos, em particular anticorpos monoclonais, seja comum para usos terapêuticos em pacientes humanos e, na verdade, anticorpos GM-CSF-específicos e anticorpos CD116-específicos tenham sido desenvolvidos para outras finalidades terapêuticas, aqueles habilitados na técnica compreendem que outras modalidades como, por exemplo, DARPINS, aptâmeros ou moléculas derivadas de anticorpo, podem ser empregadas para servir basicamente à mesma finalidade.

[0058]Em algumas modalidades, o ligante polipeptídico não agonista anti-GM-CSF, anti-CD116, anti-CD131 ou anti-receptor de GM-CSF é uma imunoglobulina que consiste em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Em algumas modalidades, o ligante polipeptídico não agonista anti-GM-CSF, anti-CD116, anti-CD131 ou anti-receptor de GM-CSF é um anticorpo de domínio único, que consiste em um domínio variável isolado de uma cadeia pesada ou leve. Em algumas modalidades, o

ligante polipeptídico não agonista anti-GM-CSF, anti-CD116, anti-CD131 ou anti-receptor de GM-CSF é um anticorpo de cadeia pesada que consiste somente em cadeias pesadas como, por exemplo, anticorpos encontrados em camelídeos.

[0059]Em certas modalidades, o ligante polipeptídico não agonista anti-GM-CSF, anti-CD116, anti-CD131 ou anti-receptor de GM-CSF é um fragmento de anticorpo. Em certas modalidades, o ligante polipeptídico não agonista anti-GM-CSF, anti-CD116, anti-CD131 ou anti-receptor de GM-CSF é um fragmento Fab, ou seja, o fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo, ou um fragmento variável de cadeia única, ou seja, uma proteína de fusão da região variável da cadeia pesada e da cadeia leve de um anticorpo conectada por um ligante peptídico.

[0060]O efeito do tratamento com um anticorpo para GM-CSF em a modelo em camundongo de um tratamento para leucemia pós-alo-HCT é mostrado na Figura 4.

[0061]Em certas modalidades, o ligante é um anticorpo monoclonal. Em certas modalidades, o ligante é um anticorpo humano.

[0062]Em certas modalidades, o ligante para uso em um método de tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia, em um paciente submetido à transferência de célula-tronco hematopoiética alogênica (alo-HCT) é um anticorpo humanizado. Em certas modalidades, o ligante é um anticorpo quimérico.

[0063]Em certas modalidades, o ligante para uso em um método de tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, é Mavrilimumab (Nº CAS 1085337-57-0).

[0064]Em certas modalidades, o ligante para uso em um método de tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, é Namilumab (Nº CAS 1206681-39-1).

[0065]Em certas modalidades, o ligante para uso em um método de tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, é Lenzilumab (Nº CAS 1229575-09-0). Em certas modalidades, o ligante para uso em um método de tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, é Otilimab (MOR103 ou GSK-3196165; Nº CAS 1638332-55-4). Em certas modalidades, o ligante para uso em um método de tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, é Gimsilumab (MORAb-022; Nº CAS 1648796-29-5).

[0066]Será observado que, em modalidades particulares, um anticorpo, por exemplo, Mavrilimumab, Namilumab, Lenzilumab, Otilimab ou Gimsilumab, pode ser usado em métodos para o fornecimento de um transplante alogênico, nos quais o desenvolvimento de GvHD é inibido ou sua severidade é reduzida.

[0067]Em certas modalidades, o ligante para uso em um método de tratamento de leucemia em um paciente submetido a alo-HCT é caracterizado por uma K_D menor do que ($<$) 10^{-7} molL $^{-1}$, particularmente $K_D < 10^{-8}$ molL $^{-1}$, mais particularmente $K_D < 10^{-9}$ molL $^{-1}$.

[0068]Um segundo aspecto da invenção está relacionado a uma molécula de ácido nucleico que codifica o ligante como especificado no primeiro aspecto da invenção ou qualquer uma

de suas modalidades específicas, para uso no tratamento de leucemia em um paciente submetido a alo-HCT.

[0069]Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico para uso no tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, é uma molécula de DNA de fita simples ou de fita dupla ou uma molécula de RNA de fita simples ou de fita dupla.

[0070]Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico para uso no tratamento de leucemia, ou de outra malignidade, em um paciente submetido a alo-HCT de acordo com a invenção é um construto de expressão de ácido nucleico que compreende a sequência de ácidos nucleicos especificada acima sob o controle de um promotor operável em uma célula de mamífero.

[0071]Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico para uso no tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, é um construto de expressão selecionada de um plasmídeo de DNA, um DNA linear de fita dupla, um RNA de fita simples e um vírus, particularmente um lentivírus, um herpesvírus, um adenovírus ou um vírus adeno-associado.

[0072]O construto de expressão de ácido nucleico é usada para introduzir um gene específico em uma célula-alvo, e pode comandar o mecanismo da célula para síntese de proteína para produzir a proteína codificada pelo gene. O construto de expressão de ácido nucleico é modificada geneticamente para conter sequências regulatórias que atuam como regiões promotoras e, opcionalmente, também sequências que atuam como regiões intensificadoras e levam à transcrição

eficiente do gene carregado no construto de expressão.

[0073] Vetores de expressão de ácido nucleico para uso nos métodos descritos são comuns na técnica. Vetores ilustrativos para expressão de proteínas de mamíferos incluem aqueles disponíveis, *inter alia*, por Promega Corp (Madison, WI) e Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA).

[0074] Em outra modalidade, como uma alternativa à administração de um ligante não agonista, os métodos de tratamento descritos incluem a inibição da expressão de GM-CSF, seu receptor (CD116 e CD131), ou de uma subunidade individual do receptor de GM-CSF (CD116 e/ou CD131). Nesses métodos, um ácido nucleico capaz de inibir a expressão GM-CSF ou seus peptídeos receptores é fornecido a um paciente necessitado (por exemplo, após ou durante alo-HCT). Em modalidades particulares, o ácido nucleico de direcionamento pode ser um DNA anti-senso, siRNA ou semelhantes. Métodos de determinação de um alvo e sequências de direcionamento adequadas são conhecidos na técnica.

[0075] Uma alternativa dos aspectos da invenção acima está relacionada a uma composição farmacêutica para uso no tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT. A composição compreende o ligante não agonista que se liga especificamente ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 ou o construto de expressão de ácido nucleico que o codifica, e a carreador farmacêuticamente aceitável, particularmente formulada como uma forma de administração para administração parenteral, mais particularmente para administração intravenosa.

[0076]Anticorpos contra GM-CSF e contra um de CD116, CD131 e o receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 são conhecidos na técnica. Anticorpos monoclonais específicos para GM-CSF foram desenvolvidos e testados clinicamente quanto à eficácia em artrite reumatoide. Exemplos não limitantes de anticorpos para a prática da presente invenção incluem anticorpos contra CD116/131 revelados em US2014079708, US2012141464, US2009130093, US2014079708 e US2015376285, todos para Cohen e cols. (Mavrilimumab), incorporados nesse relatório descritivo por referência.

[0077]Outro exemplo não limitante é o anticorpo contra GM-CSF (Otilimab) revelado em US2015246969 para Haertle e cols., e the anticorpos of US2011189082 e US2013071923 para Kirchner e cols., todos incorporados nesse relatório descritivo por referência.

[0078]Outro exemplo não limitante é o anticorpo contra GM-CSF revelado em US2009053213, US2011045000, US2017218061 para Steidl e cols., todos incorporados nesse relatório descritivo por referência.

[0079]Outro anticorpo contra GM-CSF está sendo desenvolvido para o uso em artrite reumatoide por Takeda sob o nome Namilumab.

[0080]Outro anticorpo contra GM-CSF está passando por um experimento clínico em indivíduos com leucemia mielomonocítica crônica (CMML) tratados previamente sob o nome Lenzilumab (Nº CAS 1229575-09-0).

[0081]Similarmente, dentro do escopo da presente invenção está um método de tratamento de uma malignidade hematológica, por exemplo, leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, que compreende a administração ao paciente de um

ligante não agonista, particularmente um anticorpo, que se liga especificamente ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 de acordo com a descrição acima.

[0082]Similarmente, é fornecida uma forma de dosagem para a prevenção ou tratamento de leucemia em um paciente submetido a alo-HCT, que compreende um ligante ou um construto de ácido nucleico de acordo com um dos aspectos da invenção acima.

[0083]Formas de dosagem podem ser para administração enteral, por exemplo, administração nasal, bucal, retal, transdérmica ou oral, ou como uma forma por inalação ou supositório. Alternativamente, pode ser usada administração parenteral, por exemplo, formas por injeção subcutânea, intravenosa, intra-hepática ou intramuscular. Opcionalmente, um carreador e/ou excipiente farmacologicamente aceitável pode estar presente.

[0084]Sempre que alternativas para características únicas separáveis são apresentadas nesse relatório descritivo como “modalidades”, está subentendido que essas alternativas podem ser combinadas livremente para formar modalidades distintas da invenção reveladas nesse relatório descritivo.

[0085]A invenção é adicionalmente descrita de forma exemplar pelos seguintes itens:

Item 1: Um ligante não agonista que se liga especificamente ao e capaz de neutralizar a função fisiológica de:

- GM-CSF ou
- um de CD116, CD131 e o receptor de GM-CSF formado por

CD116 e CD131, para uso no tratamento de GvHD.

[0086]Item 2: O ligante para uso no tratamento de GvHD de acordo com o item 1, em que o ligante é um anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmero ou molécula do tipo anticorpo.

[0087]Item 3: O ligante, de acordo com o item 1 ou 2 para uso no tratamento de GvHD, em que o ligante é um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado.

[0088]Item 4: O ligante de acordo com qualquer um dos itens precedentes para uso no tratamento de GvHD, selecionado de Mavrilimumab, Namilumab, Lenzilumab, MOR103 e MORAb-022.

[0089]Item 5: O ligante de acordo com qualquer um dos itens precedentes para uso no tratamento de GvHD, em que a ligação do ligante ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 é caracterizada por uma K_D menor do que ($<$) 10^{-7} , particularmente $K_D < 10^{-8}$, mais particularmente $K_D < 10^{-9}$.

[0090]Item 6: Uma molécula de ácido nucleico que codifica o ligante de acordo com qualquer um dos itens 1 a 4 precedentes para uso no tratamento de GvHD.

[0091]Item 7: A molécula de ácido nucleico para uso no tratamento de GvHD de acordo com o item 6, em que a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA.

[0092]Item 8: Um construto de expressão de ácido nucleico que compreende a sequência de ácidos nucleicos do item 5 ou 7 para uso no tratamento de GvHD.

[0093]Item 9: O construto de expressão de ácido nucleico para uso no tratamento de GvHD de acordo com item 8, em que o construto de expressão é selecionada de um plasmídeo de

DNA, um DNA linear de fita dupla, um RNA de fita simples e um vírus, particularmente um lentivírus, um herpesvírus, um adenovírus ou um vírus adeno-associado.

[0094]Item 10: O ligante de acordo com qualquer um dos itens precedentes 1 a 5 ou a molécula de ácido nucleico de acordo com os itens 6 ou 7, ou o construto de expressão de ácido nucleico de acordo com o item 8 ou 9, para uso no tratamento de complicações que surgem como consequência de alo-HCT.

[0095]Item 11: O ligante de acordo com qualquer um dos itens 1 a 5 precedentes ou a molécula de ácido nucleico de acordo com os itens 6 ou 7, ou o construto de expressão de ácido nucleico de acordo com o item 8 ou 9, para uso no tratamento de complicações que surgem como consequência de alo-HCT em um paciente que sofre ou se recupera de uma malignidade hematológica,

- particularmente, uma malignidade hematológica selecionada de leucemia, linfoma e mieloma múltiplo,

- mais particularmente, uma malignidade hematológica selecionada de leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL) e leucemia monocítica aguda (AMoL), um linfoma de Hodgkin ou um linfoma não-Hodgkin.

[0096]A invenção é ainda ilustrada pelos exemplos e figuras seguintes, dos quais modalidades e vantagens adicionais podem ser obtidas. Esses exemplos visam ilustrar a invenção, mas não limitar seu escopo.

Exemplos

Material e métodos

Design do estudo

[0097]O estudo foi iniciado para determinar se certas citocinas derivadas de células T poderiam separar GvHD de GvL e, portanto, poderiam representar novos alvos terapêuticos promissores para o tratamento de malignidades hematológicas. Para atingir esse objetivo, usamos dois modelos experimentais de GvHD diferentes, um modelo experimental de GvL e indivíduos humanos. Para estudos em animais, foram usados camundongos com 8 a 12 semanas de idade. Todos os experimentos em animais foram aprovados por autoridades locais ("Swiss Cantonal Veterinary Office") e realizados sob as licenças experimentais apropriadas (76/2012 e 052/2015). Os animais foram designados aleatoriamente para os grupos experimentais e a pontuação clínica em vida foi realizada de forma cega, bem como processamento de análise de imagens em cortes de órgãos. O tamanho da amostra e os pontos do tempo finais de doença foram selecionados com base em estudos prévios. Citometria de fluxo, análise histopatológica, reações mistas de linfócitos (MLRs), ensaios de morte e análise de citocinas foram realizados para caracterizar os órgãos-alvos de GvHD/GvL. Os efeitos do anticorpo de bloqueio específico para GM-CSF sobre a pontuação clínica foram avaliados pelos pesquisadores que eram cegos quanto ao tratamento.

[0098]Para realizar análise estatística confiável, pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada um dos dados mostrados no manuscrito, salvo quando diferencialmente indicado nas legendas das figuras. Todas as amostras humanas foram coletadas após aprovação pelo comitê de ética da "Albert-Ludwigs University" Friburgo, Alemanha (Número do protocolo: 267/11) após autorização informada por

escrito.

[0099]Realizamos imunoistoquímica e RT-PCR quantitativa nas biópsias do intestino, e citometria de fluxo multiparâmetros nas PBMCs.

[0100]**Camundongos e manipulações *in vivo*:** Os camundongos foram mantidos internamente em gaiolas individualmente ventiladas sob condições livres de patógenos específicos. Camundongos C57BL/6 WT, BALB/c e B6D2F1 foram adquiridos de Janvier Laboratories, França. Camundongos congênicos C57BL/6 CD45.1 foram cruzados internamente. Camundongos *Ifng*^{-/-} foram obtidos de Jackson Laboratories; camundongos *Csf2*^{-/-} foram fornecidos por Jeffrey Whitsett e adicionalmente retrocruzados em C57BL/6 usando congênica rápida. Camundongos *Il17a*^{-/-} foram fornecidos por Y. Iwakura. Todos os experimentos em animais foram aprovados por autoridades locais ("Swiss Cantonal Veterinary Office") e realizados sob as licenças experimentais apropriadas (76/2012 e 052/2015). Camundongos-fêmeas com 7-12 semana de idade foram usados ao longo de todos os experimentos.

[0101]**Indução de GvHD:** Suspensões de célula única do baço e BM de camundongos doadores C57BL/6 ou BALB/c foram preparadas como descrito abaixo (sob "Isolamento de linfócitos"). Para depleção de células T da BM, as células foram incubadas a $25 \times 10^6/\text{ml}$ em meio RPMI completo (RPMI 1640 com FCS 10%, Penicilina/Estreptomicina 1%, L-Glutamina 2 mM e β -mercaptoetanol 0,5 mM) com $\alpha\text{CD90.2}$ -Biotina (1:100, eBioscience) por 30 minutos a 4°C com agitação. Subsequentemente, após uma etapa de lavagem com tampão MACS gelado (PBS com BSA 0,5% e EDTA 2 mM), as células foram ressuspensas a 100×10^6 células/ml em tampão MACS e

incubadas com partículas anti-Biotina (1:5, Miltenyi) ou partículas de Estreptavidina (1:10, Miltenyi) por 20 minutos a 4°C com agitação. Após lavagem com tampão MACS, as células foram separadas usando the AutoMACS Pro, Miltenyi Biotech e o programa "Depletes". A fração negativa foi coletada e os números de células foram determinados usando uma câmara de contagem. A eficiência de depleção foi analisada por citometria de fluxo. As frequências de células T na BM foram reduzidas de 1-3% para 0,055 +/- 0,022%. Para o isolamento de células T intocadas de esplenócitos, o kit de isolamento de células T Pan (II) de Miltenyi foi usado de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram separadas usando o AutoMACS Pro, Miltenyi Biotech e o programa "Deplete". A fração negativa foi coletada e os números de células foram determinados usando uma câmara de contagem. A eficiência de enriquecimento foi analisada por citometria de fluxo e a pureza de célula T foi rotineiramente 95,2 +/- 2,16%. Células T CD4 e CD8 foram separadas usando o kit de isolamento de células T CD4 de Camundongo MojoSort e o kit de isolamento de células T CD8 de Camundongo MojoSort de acordo com as instruções do fabricante (Biolegend).

[0102]Camundongos BALB/c ou B6D2F1 receptores foram irradiados letalmente sob condições livres de patógenos específicas em gaiolas-filtro com uma dose dividida de 850 (BALB/c), 1.200 (B6D2F1) ou 1.100 (C57BL/6) rad, separadas por pelo menos 5 horas. Os receptores foram injetados i.v. com 5×10^6 células da BM e $0,110 \times 10^6$ esplenócitos ou $6 - 7,5 \times 10^6$ células T por camundongo C57BL/6 ou B6D2F1. Os receptores foram injetados i.v. com 7×10^6 células da BM e 20×10^6 esplenócitos/camundongo BALB/c. Os camundongos foram

tratados com Borgal 0,1% (Intervet) na água de beber por três semanas para evitar infecções bacterianas. Os camundongos também foram pontuados diariamente quanto aos sintomas de GvHD, adaptado de (Cooke, K.R. e cols. "An Experimental Model of Idiopathic Pneumonia Syndrome After Bone Marrow Transplant: I. The Roles of Minor H Antigens and Endotoxin". *Blood* **88**, 3.230-3.239 (1996)), e mostrados na Tabela Suplementar 4. Os pesquisadores eram cegos para alocação de grupo quando da pontuação da GvHD. O peso de referência foi medido no dia 0, antes da injeção de células do enxerto. Para o bloqueio de GM-CSF, os camundongos foram tratados com PBS, 300 µg de controle de isótipo (2A3) ou 300 µg de anticorpo anti-GM-CSF (MP1) (BioXCell) 3 vezes/semana começando 2 dias antes do HCT.

[0103]**Indução de GvL:** A linhagem de células de linfoma de célula B A20-Luciferase⁺GFP⁺ (A20-luc-gfp, gentilmente fornecida por Emma Svensson, "Department of Immunology, Genetics and Pathology", "Uppsala University", Suécia) foi gerada em uma base BALB/c por transdução de A20 (ATCC) com um lentivírus que codifica CMV-GFP-(T2A)-Luc. Células WEHI-3-luciferase⁺ foram doadas por R. Zeiser. No dia de HCT, 2,5 x 10⁵ células A20, 5 x 10⁵ células A20 ou 1 x 10⁵ células WEHI-3 por camundongo foram injetadas por via intravenosa, juntamente com 5 x 10⁶ células C57BL/6 WT da BM, isoladamente ou com 1 x 10⁵ células T esplênicas purificadas/camundongo de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}. No dia de HCT, 2,5 x 10⁵ células A20 por camundongo foram injetadas por via intravenosa, juntamente com 5 x 10⁶ células C57BL/6 WT da BM, isoladamente ou com 1 x 10⁵ células T esplênicas purificadas/camundongo de camundongos C57BL/6 WT ou *Csf2*^{-/-}.

A progressão do Tumor foi monitorada por imageamento por bioluminescência (BLI): camundongos foram injetados por via intraperitoneal com 150 mg/kg de D-luciferina (Promega) em PBS dez minutos antes do imageamento usando o sistema de imageamento pré-clínico *in vivo* Xenogen IVIS 200 (PerkinElmer, Waltham, MA); tempos de exposição de 1-120 s, compartimentação 2-8, FOV 15 cm, f/stop 1, sem filtro. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (2% vaporizado em O₂) antes e durante o imageamento. O fluxo de fótons total (fótons/s) foi medido de uma região-de-interesse (ROI) fixa ao longo de todo o corpo usando o software Living Image (Perkin Elmer). As fotografias sempre foram feitas para cada gaiola e eram cortadas quando grupos de camundongos diferentes estavam misturados dentro da mesma gaiola. As mortalidades pelo tumor e por GvHD foram distinguidas por intensidade de sinal de BLI (ROI > 1×10^7 para incidência de tumor), paralisia membro posterior (indicando desenvolvimento de tumor) e manifestações clínicas de GvHD (pelo menos um grau 2 em dois dos critérios de GvHD individuais). Para o bloqueio de GM-CSF, camundongos foram tratados com 300 µg de controle de isótipo (2A3) ou 300 µg de anticorpo anti-GM-CSF (MP1) (BioXCell) 3 vezes/semana começando 2 dias antes do HCT. A partir da semana 3 em diante, a dose de anticorpo foi reduzida para 150 µg.

[0104]**Isolamento de linfócitos:** Os camundongos foram sacrificados usando inalação por CO₂ e perfundidos com 40 ml de PBS gelado. Salvo especificação em contrário abaixo, os órgãos foram removidos, cortados em pequenos pedaços e incubados com Colagenase a 37°C, seguido por ruptura mecânica por passagem repetida através de uma agulha de calibre 20.

Foi realizada a lise de células sanguíneas vermelhas. A suspensão de células resultante foi então filtrada através de um filtro celular de 70 μm e usada para procedimentos posteriores.

[0105]**Baço:** Para o isolamento de células mieloides, pedaços do órgão foram incubados em 2 ml de Colagenase D (0,4 mg/ml, Roche) e 0,1 mg/ml de DNase I (Sigma) em RPMI por 30 minutos a 37°C. Para o isolamento de células T, os baços foram homogeneizados por ruptura mecânica e filtrados através de um filtro celular de 70 μm . **BM:** Fêmures, tíbias e pelve foram enxaguados com PBS para obter células-tronco da BM. **Fígado:** pedaços do órgão foram incubados em 1,6 mg/ml de Colagenase Tipo IV (de *Clostridium histolyticum*, Sigma) em HBSS contendo FCS 10% por aproximadamente 45 minutos a 37°C. As células foram ressuspensas em 10 ml de Percoll, (gradiente contínuo, 27%, GE) e centrifugadas por 30 minutos a 1.700 rpm em temperatura ambiente. Gordura e sobrenadante foram removidos e o pélete foi submetido à lise de células sanguíneas vermelhas. **Pele:** pedaços do órgão foram incubados em 1 mg/ml de Colagenase Tipo IV (de *Clostridium histolyticum*, Sigma) e 0,1 mg/ml de DNase I (Sigma) em RPMI por 1,5 - 2 horas a 37°C. **Intestino delgado:** os órgãos foram separados da gordura mesentérica antes do muco luminal ser removido mecanicamente; os órgãos foram então incubados em HBSS livre de cálcio e magnésio contendo FCS 2%, 1 mM de DTT e 1,35 mM de EDTA por 15 min a 37°C. Após incubação adicional em HBSS complementado com EDTA por 30 min a 37°C, os cólons foram cortados e digeridos usando 0,4 mg/ml de Colagenase IV (Sigma Aldrich) por 45 min a 37°C. As amostras foram então homogeneizadas usando uma seringa com uma agulha de calibre

18 e filtradas através de um filtro celular de 70 µm.

[0106]**Citometria de fluxo.** Análise citométrica de fluxo foi realizada seguindo métodos padronizados, revisados em (Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K. e Roederer, M. "Seventeen-Colour Flux Cytometry: Unravelling the Immune System". *Nat. Rev. Immunol.* 4, 648-655 (2004)). Para todas as concentrações ótimas de anticorpos conjugados a fluoróculo foram determinadas usando experimentos de titulação. Clones de anticorpo específico para CD4 de camundongo (GK1.5), CD8 (53-6.7), CD3 (17A2), CD45 (30F11), CD45.1 (A20), CD45.1 (104), CD44 (IM7), CD62L (MEL-14), CD69 (H1.2F3), MHC classe I H2-D^d (34-2-12) e H2-D^b (KH95), GM-CSF (MP1-22E9), IFN γ (TC11-18H10), IL-17A (XMG1.2) e FoxP3 (FJK-16s) foram obtidos de BD, BioLegend ou eBioscience. Para coloração de superfície, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos por 20-30 minutos a 4°C. Para todos os experimentos, as células mortas foram excluídas da análise usando um reagente de coloração fixável Aqua ou *Near-IR Live/Dead* (Invitrogen/BioLegend); dupletos foram excluídos por separação por FSC-Área vs. FSC-Altura. Para coloração de citocina intracelular, células T foram incubadas por 4-5 horas a 37°C em RPMI contendo FCS 10% com PMA (50 ng/ml), Ionomicina (500 ng/ml) e GolgiPlug (contendo Brefeldina A, BD, diluição de 1:1.000). Após coloração de superfície, Cytofix/Cytoperm (BD) foi usado de acordo com as instruções do fabricante, e tampão Perm/Wash foi preparado internamente (PBS contendo Saponina 0,5% e BSA 5%). Para coloração intracelular, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos por 20-30 minutos a 4°C. Para coloração intranuclear com FoxP3, tampão de Fixação/Permeabilização

(eBioscience) foi usado após coloração de superfície, seguido pelo tampão Perm/Wash preparado internamente. Em geral, as células foram separadas com base em FSC-Área e SSC-Área para excluir restos celulares, os dupletos foram excluídos por separação por FSC-Área vs. FSC-Altura. As células mortas foram excluídas da análise usando um reagente de coloração fixável Aqua ou *Near-IR Live/Dead* (Invitrogen/BioLegend). Quando aplicável, células CD45.1 foram separadas antes da separação em células T CD4 ou CD8. Todos os marcadores usados para separação (CD4, CD8, CD3, CD44, CD62L, CD69) exibem uma separação nítida da população negativa e positiva. Para o ensaio de morte células, os singletos foram separados como descrito acima, e depois as células tumorais foram identificadas por Cell Trace Violet e um histograma que mostra a captação de TOPRO-3 foi gerado. A análise citométrica de fluxo foi realizada usando um FACSCanto II (BD) ou um LSR II Fortessa (produto de pesquisa de ordem especial, BD e equipado com linhas de laser de 405 nm, 488 nm, 561 nm e 640 nm) com o Software FACS Diva. A análise de dados foi realizada usando FlowJo 10.0.x (Treestar).

Análise citométrica de fluxo de fosforilação de STAT5

[0107]Suspensões de célula única da medula óssea foram coradas na superfície por 20 minutos, e depois meio contendo GM-CSF (20 ng/ml) foi adicionado às amostras. As células foram incubadas a 37°C por 30 minutos para induzir fosforilação de STAT5 antes da adição de solução de PFA 4% (pH 7,4) até uma concentração final de 2%. As células foram fixadas por 20 minutos, lavadas e ressuspensas em 1 ml de metanol a 4°C. Após 40 minutos, as células foram lavadas

duas vezes e ressuspensas em 45 µl de tampão de FACS. Cinco µl de APC anti-pSTAT5 (BD Biosciences) foram adicionados para fazer uma proporção de coloração final de 1:10. As células foram incubadas por 45 minutos a 4°C antes de uma etapa de lavagem final e aquisição. A análise citométrica de fluxo foi realizada usando um LSR II Fortessa (produto de pesquisa de ordem especial, BD e equipado com linhas de laser de 405 nm, 488 nm, 561 nm e 640 nm) com o Software FACS Diva. A análise de dados foi realizada usando FlowJo 10.0.x (Treestar).

Análise fenotípica de PBMCs humanas por citometria de fluxo

[0108]PBMCs criopreservadas foram armazenadas em nitrogênio líquido até descongelamento em um banho-maria a 37°C. As células foram ressuspensas gentilmente em 1 ml de meio de cultura de células pré-aquecido (CCM; RPMI-1640 [PAN Biotech], FCS 10% [Biochrom]), 1x L-glutamina, e 1x penicilina/estreptomicina [ambos Life Technologies]) suplementado com benzonase 1:10.000 (Invitrogen). As células foram a seguir transferidas para tubos de 5 ml e lavadas com CCM. As células foram contadas e ajustadas até 20×10^6 células/ml em CCM. Para determinar a produção de citocina por citometria de fluxo, as células foram estimuladas com 50 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) e 1 µg/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich) na presença de GolgiPlug (contendo Brefeldina A, BD, diluição de 1:1.000) e GolgiStop (contendo Monensina, BD, diluição de 1:1.000) por 4 h a 37°C. A ligação não específica foi bloqueada usando Human TruStain FcX (Biolegend).

[0109]**Reação mista de linfócitos (MLR):** Células T responsivas C57BL/6 WT, *Csf2*^{-/-}, *Ifng*^{-/-} ou *Il17a*^{-/-} foram

cocultivadas com DCs de camundongos BALB/c (alogênicos) ou C57BL/6 (singênicos). Alternativamente, células T responsivas BALB/c WT foram cocultivadas com DCs de camundongos BALB/c WT (singênicos) ou C57BL/6 e *Csf2rb*^{-/-} DCs (alogênico). As células T e DCs foram purificadas de esplenócitos por seleção positiva com o uso de partículas magnéticas anti-CD4 e anti-CD8 (para células T) ou anti-CD11c (para DCs) (Miltenyi Biotec), respectivamente, e AutoMACS Pro. As células foram plaqueadas em triplicatas em placas de 96 poços com fundo em “U” em uma proporção de estimulador/responsivas de 1/10 (2×10^4 DCs, 2×10^5 células T) por 3 dias em meio RPMI 1640 completo a 37°C e CO₂ 5%. A seguir, os sobrenadantes da cultura foram coletados e substituídos por 3H-timidina diluída (1/100, 50 µCi) por 16 horas. As células foram coletadas usando uma colheitadeira de 96 poços (PerkinElmer) e a cintilação foi medida por um contador beta (1450 Microbeta Plus, Wallac).

[0110]**Ensaio de morte:** Células T do baço e linfonodo foram isoladas usando o “Pan T Cell Isolation Kit II”, camundongo (MACS Miltenyi Biotec). Células A20-Luciferase⁺GFP⁺ ou WEHI-3-Luciferase⁺ foram coradas com “CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit” (ThermoFisher Scientific, C34557). As células foram incubadas em uma proporção de efector/alvo de 1:1, 20:1 e 50:1 na presença de α-CD3 solúvel (1 µg/ml) e α-CD28 (0,5 µg/ml) em RPMI suplementado com FCS 10% por 24 h a 37°C em CO₂ 5%. Após remoção de meio, Topro (0,8 µM) foi adicionado às células e as células foram adquiridas em um citômetro de fluxo LSRII Fortessa (BD). Os dados foram analisados usando FlowJo Versão X (Tree Star). A percentagem de lise específica foi calculada

da seguinte forma: $[(\text{Lise experimental} - \text{lise espontânea}) / (\text{lise máxima} - \text{lise espontânea})] \times 100\%$.

Ensaio de supressão de Treg

[0111] Células T foram isoladas de linfonodos e baço de camundongos C57BL/6 WT e *Csf2*^{-/-}, como descrito anteriormente. Células T CD4 primeiro foram enriquecidas usando um kit de isolamento de CD4 ("MojoSort™ Mouse CD4 Nanobeads"), seguido por coloração com CD45, CD25, CD62L e CD4. As células CD4⁺CD25⁻CD62L⁺ (Tconv) e CD4⁺CD25^{high} (Treg) foram separadas por citometria de fluxo usando o classificador de células BD FACS ARIA II com uma pureza de 98-99%. As APCs foram irradiadas com >3.400 rads (4 min, 12,2 Gy/min, 225 kV, 17,7 mA) e diluídas até 4 x 10⁶/ml (ou 2 x 10⁶ células/ml) em meio de clone 10%. As APCs e células Tconv foram cocultivadas com células Treg autólogas em concentrações variáveis em uma placa de 96 poços de fundo redondo (4 x 10⁴ Tconv por poço). As células foram estimuladas com αCD3 em uma concentração de 1 µg/ml a 37°C por 2 dias e depois incubadas por 16 h com 3H-Timidina. As células foram coletadas usando FilterMate (PerkinElmer) e analisadas por contador beta com o programa Microbeta. A percentagem de supressão de Treg foi calculada entre células vivas como $[(\text{cpm Tconv} - \text{cpm Treg:Tconv}) / \text{cpm Tconv isoladamente}] \times 100$, cpm sendo as contagens por minuto, calculadas como % de supressão de células Tconv.

[0112] **Análise de citocinas:** Soro foi obtido de alo-camundongos receptores de HCT em tempos especificados. Os sobrenadantes da cultura de MLR foram coletados após 3 dias de cocultura. A medição de GM-CSF, IFN γ e IL-17A no soro ou sobrenadantes de cultura de células foi realizada por ELISA

específico para citocina de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences e Biolegend).

Parâmetros da função hepática

[0113]Enzimas hepáticas ((alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (AP)), albumina e nitrogênio ureico (BUN) foram medidas em soros de camundongos com o uso do “Piccolo Liver Panel Plus” (Abaxis).

[0114]**Histologia:** Para avaliação histopatológica, os órgãos foram fixados em HOPE (DCS, Hamburgo, Alemanha) e embebidos em parafina. Cortes de 3-5 µm foram feitos com um micrótomo (Micro HM 325, Thermo Scientific) e subsequentemente corados com hematoxilina e eosina. Para gerar as pontuações histológicas de GvHD, um sistema de pontuação semiquantitativo tecido-específico foi usado: para os parâmetros do intestino delgado, incluindo encurtamento de vilosidades, regeneração de cripta, apoptose de célula da cripta, destruição completa da cripta e infiltrados linfocíticos da lâmina própria, foram classificados com as seguintes pontuações: 0 = normais; 0,5 = focais e raros; 1 = focais e leves; 2 = difusos e leves; 3 = difusos e moderados; 4 = difusos e severos; adaptado de (Hill, G.R. e cols., “Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: the Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines”. *Blood* **90**, 3.204-3.213 (1997)). Para a pele, os seguintes parâmetros foram classificados: número estimado de folículos pilosos: 0 = normal (dispostos relativamente próximos), 0,5 = número ligeiramente reduzido (normalmente focalmente); número estimado de glândulas sebáceas: 0 = normal (células relativamente grandes, grupos pequenos, no nível de pelos do pescoço), 1,0 = ligeiramente

reduzido (número e tamanho, normalmente focalmente), 2,0 = nitidamente reduzido (somente poucas células presentes); apoptose e degeneração de glândulas sebáceas: 0 = não presente, 0,5 = raras, 1 = pequeno número de glândulas envolvidas, 2 = número moderado de glândulas envolvidas; apoptose e degeneração de folículos pilosos: 0 = não presentes, 0,5 = raros, 1 = pequeno número de folículos envolvidos, 2 = número moderado de folículos envolvidos, 3 = número grande de folículos envolvidos; infiltração leucocítica (fora dos anexos): 0 = baixa, 1 = ligeiramente aumentada, 2 = moderadamente aumentada; infiltração leucocítica (de anexos): 0 = não presente, 1 = ligeira, 2 = moderada; epiderme (células apoptóticas, infiltração leucocítica): 0 = não presentes, 0,5 = raras, 1 = pequeno número, 2 = número moderado, 3 = número grande; gordura subcutânea: 0 = contínua, 1 = não contínua, 2 = ausente; adaptado de (Kaplan, D. H. e cols., "Target Antigens Determine Graft-Versus-Host Disease Phenotype". *J. Immunol.* **173**, 5.467-5.475 (2004)). Para os parâmetros do fígado, incluindo expansão e infiltrados do trato portal, infiltrados do ducto biliar, estratificação nuclear do ducto biliar, células picnóticas do ducto biliar, células intraepiteliais do ducto biliar, inflamação do endotélio vascular, necrose hepatocelular panlobular, corpos acidófilos, microabscessos, figuras mitóticas e esteatose hepatocelular foram classificados com as seguintes pontuações: 0 = normais; 0,5 = focais e raros; 1 = focais e leves; 2 = difusos e leves; 3 = difusos e moderados; 4 = difusos e severos; adaptado de (Hill, G.R. e cols. "Interleukin-11 Promotes T Cell Polarization and Prevents

Acute Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplantation". *J. Clin. Invest.* **102**, 115-123 (1998)). Todas as lâminas foram codificadas e lidas de forma cega em microscópio Olympus BX41TF.

[0115]**Indivíduos humanos:** Todas as amostras humanas foram coletadas após aprovação pelo comitê de ética da "Albert-Ludwigs University" Freiburg, Alemanha (Número do protocolo: 267/11) após autorização informada por escrito. As biópsias de tecido intestinal foram coletadas de forma prospectiva de indivíduos com GvHD ou controles saudáveis entre 2007 e 2014. A graduação de GvHD intestinal foi realizada por um patologista experiente com base na histopatologia de acordo com um sistema de estadiamento publicado (Lerner, K.G. e cols., "Histopathology of Graft-vs.-Host Reaction (GVHR) in Human Recipients of Marrow from HL-A-Matched Sibling Donors". *Transplant. Proc.* 6, 367-371 (1974)). Indivíduos de controle não exibiam nenhuma anormalidade na biópsia intestinal. As características dos pacientes, incluindo idade, sexo, diagnóstico subjacente do receptor, tipo de doador e enxerto, regime de condicionamento, regime imunossupressor e grau de GvHD são detalhados nas Tabelas Suplementares 1 e 3 para os pacientes com GvHD, e na Tabela Suplementar 2 para os indivíduos de controle.

[0116]**Imunoistoquímica:** Imunoistoquímica foi realizada em cortes de tecido fixados embebidos em parafina usando o kit de coloração para IHC em duas etapas "EnVision + System HRP DAKO" (Glostrup, Dinamarca) de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram submetidos à recuperação de antígeno mediada por aquecimento com "Dako Target Retrieval

Solution" (1x) por 10 min. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com o kit de bloqueio de peroxidase endógena DAKO por 30 min em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS + Soro de Cabra Normal 5% (NGS). A imunocoloração única consistiu em incubação de um dia para o outro a 4°C com o anticorpo mAb anti-GM-CSF humano não conjugado (clone 3209.1; R&D Systems) ou controle de isótipo de IgG para biópsias de indivíduos humanos e α -F4/80 de rato (clone CI: A3-1, BioRad) e α -p22phox de coelho (clone FL-195, Santa Cruz) para cortes de tecido de camundongo. DAB foi usado como o cromógeno. Os cortes foram então contracolorados com hematoxilina, montados com DPX e analisados com um microscópio óptico Olympus BX41 acoplado a uma câmera colorida Color Viwerlllu (Olympus) e o pacote de softwares Fiji/ImageJ (GNU General Public License).

Imunofluorescência

[0117] Os tecidos foram crio-seccionados (10 μ m de espessura) para imunoistoquímica usando um Cryostat Hyrax C60 (Zeiss) e armazenados a -80°C. Os cortes foram fixados em PFA 4%, lavados em PBS, e bloqueados com PBS suplementado com Triton X-100 0,1% e soro de cabra normal 4%. Subsequentemente, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-GM-CSF de rato (BD Pharmingen, clone BVD2-21C11, 1:50), α -CD3 de coelho (Novus, clone SP7, 1:200) e anticorpo anti-CD68 de camundongo (DAKO, clone EMB11, 1:50), diluídos em solução de bloqueio de um dia para o outro a 4°C. Os cortes foram então lavados em PBS e incubados com anticorpos secundários anti-rato de cabra marcado com AF647, anti-camundongo de cabra marcado com AF488 e anti-coelho de macaco marcado com AF555 (Life Technologies,

1:500) de um dia para o outro a 4°C ou em temperatura ambiente por 1 h. Os cortes foram montados com reagente SlowFade Gold Antifade com DAPI (Invitrogen). Fotomicrografias de fluorescência foram capturadas com um microscópio confocal de varredura a laser SP5 Leica (SP5; Leica, Heerbrug, Suíça) equipado com lasers de argônio e hélio usando a objetiva de 40x (imersão em óleo, NA1.25). As imagens foram processadas e mescladas pelo software de imageamento Imaris (Bitplane, Zurique, Suíça).

Ensaio TUNEL

[0118]Os cortes fixados em PFA 4% foram processados para o Ensaio TUNEL para detectar núcleos fragmentados no cólon. Um “ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit” foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as lâminas foram pré-tratadas com H₂O₂ e incubadas com a mistura de reação contendo TdT e dUTP conjugado à digoxigenina por 1 h a 37°C. DNA marcado foi visualizado com anticorpo secundário conjugado a AF488. Fotomicrografias de fluorescência foram capturadas com um microscópio confocal de varredura a laser SP5 Leica (SP5; Leica, Heerbrug, Suíça) equipado com lasers de argônio e hélio usando a objetiva de 40x (imersão em óleo, NA1.25). As imagens foram processadas e mescladas pelo imageamento software Imaris (Bitplane, Zurique, Suíça).

[0119]**Isolamento de RNA e rt-PCR quantitativa:** RNA foi isolado de cortes de tecido fixados embebidos em parafina usando o kit “RNeasy FFPE” (Qiagen, desparafinização usando xileno) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi estimada usando um espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA de

primeira fita, transcriptase reversa MLV (Invitrogen) foi usada de acordo com as instruções do fabricante. A expressão gênica foi medida por análise por PCR quantitativa em tempo real usando o sistema de detecção em tempo real CFX 384 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) com "SYBR Green Supermix" (Bio-Rad). As sequências para os iniciadores de PCR podem ser encontradas na tabela abaixo. A expressão do transcrito foi normalizada para o gene *GAPDH* constitutivo (*house-keeping*) e representado como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_{controle}$).

Gene	Sequência do iniciador (5' para 3')
<i>CSF2</i>	Direto: CAC TGC TGC TGA GAT GAA TGA AA (IDS. DE SEQ. N ^{os} : 1) Reverso: GTC TGT AGG CAG GTC GGC TC (IDS. DE SEQ. N ^{os} : 2)
<i>GAPDH</i>	Direto: GAA GGT GAA GGT CGG AGT CAA C (IDS. DE SEQ. N ^{os} : 3) Reverso: TGA TTT TGG AGG GAT CTC GCT C (IDS. DE SEQ. N ^{os} : 4)

Identificação automatizada de população em análise de dados de alta dimensão

[0120] Os dados adquiridos no analisador de células BD FACSymphony™ foram compensados, exportados em FlowJo Versão v10.4 (TreeStar), normalizados usando Cyt MATLAB (Versão 2017b) e análise imparcial foi realizada como descrito em (Nowicka e cols. *F1000Res* **6**, 748 (2017); Hartmann e cols., *J. Exp. Med.* **213**, 2.621-2.633 (2016)).

[0121] **Estatística:** Gráficos foram preparados com GraphPad Prism (GraphPad Software). Curvas de sobrevida foram tabuladas pelo método de Kaplan-Meier e, para comparação de curvas de sobrevida, foi usado um teste Log-Rank (Mantel-Cox). Os dados são exibidos como pontos de dados individuais ou como média +/- desvio-padrão (SD) ou erro-padrão da média (SEM), como retratado nas legendas da figura.

A comparação das médias foi realizada usando testes-T de *Student* não pareados, bicaudados (com correção de Welch quando aplicável) ou ANOVA de uma via e de duas vias com pós-teste de Bonferroni, respectivamente. Nenhum método estatístico foi usado para predeterminar o tamanho da amostra, mas nossos tamanhos de amostra foram similares àqueles geralmente empregados no campo. Nenhum método de randomização foi usado.

[0122]**Disponibilidade de dados:** Os conjuntos de dados gerados durante e/ou analisados durante o presente estudo estão disponíveis pelos autores correspondentes mediante solicitação razoável.

Exemplo 1:

Células T do doador infiltrantes no tecido produzem GM-CSF e IFN γ após HCT com MHC incompatível

[0123]Para compreender a contribuição de GM-CSF derivado de células T para a GvHD aguda, os inventores primeiro empregaram um modelo de HCT com MHC incompatível. Os inventores irradiaram letalmente camundongos BALB/c CD45.2⁺ do tipo selvagem (WT) (haplótipo de MHC H2d) e depois eles foram injetados por via intravenosa com células da medula óssea (BM) depletadas de células T (TCD) de camundongos C57BL/6 (B6) WT CD45.1 (haplótipo de MHC H2b), com ou sem esplenócitos B6 CD45.1⁺, que serviram como uma fonte de células T maduras. Os receptores de BM mais esplenócitos desenvolveram GvHD fatal entre os dias 3 e 6 após alo-HCT (Figura 1A), o que coincidiu com a reconstituição e expansão de células CD45.1⁺ doadoras no baço, fígado e pele (Figura 1B). Dentro do compartimento doador de CD45.1⁺, populações de células T continham

frequências elevadas de células produtoras de GM-CSF e IFN γ , observadas primeiro no fígado (Figura 10) e baço (Figura 1D) a partir do dia 3 após alo-HCT, e depois na pele a partir do dia 6 (Figura 1D). IL-17A mal era detectável nessas populações (Figuras 1C, 1D). Consequentemente, os inventores encontraram quantidades significativamente maiores de GM-CSF e IFN γ em soros de camundongos que recebem BM mais esplenócitos, comparado com BM isoladamente (Figura 1E). Os inventores confirmaram a produção de GM-CSF e IFN γ durante a resposta alogênica *in vitro* usando reações mistas de linfócitos alogênicos (MLR) (Figura 1F). Além disso, células T wt, *Csf2*^{-/-}, *Il17a*^{-/-} e *Ifng*^{-/-} proliferaram igualmente após cocultura com DCs alogênicas, excluindo, *a priori*, diferenças no potencial proliferativo dessas células (Figura 1G). Tomados em conjunto, GM-CSF e IFN γ , mas não IL-17A, são produzidos por células T que infiltram órgãos-alvos durante GvHD.

Exemplo 2:

Produção de GM-CSF por células T alogênicas é essencial para a patologia da GvHD

[0124]Considerando a produção de GM-CSF e IFN γ por células T_H alo-reativas, os inventores avaliaram a relevância dessas citocinas na determinação da severidade da GvHD aguda. Como acima, os inventores irradiaram letalmente camundongos BALB/c WT e depois compararam os desfechos da injeção de células da BM-TCD de camundongos B6 WT, com ou sem esplenócitos de camundongos B6 WT, ou de camundongos B6 sem GM-CSF (*Csf2*^{-/-}), IFN γ (*Ifng*^{-/-}) ou IL-17 (*Il17a*^{-/-}). Camundongos que recebem BM mais esplenócitos *Csf2*^{-/-} foram protegidos de GvHD letal até 20 dias pós-alo-HCT, enquanto

todos os camundongos tratados com BM mais esplenócitos WT morreram por volta do dia 15 após HCT (Figura 2A). A injeção de camundongos com BM mais esplenócitos *Ifng*^{-/-} ou *Il17a*^{-/-} também afetou significativamente a cinética da GvHD fatal, mas ainda quase 100% desses camundongos morreram por volta do dia 20 (Figura 2A).

[0125] Como preparações de esplenócitos de doador contêm vários tipos diferentes de células imunes, os inventores então questionaram se as células T eram realmente a fonte biologicamente significativa de GM-CSF em nosso modelo de GvHD. Os inventores injetaram receptores BALB/c letalmente irradiados com células da BM-TCD de doadores B6 WT, com ou sem células T purificadas isoladas de baços de camundongos B6 WT ou *Csf2*^{-/-}; essa abordagem confirmou que camundongos que recebem células T *Csf2*^{-/-} eram completamente protegidos de GvHD letal até 70 dias pós-alo-HCT, em contraste nítido com aqueles que recebem células T WT (Figura 2B). Não houve evidência de que esses efeito protetor se relacionasse com diferenças inatas entre células T esplênicas de camundongos WT e *Csf2*^{-/-}, na medida em que as duas populações exibiam composição (Figura 6A), estado de ativação (Figura 6B), habilidade para infiltrar órgãos-alvos de GvHD após HCT (Figura 6C), frequências de células T ativadas (CD44^{high}) no baço ou linfonodos periféricos (LN) (Figura 6D), frequências de células T reguladoras (T_{regs}) e produção de granzima (dados não mostrados) ou sua habilidade para produzir citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IFN γ , TNF α ou IL-17a, comparáveis. Os inventores então examinaram a contribuição relativa de GM-CSF de células T CD4 e CD8 para a patologia da GvHD. Para essa finalidade, os inventores realizaram um

experimento de entrecruzamento ("criss-cross") com o uso de 4 combinações: células T WT CD4 + células T WT CD8, células T WT CD4 + células T CD8 *Csf2*^{-/-}, células T CD4 *Csf2*^{-/-} + células T WT CD8 e células T CD4 *Csf2*^{-/-} + células T CD8 *Csf2*^{-/-}. Somente as combinações nas quais GM-CSF estava ausente das células T CD4 conferiram proteção contra GvHD letal (Figura 2K), dando suporte à noção de que células T_H alo-reativas são uma fonte proeminente de GM-CSF na patogênese da GvHD. Dessa forma, os inventores concluíram que GM-CSF derivado de células T é responsável pelo desencadeamento de GvHD letal após HCT com MHC incompatível.

[0126]A vantagem de sobrevida conferida por alo-HCT de células T desprovidas de GM-CSF também era evidente no nível de tecidos-alvo de GvHD individuais. A análise histopatológica em 6 dias pós-alo-HCT revelou que a transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} causou dano tecidual significativamente menor na pele e intestino delgado, comparada com a transferência de esplenócitos WT (Figura 2C, 2D). Em mais detalhe, a pele de camundongos que recebem células *Csf2*^{-/-} mostrou uma diminuição na apoptose celular e infiltração celular em torno e dentro de folículos pilosos e epiderme, enquanto o intestino delgado mostrou uma diminuição na destruição completa da cripta (Figura 2D). Os inventores ainda relatam aqui patologia colônica reduzida mediante transferência de células *Csf2*^{-/-}, como retratado por comprimento aumentado do cólon e um índice apoptótico diminuído (Figura 2H, 2I). Além disso, uma pesquisa para sinais subclínicos de disfunção hepática mostrou níveis séricos diminuídos de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (AP) e nitrogênio ureico (BUN) em

camundongos transferidos com esplenócitos *Csf2*^{-/-}, em comparação com as contrapartes WT (Figura 2G). Além disso, os níveis sistêmicos de níveis séricos de TNF α estavam diminuídos na ausência de GM-CSF, enquanto as quantidades de IL-6 não se alteravam (dados não mostrados).

[0127]Na medida em que uma espécie reativa ao oxigênio (ROS) foi implicada na lesão tecidual da GvHD, os inventores questionaram se esse dano tecidual diminuído estava associado com níveis menores de produção de ROS. Os inventores verificaram que cortes de fígado e intestino delgado de camundongos 6 dias pós-transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} continham significativamente menos células que expressam p22phox, um componente crítico do maquinário de produção de ROS de fagócitos, do que os cortes de camundongos que recebem esplenócitos WT (Figura 2E, 2F).

[0128]Para confirmar ainda mais o papel funcional de GM-CSF na GvHD, os inventores trataram camundongos receptores com anticorpos anti-GM-CSF antes de HCT com MHC incompatível de camundongos BALB/c com TCD B6 WT-BM isoladamente, ou com BM mais esplenócitos WT. O bloqueio sistêmico da ação de GM-CSF replicou com sucesso a vantagem de sobrevida de transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} nesses camundongos (Figura 2G).

[0129]Enquanto modelos murídeos de HCT com MHC totalmente incompatível são informativos, os inventores a seguir questionaram se o papel de GM-CSF na patologia da GvHD era conservado no cenário mais clinicamente relevante de um modelo haplo-incompatível de GvHD aguda. Os inventores combinaram TCD B6 WT-BM com esplenócitos WT, *Csf2*^{-/-} ou *Ifng*^{-/-} e transferiram as células em camundongos B6D2F1 letalmente

irradiados, que são um cruzamento entre camundongos B6 e DBA e de modo a abrigar o haplótipo de MHC H2b/d. Também aqui, a transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} conferiu uma vantagem de sobrevida significativa, comparados com camundongos que receberam esplenócitos WT, protegendo os camundongos de GvHD fatal até um nível quase comparável que TCD-BM isoladamente (Figura 3A), que foi novamente replicada mediante a transferência de células T esplênicas *Csf2*^{-/-} purificadas (Figura 3B). Tanto nos experimentos de transferência de esplenócitos quanto de células T, os inventores também observaram um aumento acentuado na mortalidade após transferência de células *Ifng*^{-/-} (Figura 3A, 3B), o que é consistente com a função imunorreguladora, protetora, conhecida, dessa citocina na GvHD. Em dia 9 após HCT, a pele era o órgão mais afetado com as maiores pontuações histológicas; aqui, os inventores observaram menos dano tecidual em camundongos que recebem *Csf2*^{-/-}, comparado com esplenócitos WT, e mais dano tecidual em receptores de esplenócitos *Ifng*^{-/-} (Figura 3C, 3D). Isso coincidiu com alterações nos números de glândulas sebáceas, organização tecidual e infiltrados celulares em torno e dentro de folículos pilosos e epiderme (Figura 3D). Em um estágio posterior (28 dias) após alo-HCT, a transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} também levou a uma patologia hepática diminuída (Figura 3H) caracterizada por alterações nos infiltrados do trato portal e desorganização do ducto biliar. Nesse modelo de incompatibilidade parcial, a pele foi o órgão mais afetado com as maiores pontuações de GvHD; aqui, os inventores observaram significativamente menos dano tecidual em camundongos que recebem *Csf2*^{-/-}, comparado com

esplenócitos WT, e significativamente mais dano tecidual em receptores de esplenócitos *Ifng*^{-/-} (Figura 3C, 3D). No nível celular, os inventores também observaram sinais de GvHD reduzidos no fígado e intestino delgado de camundongos que recebem células *Csf2*^{-/-}, que tinham significativamente menos células p22phox⁺, acompanhados por infiltração diminuída de células mieloides F4/80⁺ (Figura 3E, 3F). Considerando o papel protetor para GvHD de IFN γ observado nesses camundongos, os inventores a seguir questionaram se a ausência de GM-CSF estava relacionada com níveis dessa citocina: dez dias após HCT haplo-incompatível, os inventores encontraram níveis significativamente maiores de IFN γ em camundongos que receberam esplenócitos *Csf2*^{-/-}, comparados com esplenócitos WT (Figura 3G). Curiosamente, os inventores também revelaram evidências de GM-CSF aumentado em soros de camundongos que recebem esplenócitos *Ifng*^{-/-} (Figura 3G), sugerindo que GM-CSF pode adicionalmente estar mediando GvHD aumentada induzida pela ausência de IFN γ .

[0130]Em conjunto, concluímos que GM-CSF derivado de células T possui um papel vital no desenvolvimento da imunopatologia de GvHD em dois modelos murídeos de alo-HCT.

Exemplo 3:

GM-CSF medeia a letalidade de GvHD por meio de células mieloides derivadas de doador

[0131]Após condicionamento letal, células apresentadoras de antígeno radiosensíveis do hospedeiro (APCs) são perdidas dentro dos primeiros dias após HCT e substituídas por APCs do doador. Enquanto as APCs do hospedeiro são necessárias para a fase de sensibilização da GvHD, APCs do doador participam bem menos na indução da

doença, mas podem estar envolvidas na perpetuação de lesão tecidual. Para delinear se os tipos de células patologicamente relevantes responsivas ao GM-CSF são originários do doador ou do hospedeiro, os inventores usaram camundongos *Csf2rb*^{-/-} desprovidos da subunidade beta do GM-CSFR como doadores ou hospedeiros de HCT. A deficiência de GM-CSFR no compartimento receptor não influenciou a sobrevida de GvHD (Figura 9A). Em contraste, a transferência de BM de camundongos *Csf2rb*^{-/-} resultou em mortalidade dramaticamente retardada (Figura 9B), fenocópia da transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} (Figura 2A). Os inventores usaram redução da dimensionalidade não linear não supervisionada (t-SNE) para identificar e visualizar as células que respondem ao GM-CSF dentro do enxerto do doador. Com essa abordagem, os inventores verificaram que monócitos e neutrófilos eram particularmente sensíveis ao GM-CSF, que eles avaliaram por análise de célula única de STAT5 fosforilado, o fator de transcrição a jusante do complexo receptor de GM-CSF. Camundongos *Csf2rb*^{-/-} foram usados como uma fonte de células não responsivas ao GM-CSF (Figura 9C, 9D). Tendo confirmado que as células que respondem ao GM-CSF estão limitadas ao compartimento mieloide, os inventores realizaram uma caracterização detalhada de subconjuntos de células mieloides encontrados nos órgãos-alvos inflamados 5 dias após alo-HCT. A transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} resultou em frequências diminuídas de vários subconjuntos mieloides, incluindo células dendríticas (DCs), neutrófilos, monócitos e células derivadas de monócitos (MDCs) (Figura 9E, 9F). Uma diminuição em neutrófilos e monócito/MDCs também foi encontrada em órgãos-alvos mediante tratamento anti-GM-

CSF, enquanto os números sistêmicos desses subconjuntos mieloides permaneceram inalterados. Os inventores observaram que monócitos/MDCs do doador produziram menos IL-1 β na ausência de GM-CSF (Figura 9G). De forma importante, IL-1 β é uma citocina de assinatura do programa patogênico provocado por GM-CSF e demonstrou que tem um papel crucial no desenvolvimento da GvHD. Os inventores também investigaram a expressão de ROS por células mieloides do doador após alo-HCT, considerando seus níveis baixos em cortes de tecido de camundongos que recebem células T *Csf2*^{-/-} alogênicas e seu papel relatado na condução do dano tecidual. Os inventores verificaram que a transferência de esplenócitos *Csf2*^{-/-} levou a uma produção diminuída de ROS tanto pelos subconjuntos de monócitos/MDCs quanto de neutrófilos (Figura 9H). Coletivamente, esses achados demonstram que células mieloides derivadas de doador licenciadas com GM-CSF são cruciais para a patologia da GvHD.

Exemplo 4:

GvL eficiente é retido na ausência de GM-CSF

[0132]As respostas imunes que levam ao dano tecidual na GvHD e à eliminação do tumor na GvL são amplamente consideradas como sendo mediadas por meio do mesmo mecanismo. Como o GM-CSF derivado de células T do doador era essencial para GvHD letal, os inventores investigaram se ele também mediava GvL no modelo de HCT com MHC incompatível. Para testar isso, os inventores injetaram por via intravenosa células de linfoma de célula B A20 (de origem de BALB/c) que co-expressam GFP e luciferase (A20-GFP-Luc) em receptores BALB/c letalmente irradiados, juntamente com células B6 WT da BM-TCD isoladamente ou com células T B6 purificadas

esplênicas WT ou *Csf2*^{-/-}. O crescimento tumoral foi monitorado por imageamento bioluminescente (BLI). Quando as células A20 foram infundidas com TCD-BM isoladamente, todos os receptores morreram do crescimento do tumor dentro de 35 dias (Figuras 4A-4C), consistente com um papel crucial para células T no efeito GvL. Consequentemente, a adição de células T WT ou *Csf2*^{-/-} para a transferência da BM resultou em controle eficiente do crescimento tumoral (Figuras 4A-4C), embora somente camundongos que recebem células T *Csf2*^{-/-} tenham mostrado um aumento significativo na sobrevivência (Figura 4C). Enquanto camundongos com linfoma que recebem TCD-BM mais células T WT morreram principalmente de GVHD severa, camundongos que recebem TCD-BM mais células T *Csf2*^{-/-} exibiram um efeito GvL não diminuído, mas foram, ao mesmo tempo, protegidos de GVHD (Figura 4C, 4D). Esse aumento da sobrevivência em camundongos que recebem células T *Csf2*^{-/-} também foi observado em um modelo de GvL alternativo que utiliza a linhagem de células monomielocítica WEHI-3. Além disso, quando os inventores aumentaram o número de células de linfoma A20 inoculadas, células T *Csf2*^{-/-} executaram GvL ainda mais eficientemente do que células T WT, levando a um aumento significativo na sobrevivência global. Consistentemente, células T *Csf2*^{-/-} e WT isoladas de camundongos *naïve* ou que recebem alo-HCT foram igualmente capazes de matar células de linfoma A20 e WEHI-3 *ex vivo*, expandiram igualmente no baço e LN e exibiram frequências similares de células ativadas (CD44^{high}), proliferativas (Ki67⁺) e produtoras de granzima B. Para testar a traduzibilidade dos achados em um cenário clínico, os inventores usaram mAbs neutralizantes contra GM-CSF. Notavelmente, camundongos leucêmicos tratados com anti-

GM-CSF que recebem TCD-BM mais células T mostraram um efeito GvL potente e tiveram sobrevida significativamente melhor do que os camundongos de controle de isótipo tratados (Figuras 4E-4H). Sobrevida maior estava associada com incidência reduzida de GvHD (Figura 4H). Notavelmente, a neutralização de GM-CSF não teve qualquer impacto sobre o crescimento tumoral em camundongos que não passaram por HCT.

[0133]Os inventores compararam a causa de morte (tumor ou GvHD) através dos diferentes grupos: Camundongos com linfoma que não passaram por HCT alcançaram os critérios retirada e precisaram ser sacrificados. Camundongos com linfoma que recebem TCD-BM mais células T WT exibiram progressão retardada do tumor, mas, ao contrário, morreram de GVHD severa, enquanto camundongos que recebem TCD-BM mais células T *Csf2*^{-/-} exibiram um forte efeito GvL, e foram protegidos de GvHD (Figura 4d). Consistente com esses dados, células T *Csf2*^{-/-} e WT foram igualmente capazes de matar células de linfoma A20 *ex vivo* (Figuras 7A, 7B). Para testar a traduzibilidade de nossos achados em um cenário clínico, os inventores usaram mAbs neutralizantes contra GM-CSF. Notavelmente, camundongos leucêmicos tratados com anti-GM-CSF que recebem TCD-BM mais células T mostraram um efeito GvL potente e tiveram sobrevida significativamente melhor do que os camundongos de controle de isótipo tratados (Figuras 4E-4H). A sobrevida maior estava associada com incidência reduzida de GvHD (Figura 4H). Notavelmente, a neutralização de GM-CSF não teve qualquer impacto sobre o crescimento tumoral em camundongos que não passaram por HCT.

[0134]Notavelmente, camundongos que recebem alo-HCT de doadores *Csfrb2*^{-/-} mostraram um aumento significativo na

sobrevida, comparados com doadores WT (Figuras 8A e 8B), demonstrando que a neutralização do receptor de GM-CSF é eficiente no alívio de GvHD.

[0135] Dessa forma, na ausência de GM-CSF, células T do doador são mediadores eficazes da resposta terapêutica de GvL em camundongos, sem indução de GvHD letal, até mesmo em um contexto altamente imunogênico de um alo-HCT com MHC incompatível.

Exemplo 5:

GM-CSF está elevado em biópsias de GvHD humanas

[0136] Os inventores então questionaram se havia evidências de que GM-CSF desempenha um papel paralelo na GvHD em receptores de HCT humanos. Os inventores avaliaram a expressão do gene e a abundância de proteína de GM-CSF em biópsias gastrintestinais de pacientes com graus diferente de GvHD documentada clinicamente após HCT para uma variedades de condições diferentes (Tabelas 1-3). No nível transcricional, os inventores detectaram expressão significativamente maior de GM-CSF em biópsias gastrintestinais de pacientes com GvHD de grau IV comparada com de grau I (Figura 5A). Além disso, em amostras de pacientes com GvHD de grau IV, os inventores observaram forte imunorreatividade para GM-CSF no compartimento estromal; embora os inventores não tenham detectado GM-CSF em biópsias de pacientes sem GvHD (Figura 5b). Em conjunto, esses resultados indicam uma correlação entre GM-CSF e a presença de GvHD severa após alo-HCT em pacientes humanos.

Discussão:

[0137] Embora haja uma grande quantidade de literatura que discuta contribuições potenciais de diferentes

subconjuntos de células T_H e suas citocinas assinatura para a GvHD, os mecanismos subjacentes à inflamação e subsequente destruição tecidual não são totalmente compreendidos. Além disso, a plasticidade do comprometimento da linhagem de células T_H , bem como a manipulação *in vitro* de células T polarizadas transferidas, limitam a interpretação desses resultados. Aqui, revelamos que GM-CSF desempenha um papel previamente não percebido na condução de GvHD letal em camundongos, e está similarmente elevado em pacientes humanos de alo-HCT com GvHD severa. Além disso, GM-CSF parece ser dispensável para o efeito terapêutico de GvL e, portanto, pode representar um novo alvo terapêutico promissor na prevenção e tratamento da GvHD. Nossos achados também excluem a participação de IL-17A derivada de células T na GvHD aguda, mas demonstram um efeito protetor de $IFN\gamma$.

[0138]GM-CSF foi implicado em vários distúrbios patológicos inflamatórios, e possui efeitos pró-inflamatórios potentes em células mieloides. Aqui, os inventores usaram dois modelos murídeos diferentes de GvHD aguda para mostrar que GM-CSF derivado de células T do doador medeia diretamente GvHD severa, que está associada com infiltração abundante de células mieloides e coloração tecidual aumentada para componentes do maquinário de produção de ROS, que é classicamente usado por fagócitos para a defesa do hospedeiro contra patógenos. Os mesmos mecanismos são nitidamente prejudiciais na imunopatologia da GvHD, na qual o dano tecidual e a infiltração de leucócitos andam de mãos dadas. A redução do estresse oxidativo de condução mielóide em órgãos suscetíveis à GvHD aqui observada em animais que recebem células T *Csf2*^{-/-} alo-reativas dão

suporte a essa noção. O papel crucial de GM-CSF na inflamação intestinal crônica, e as quantidades elevadas de GM-CSF encontradas em biópsias gastrintestinais de pacientes com GvHD sugerem que a modulação da quantidade dessa citocina nesse órgão em particular poderia ser altamente benéfica para prevenção e/ou tratamento da GvHD.

[0139]Os inventores também revelaram evidências de uma regulação recíproca potencial de GM-CSF e $\text{IFN}\gamma$ durante GvHD em camundongos. Foi demonstrado previamente que $\text{IFN}\gamma$ produzido por células T ativadas do doador promove e protege contra GvHD; aqui, foi verificado que camundongos submetidos a HCT com MHC parcialmente incompatível com esplenócitos deficientes em $\text{IFN}\gamma$ eram significativamente mais suscetíveis à GvHD letal do que aqueles que recebem esplenócitos WT. Curiosamente, esses camundongos exibiram níveis elevados de GM-CSF sérico, enquanto camundongos que recebem esplenócitos deficientes em GM-CSF exibiram $\text{IFN}\gamma$ elevado em seus soros. A habilidade de $\text{IFN}\gamma$ para regular negativamente GM-CSF em células T_H efetoras foi relatada previamente; no entanto, GM-CSF não afeta diretamente células T, que não expressam o complexo receptor e, dessa forma, os mecanismos pelos quais GM-CSF influencia a produção de $\text{IFN}\gamma$ precisarão de investigação adicional.

[0140]Havia uma suposição antiga de que GvHD dirigida por células T do doador e o efeito terapêutico de GvL são mediados pelos mesmos mecanismos: os dados apresentados nesse relatório descritivo contradizem essa afirmativa. O tratamento de camundongos com anticorpos de bloqueio de GM-CSF antes de alo-HCT protegeu significativamente do desenvolvimento de GvHD letal aguda; enquanto camundongos

com tumor tratados com anti-GM-CSF se beneficiaram do controle eficaz do crescimento tumoral e proteção de GvHD. Dessa forma, GM-CSF não controla a morte mediada por células T de células linfo-hematopoiéticas malignas; ao invés disso, os inventores propõem, sem se prender a uma teoria, que na GvHD, GM-CSF atua como um canal de comunicação entre células T patogênicas e células mieloides, propondo as últimas como a causa da destruição tecidual. Embora GvL provavelmente se baseie em citotoxicidade direta por células T, as respostas dirigidas por GM-CSF de células mieloides podem ser mais relevantes para a patologia da GvHD representando, dessa forma, um mecanismo potencial para separar o efeito GvL da GvHD.

[0141]O papel patológico de GM-CSF em distúrbios autoimunes e inflamatórios levou ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais para visar a via de GM-CSF em doenças humanas. Considerando os efeitos benéficos aqui observados da neutralização de GM-CSF na GvHD experimental, é evidente que o bloqueio de GM-CSF em pacientes de alo-HCT irá melhorar o desfecho clínico. O aumento acentuado nos níveis observado dessa citocina em tecidos de pacientes afetados por GvHD severa dá ainda mais suporte a essa ideia. No entanto, na medida em que GM-CSF é crucial para homeostasia de tensoativos e defesa pulmonar do hospedeiro, será importante monitorar intimamente parâmetros de doença pulmonar quando se bloqueia GM-CSF no cenário clínico. Há evidências em camundongos de que GM-CSF contribui criticamente para respostas imunes mediadas por IL-23, e que a terapia anti-IL-23p19 pode melhorar a colite associada à GvHD singênica. Dessa forma, o bloqueio direto de GM-CSF pode fornecer um

complemento valioso para quaisquer experimentos clínicos direcionados à IL-23. O fato de que a ausência de GM-CSF pode interromper o desenvolvimento de GvHD sem prejudicar a resposta GvL facilita a testagem dessa estratégia terapêutica para a prevenção e tratamento de GvHD após alo-HCT em experimentos clínicos. Além disso, o fato de que GM-CSF estava elevada em amostras de paciente com as manifestações mais severas de GvHD significa que essa estratégia terapêutica é particularmente promissora para grupos de pacientes com o pior desfecho e o maior risco de fatalidade.

Tabela 1. Características clínico-patológicas de pacientes com GvHD - conjunto I.

Número do paciente	Sexo	Idade	Doença	Tipo do doador	Tipo de enxerto	Condicionamento	Imunossup.	Grau de GvHD
1	Masculino	44	CVID	MRD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath	3
2	Masculino	57	SAML	MMURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath/MMF	4
3	Feminino	21	T-ALL	MURD	PBSC	TBI/VP16	CyA/Campath	4
4	Masculino	69	SAML	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath	4
5	Masculino	6	MDS	MURD	BM	TT/FLU/ATG	CyA/MTX	3

CVID: imunodeficiência variável comum; SAML: leucemia mieloide aguda secundária; T-ALL: leucemia linfóide aguda de célula T; MDS: síndrome mielodisplásica; MRD: doador relacionado compatível; MMURD: doador não relacionado não compatível; MURD: doador não relacionado compatível; PBSC: células-tronco do sangue periférico; BM: medula óssea; FLU: fludarabina; BCNU: biscloroetilnitrosourea; MEL: melfalan; TBI: irradiação corporal total; VP16: etoposida; TT: tiotepa; ATG: globulina antitimócito; CyA: ciclosporina A; MMF: micofenolato mofetil; MTX: metotrexato.

Tabela 2. Características de indivíduos de controle.

Número do paciente	Sexo	Idade	Biópsia
1	Masculino	59	Sem achados patológicos

2	Masculino	60	Sem achados patológicos
3	Masculino	46	Sem achados patológicos

Tabela 3. Características clínico-patológicas de pacientes com GvHD - conjunto II.

Número do paciente	Sexo	Idade	Doença	Tipo do doador	Tipo de enxerto	Condição-namento	Imunossupressão	Grau de GvHD
1	Masc.	70	AML	MMURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, Campath	4
2	Masc.	45	AML	MRD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, MTX	4
3	Masc.	51	Linfoma de célula do manto	MMURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, Campath	4
4	Masc.	29	Hodgkin morbus	Irmãos haplo-identificos	PBSC	FLU/MEL/TREOS	MMF/Ciclofosfamida/ Everolimus	4
5	Masc.	43	B-ALL	MURD	PBSC	TBINP-16	CyA, MTX, ATG	4
6	Masc.	54	CVID	MRD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath	3
7	Fem.	60	MDS-RAEB II	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath	3
8	Fem.	61	AML	MMURD	PBSC	FLU/TT	CyA/Campath	3
9	Fem.	59	T-NHL	MMURD	PBSC	FLU/TT	CyA/Campath	3
10	Masc.	76	Leucemia eritroide aguda	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/ATG/MMF	3
11	Fem.	47	AML	MURD	PBSC	FLU/BU/TT	CyA/MMF/ATG	3
12	Masc.	52	AML	MURD	PBSC	BU/CY	CyA/Campath	1
13	Masc.	76	MDS-RAEB	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath	1
14	Fem.	58	AML	MMURD	PBSC	FLU/TT	CyA/MMF/ATG	1
15	Fem.	48	AML	MMURD	PBSC	BU/CY	CyA/MTX/MMF/ATG	1
16	Fem.	71	SAML/MPN	MMURD	PBSC	FLU/TT/MEL	CyA/MMF/ATG	1
17	Fem.	59	MM	MRD	PBSC	FLU/BU/TT	CyA/MMF	1

AML: leucemia mieloide aguda; B-ALL: B célula-leucemia linfoide aguda; LVID: imunodeficiência variável comum, MDS: síndrome mielodisplásica; RAEB: anemia refratária com blastos em excesso; T-NHL: linfoma não-Hodgkin de célula T; SAML: leucemia mieloide aguda secundária; MPN: neoplasias mieloproliferativas; MM: mieloma múltiplo; MMURD: doador não relacionado não compatível; MRD: doador relacionado compatível; MURD: doador não relacionado compatível; PBSC: células-tronco do sangue periférico; FLU: fludarabina; BCNU: biscloroetilnitrosourea; MEL: melfalan; TREOS: treossulfan;

TBI: irradiação corporal total; VP16: etoposida; TT: tiotepa; BU: bussulfan; CY: ciclofosfamida; CyA: ciclosporina A; MTX: metotrexato; MMF: micofenolato mofetil; ATG: globulina antitímócito.

Tabela 4. Sistema de pontuação de GvHD para camundongos alo-HCT.

Crítérios de GvHD	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Perda de peso	< 10%	10 – 20%	20 – 25%	> 25%
Postura	Normal	Arqueamento só observado em repouso	Arqueamento moderado também em movimento	Arqueamento severo prejudica o movimento
Atividade	Normal	Leve a moderadamente diminuída	Diminuída	Severamente diminuída
Textura da pelagem	Normal	Leve a moderadamente franzida	Franzida severamente/ alisamento ruim	Perda da pelagem
Integridade da pele	Normal	Placas de descamação da pele e/ou edema genital	Descamação moderada e inflamação da pele	Lesões ulcerativas difusas de pele e inflamação severa

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento de um paciente que sofre ou em risco para doença enxerto-versus-hospedeiro, e/ou uma malignidade hematológica, **caracterizado** por compreender:

a administração ao paciente de um ligante não agonista que se liga especificamente ao fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), ou pelo menos um de CD116, CD131, ou o receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131,

tratando e/ou inibindo, dessa forma, o desenvolvimento da doença enxerto-versus-hospedeiro, e/ou tratando uma malignidade hematológica.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o paciente recebeu um transplante alogênico.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o transplante alogênico é uma transferência de célula-tronco hematopoiética alogênica (alo-HCT).

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é uma leucemia, linfoma ou um mieloma múltiplo.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a leucemia é selecionada do grupo que consiste em leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), e leucemia monocítica aguda (AMoL).

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o linfoma é um linfoma de

Hodgkin ou um linfoma não-Hodgkin.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é um anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmero ou molécula do tipo anticorpo.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado, particularmente em que o ligante é um anticorpo neutralizante humano ou um anticorpo neutralizante humanizado.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é selecionado do grupo que consiste em Mavrilimumab, Namilumab, Lenzilumab, Otilimab e Gimsilumab.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que a ligação do ligante ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 é caracterizada por uma K_D menor do que ($<$) 10^{-7} molL $^{-1}$, particularmente em que a referida ligação é representada por uma K_D menor do que ($<$) 10^{-8} molL $^{-1}$ ou até mesmo ($<$) 10^{-9} molL $^{-1}$.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é um polipeptídeo codificado por um ácido nucleico administrado ao paciente.

12. Método para o tratamento de um paciente necessitado de um transplante alogênico, e inibição do desenvolvimento ou redução da severidade de doença enxerto versus hospedeiro associada, o método **caracterizado** por compreender:

o fornecimento ao paciente de um transplante alogênico;

e

a administração ao paciente de um ligante não agonista que se liga especificamente ao fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), ou pelo menos um de CD116, CD131, o receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131, inibindo, dessa forma, o desenvolvimento ou reduzindo a severidade da doença enxerto-versus-hospedeiro.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o transplante alogênico é uma transferência de célula-tronco hematopoiética alogênica (alo-HCT), e em que a alo-HCT é fornecida ao paciente em um tratamento para uma malignidade hematológica.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é fornecido ao paciente concomitantemente ou após o transplante alogênico.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade é uma leucemia selecionada do grupo que consiste em leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), e leucemia monocítica aguda (AMoL).

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é um anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmero ou molécula do tipo anticorpo.

17. Método, de acordo com a reivindicação qualquer uma das reivindicações 12 a 16, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é selecionado do grupo que consiste em Mavrilimumab, Namilumab, Lenzilumab, Otilimab e Gimsilumab.

18. Ligante polipeptídico não agonista, **caracterizado**

por se ligar especificamente ao fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), ou pelo menos um de CD116, CD131, ou o receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131,

para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a transferência alogênica de célula-tronco hematopoiética (alo-HCT).

19. Ligante para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é um anticorpo, fragmento de anticorpo, aptâmero ou molécula do tipo anticorpo que neutraliza a função fisiológica de GM-CSF ou um de CD116, CD131 e o receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131, respectivamente.

20. Ligante para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, **caracterizado** pelo fato de que o ligante é um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado, particularmente em que o ligante é um anticorpo neutralizante humano ou um anticorpo neutralizante humanizado.

21. Ligante para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, **caracterizado** por ser selecionado de Mavrilimumab, Namilumab, Lenzilumab, Otilimab e Gimsilumab.

22. Ligante para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, **caracterizado** pelo fato de que a ligação do ligante ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e

CD131 é representado por uma K_D menor do que ($<$) 10^{-1} molL $^{-1}$, particularmente $K_D < 10^{-8}$ molL $^{-1}$, mais particularmente $K_D < 10^{-9}$ molL $^{-1}$.

23. Molécula de ácido nucleico **caracterizada** por codificar o ligante conforme definido em qualquer uma das reivindicações 18 a 22 precedentes para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT.

24. Molécula de ácido nucleico para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada** pelo fato de que a molécula de ácido nucleico é uma molécula de DNA ou uma molécula de RNA.

25. Construto de expressão de ácido nucleico **caracterizado** por compreender a molécula de ácido nucleico conforme definida na reivindicação 23 ou 24, para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT.

26. Construto de expressão de ácido nucleico usada no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato do construto de expressão ser selecionado de um plasmídeo de DNA, um DNA linear de fita dupla, um RNA de fita simples e um vírus, particularmente um lentivírus, um herpesvírus, um adenovírus ou um vírus adeno-associado.

27. Composição farmacêutica para uso no tratamento de uma malignidade hematológica em um paciente submetido a alo-HCT, **caracterizada** por compreender o ligante conforme definido em qualquer uma das reivindicações 18 a 22 ou a

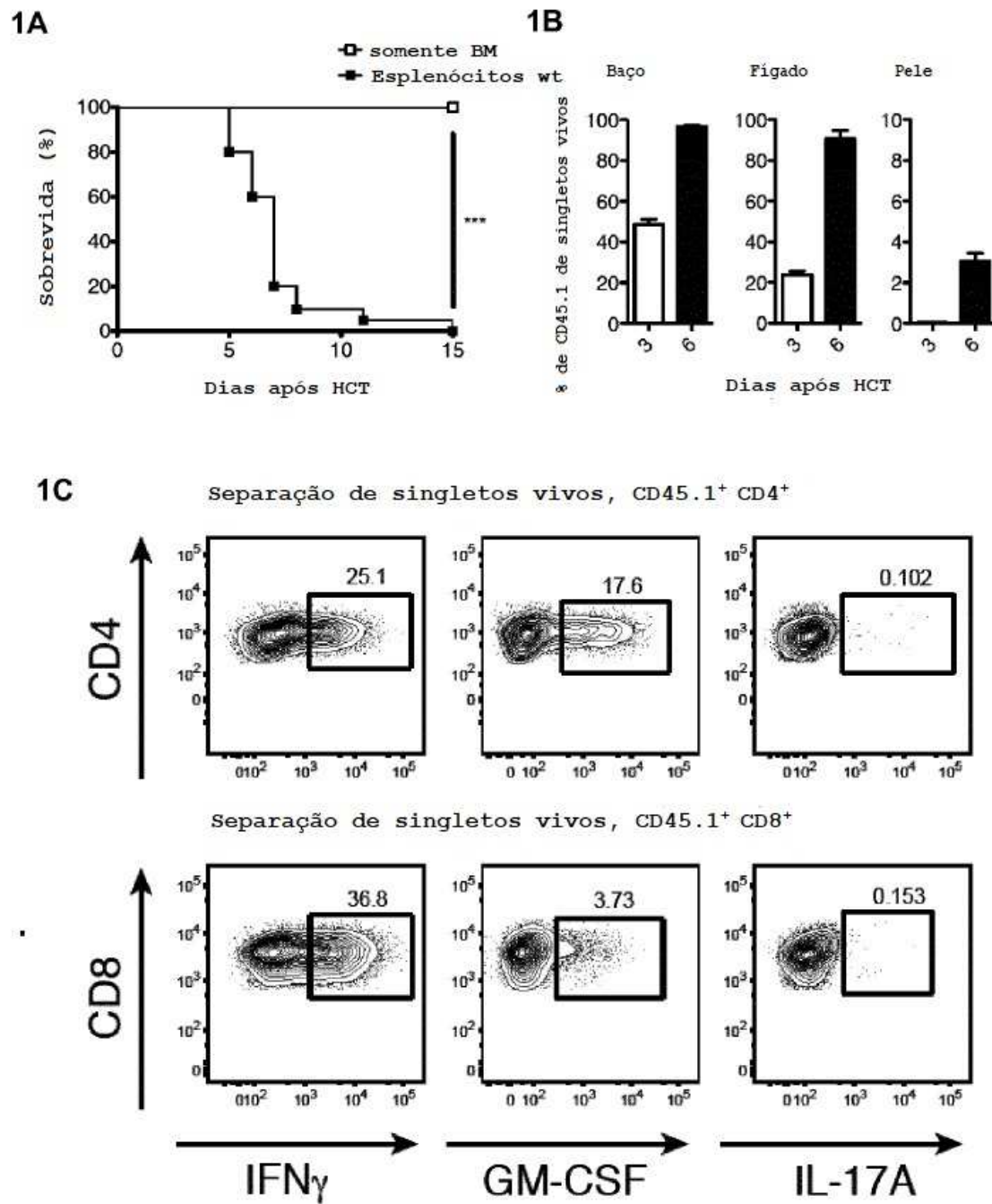
molécula de ácido nucleico conforme definida na reivindicação 23 ou 24, ou o construto de expressão de ácido nucleico conforme definido na reivindicação 25 ou 26, e um carreador farmacologicamente aceitável, particularmente formulada como uma forma de administração para administração parenteral, mais particularmente para administração intravenosa.

28. Ligante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, ou molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, ou, construto de expressão de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, **caracterizado** por ser usado no tratamento de complicações que surgem como consequência de alo-HCT.

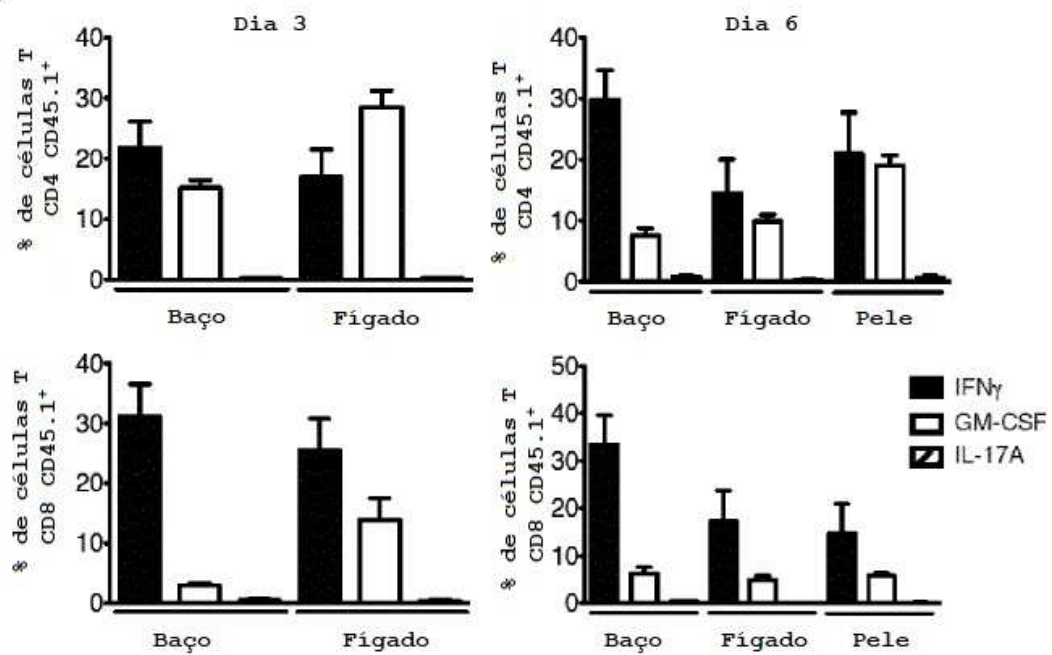
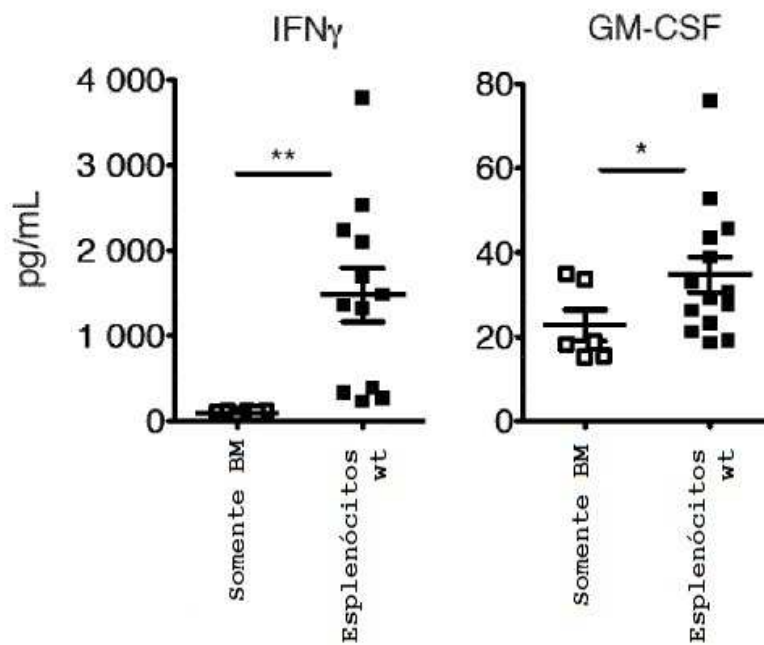
29. Ligante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22 ou, molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, ou, construto de expressão de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é uma leucemia, linfoma, ou um mieloma múltiplo.

30. Ligante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, ou, molécula de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 23 ou 24, ou, construto de expressão de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 25 ou 26, **caracterizado** pelo fato de que a malignidade hematológica é selecionada do grupo que consiste em leucemia mieloide crônica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), e leucemia monocítica aguda (AMoL), ou de um linfoma de Hodgkin ou um linfoma não-Hodgkin.

Figs. 1A-1C



Figs. 1D-1E

1D**1E**

Figs. 1F-1G

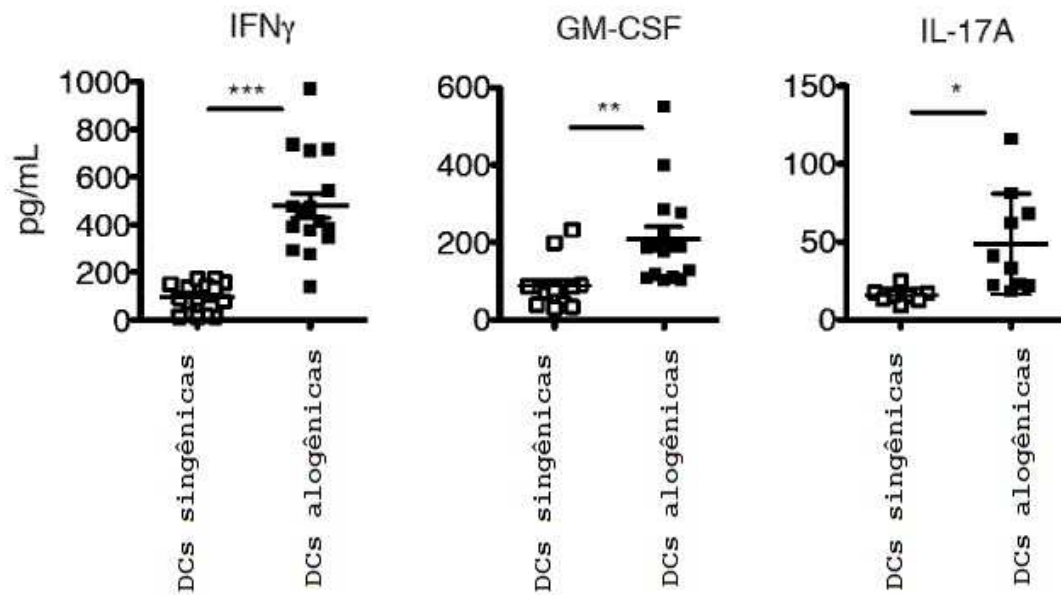
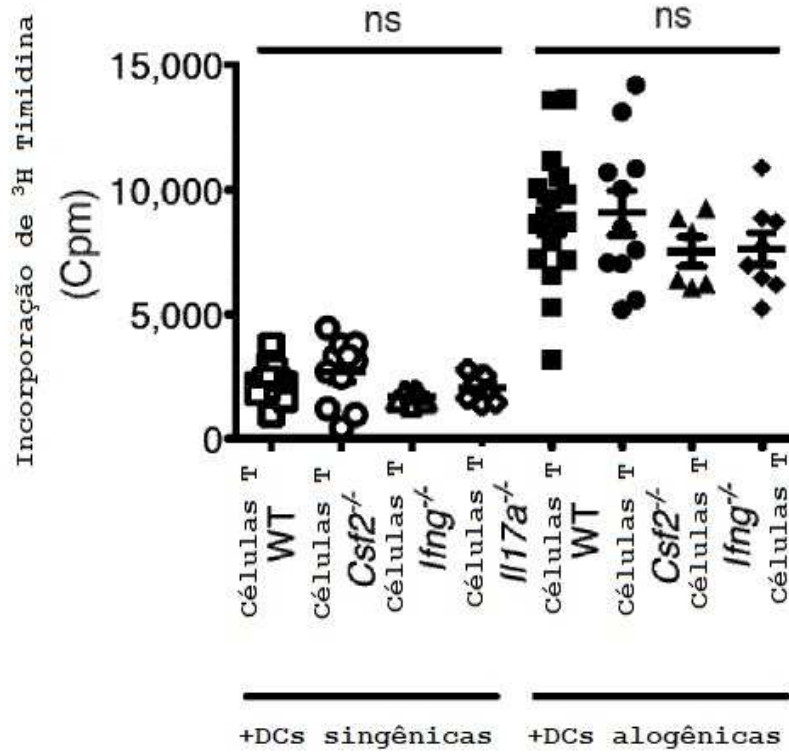
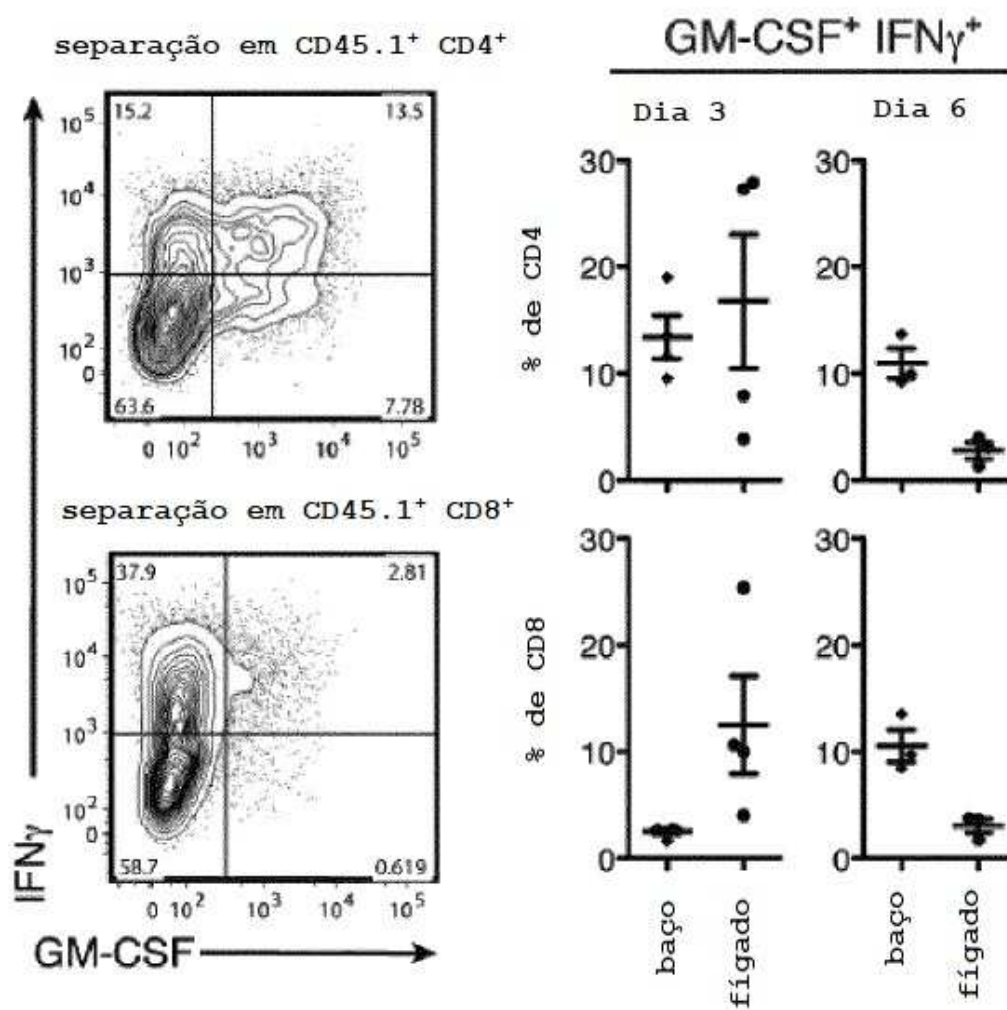
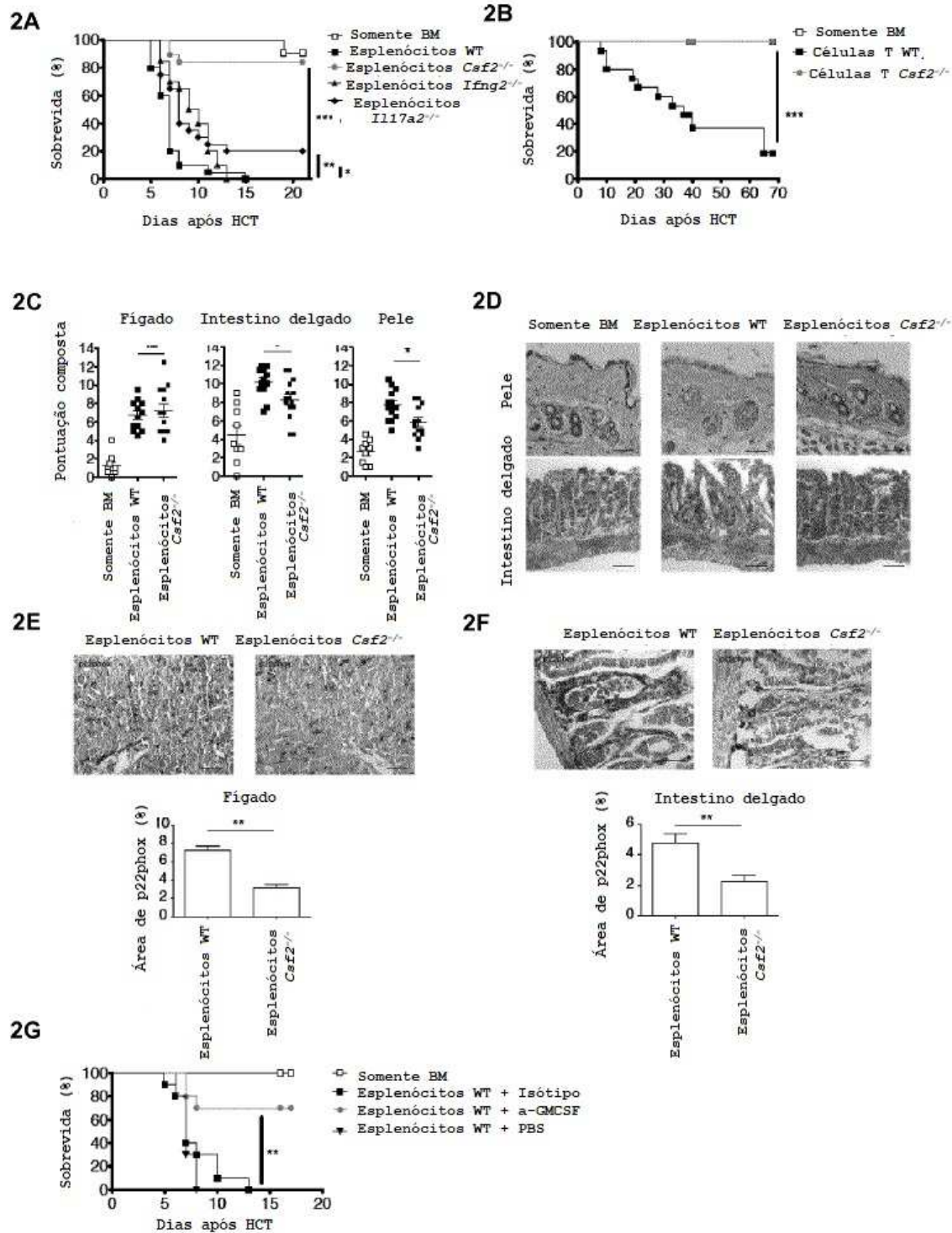
1F**1G**

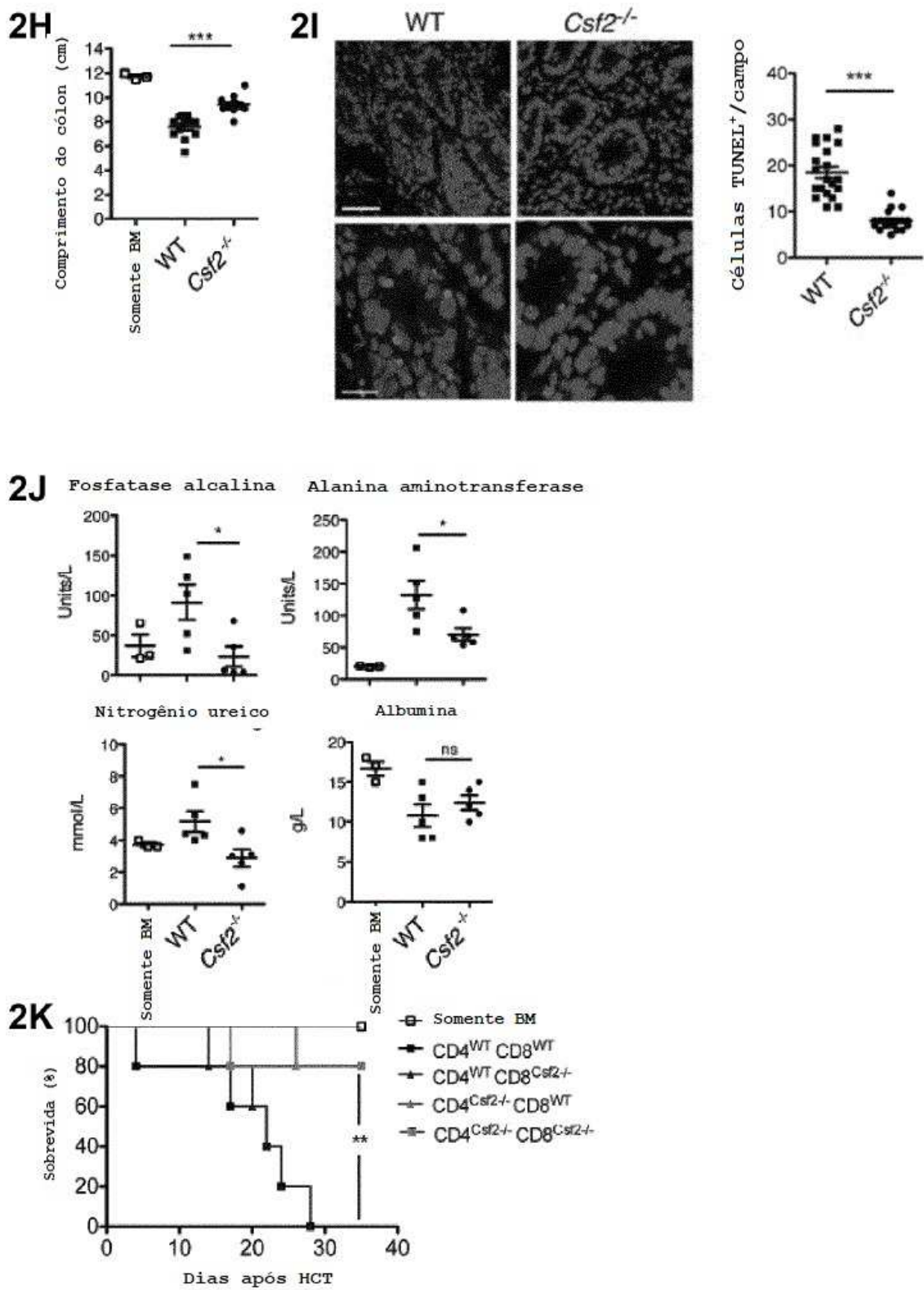
Fig. 1H



Figs. 2A-2G



Figs. 2H-2K



Figs. 3A-3D

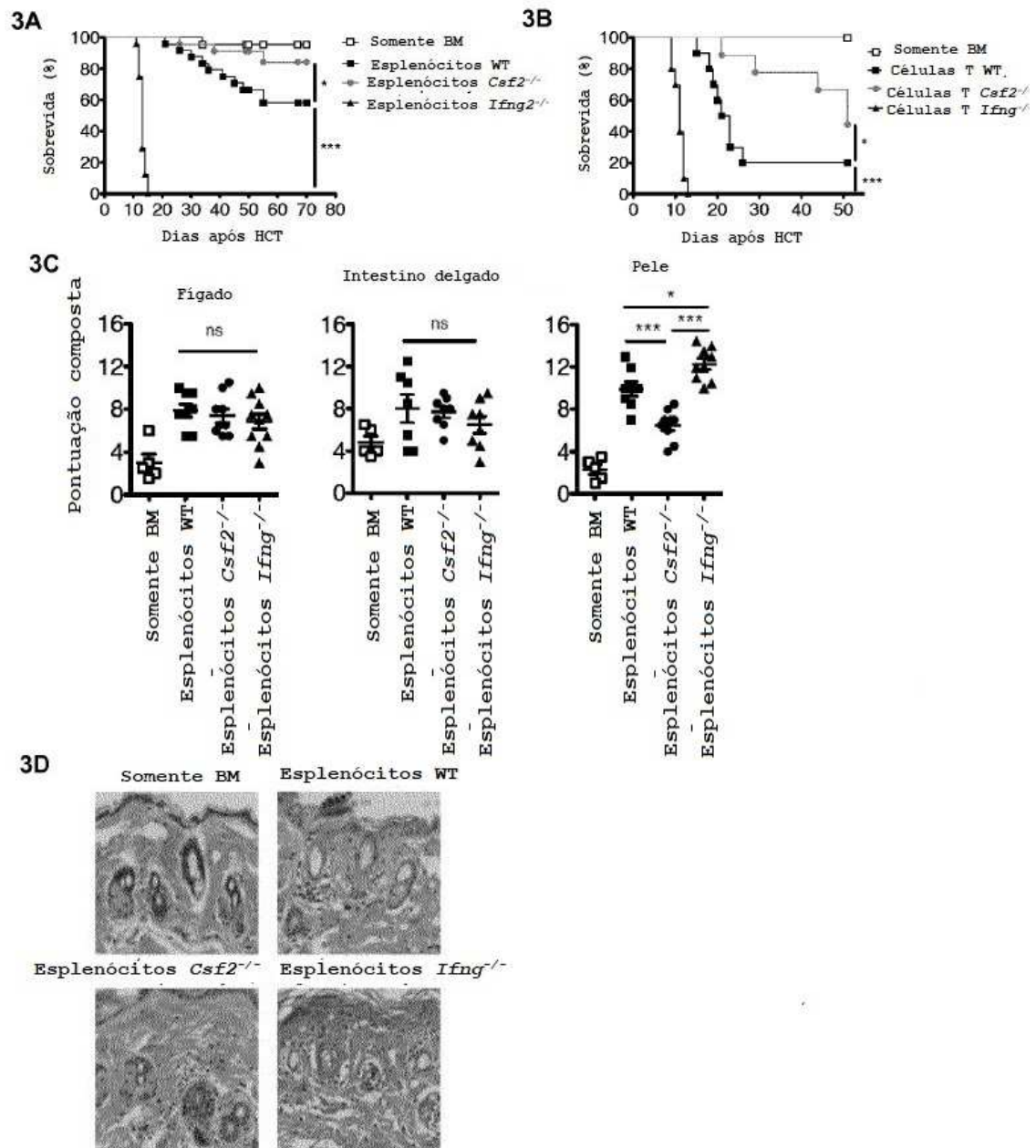
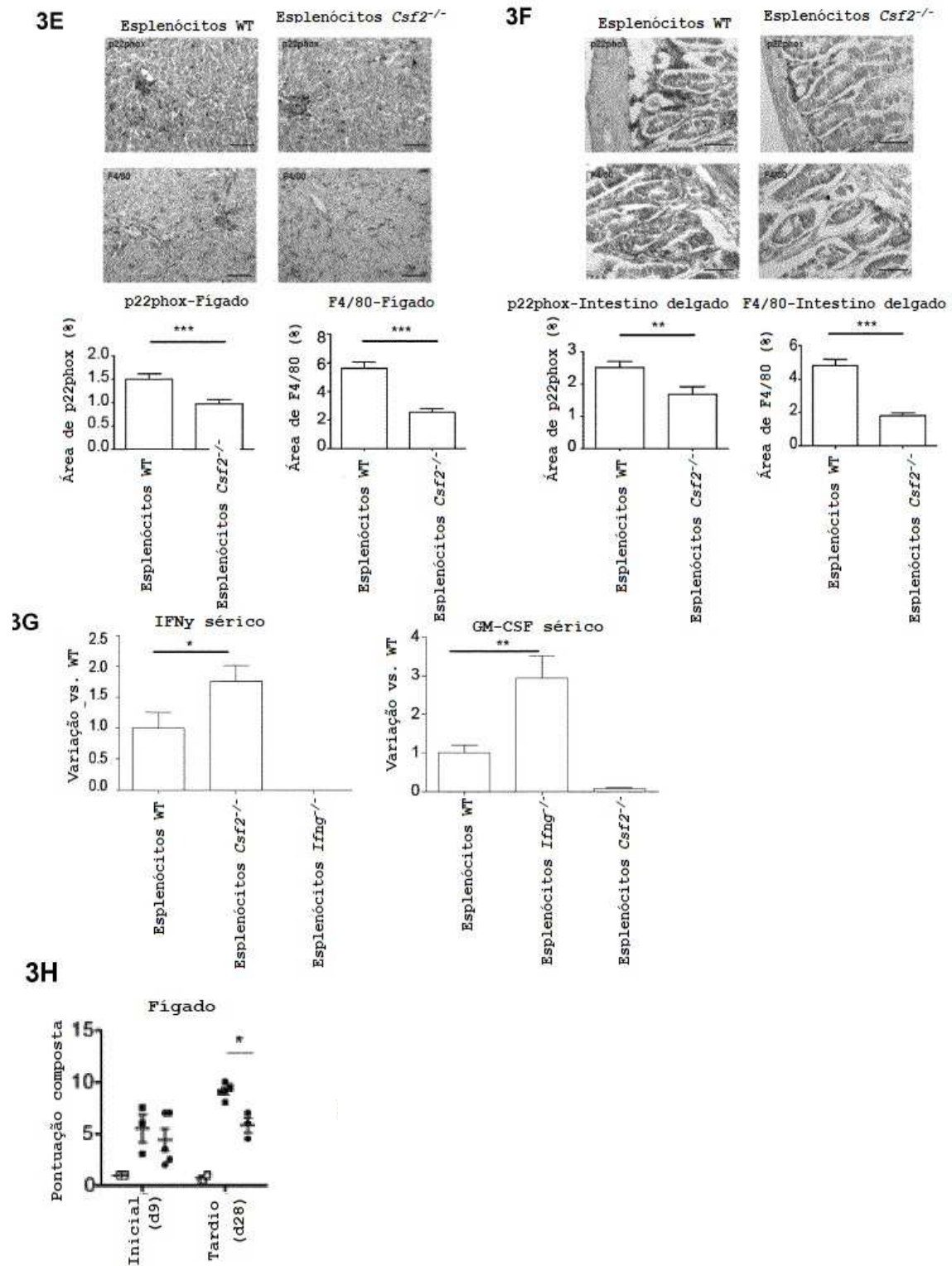
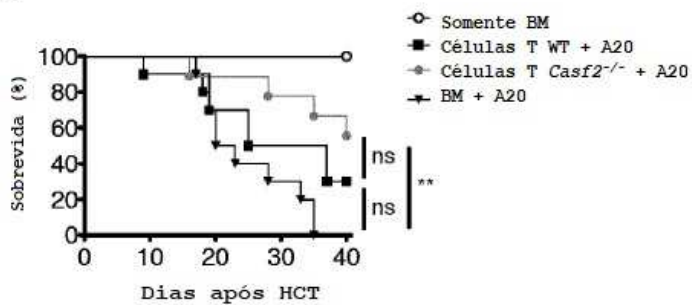
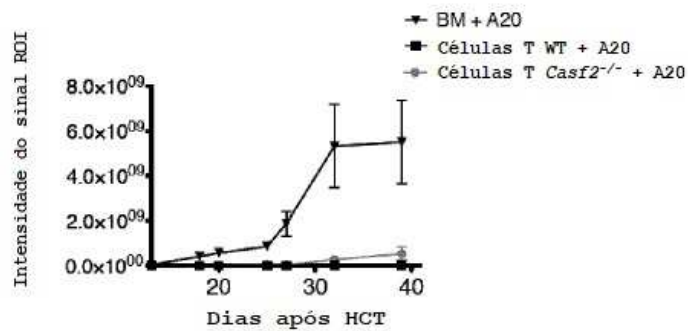
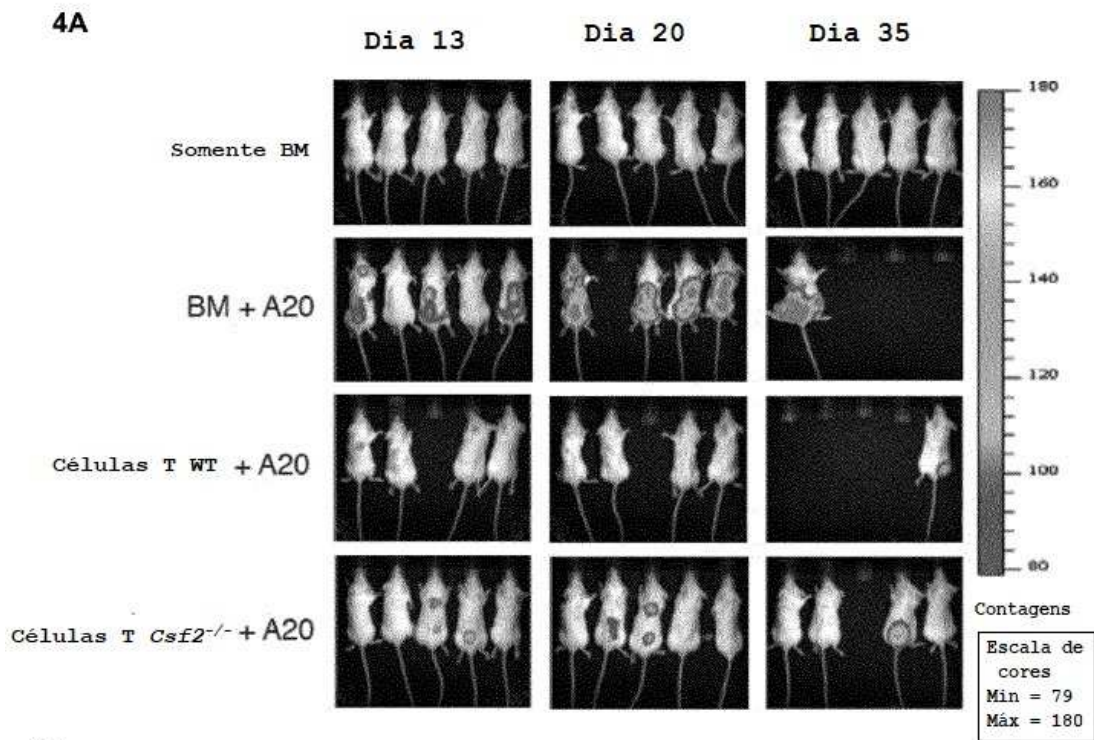


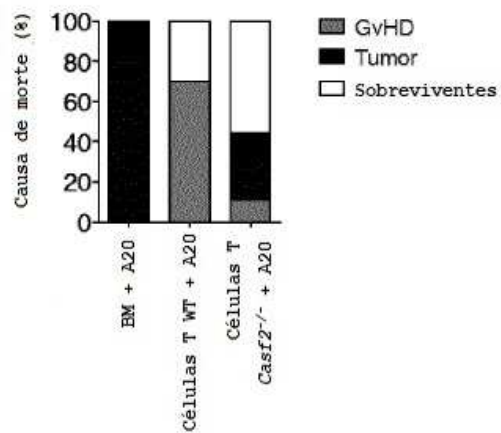
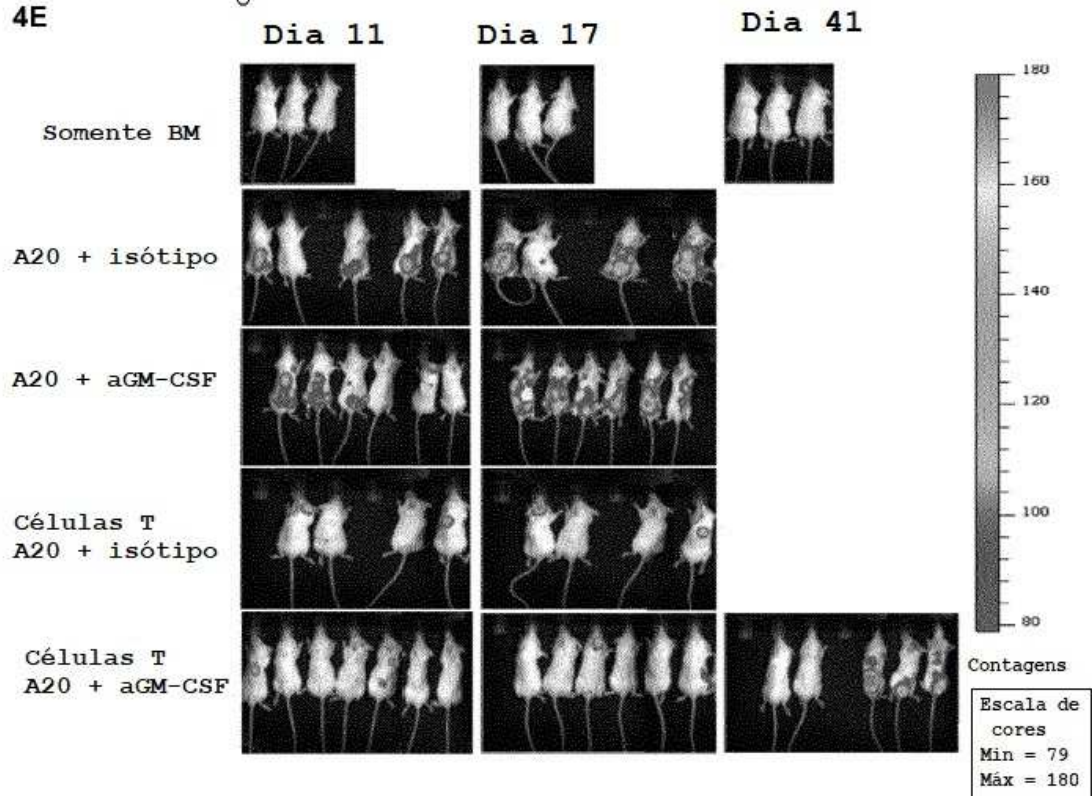
Fig. 3E-3H



Figs. 4A-4C

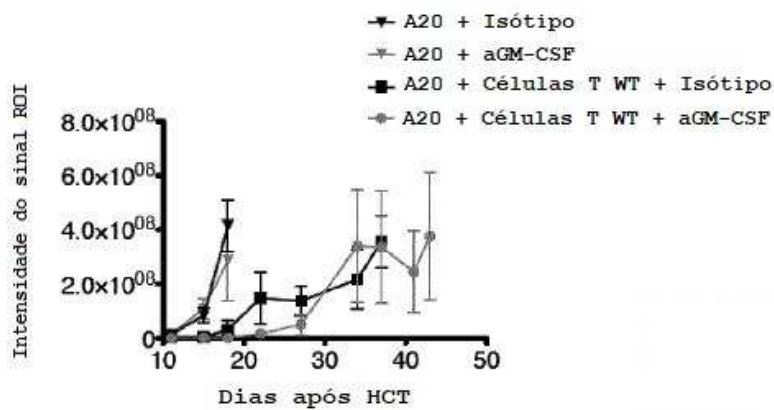


Figs. 4D e 4E

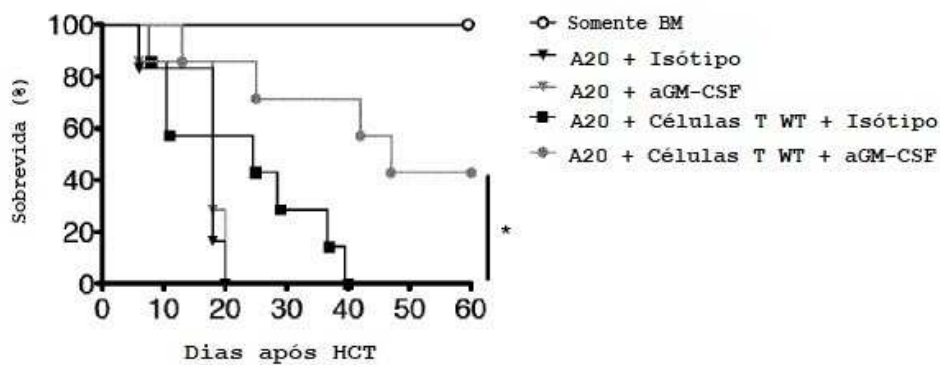
4D**4E**

Figs. 4F-4H

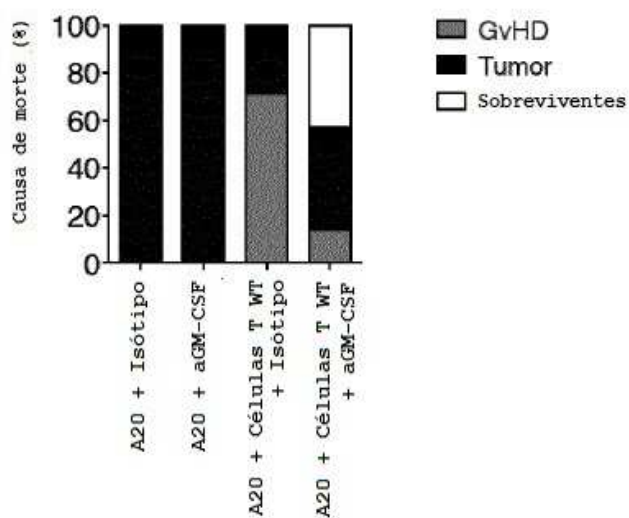
4F



4G



4H



Figs. 5A e 5B

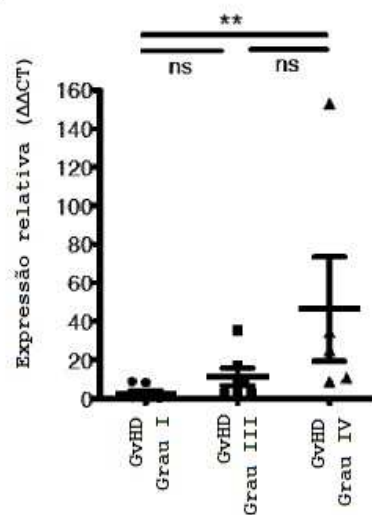
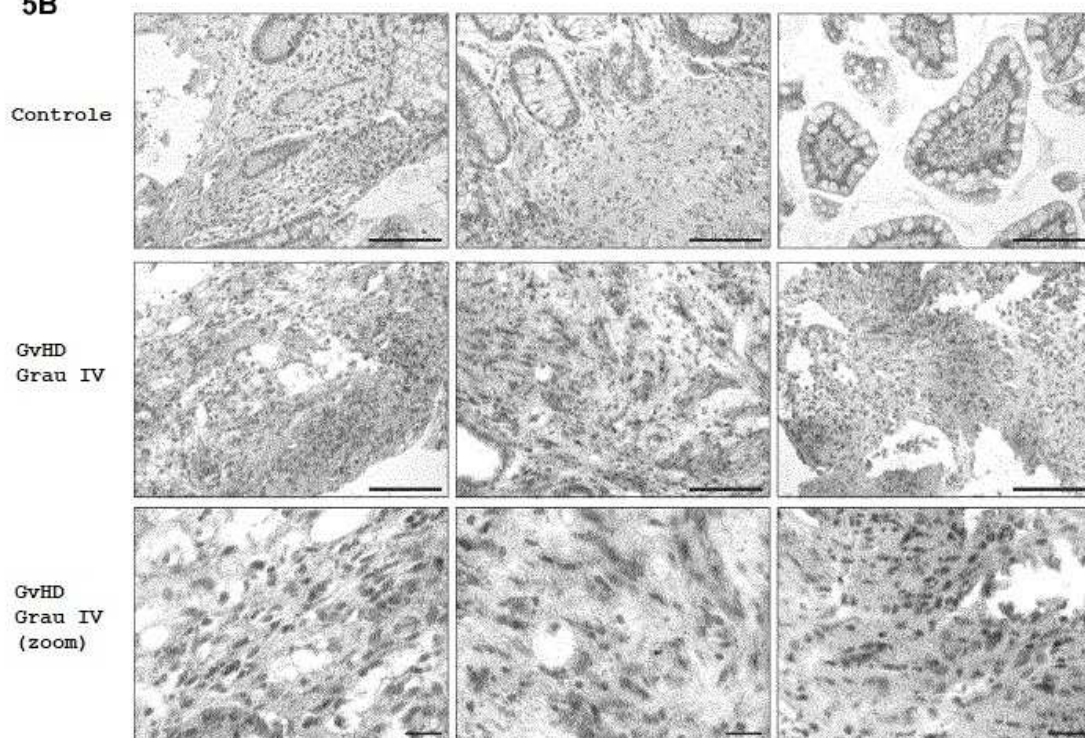
5A**5B**

Fig. 5C

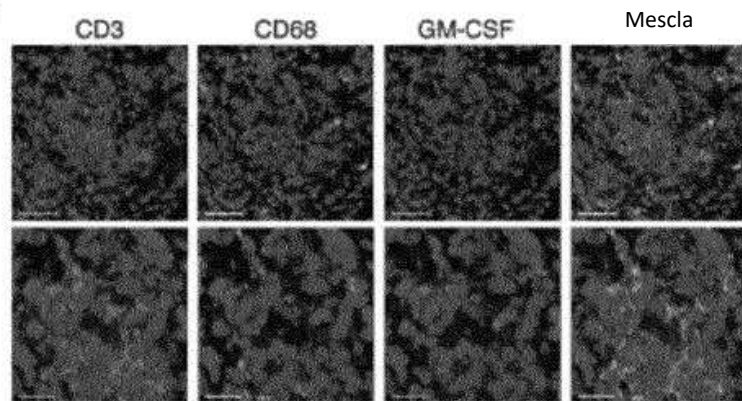
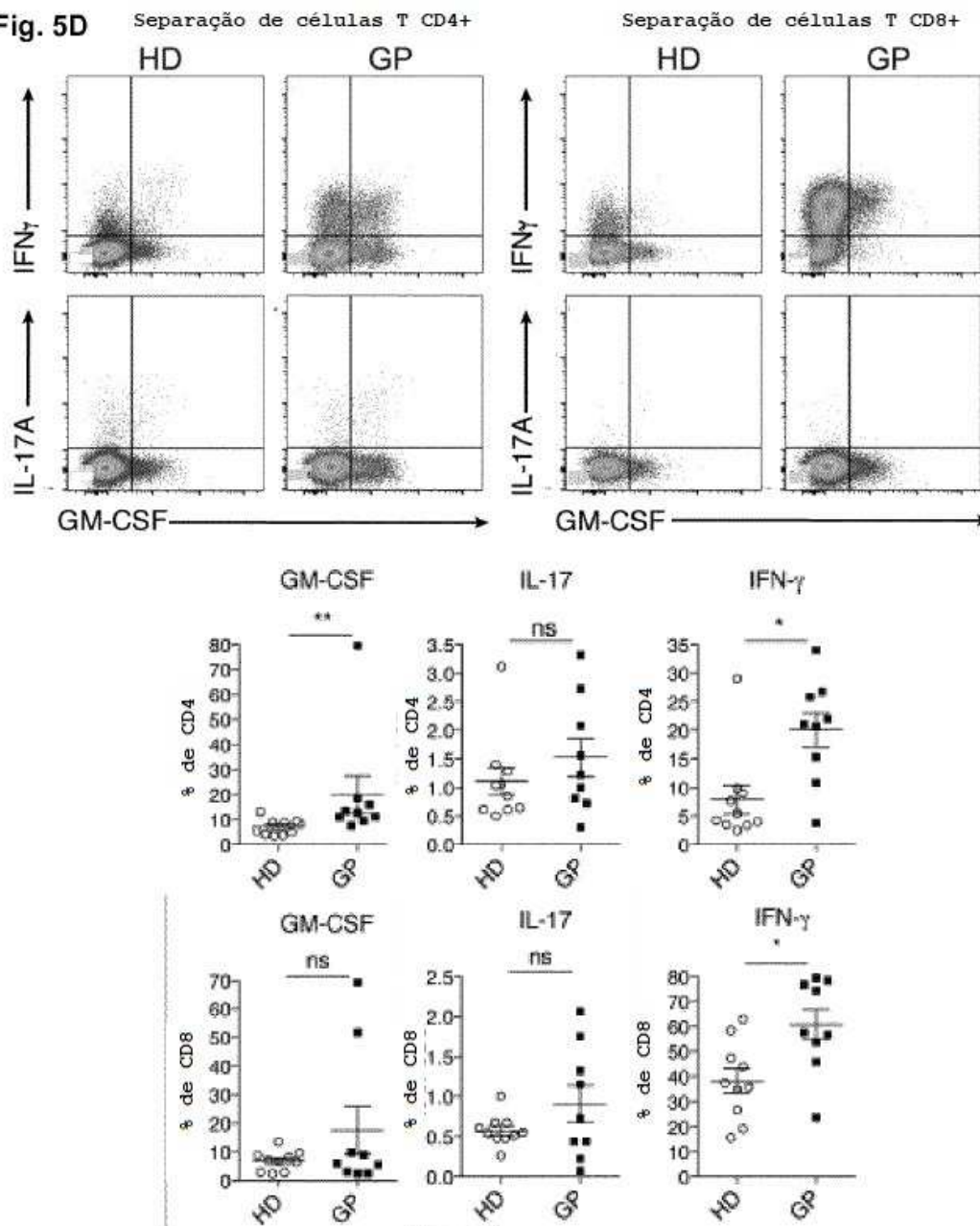
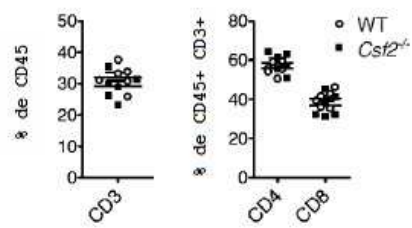
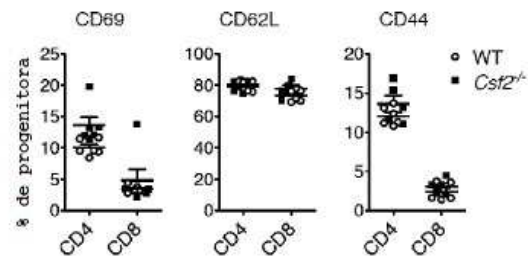
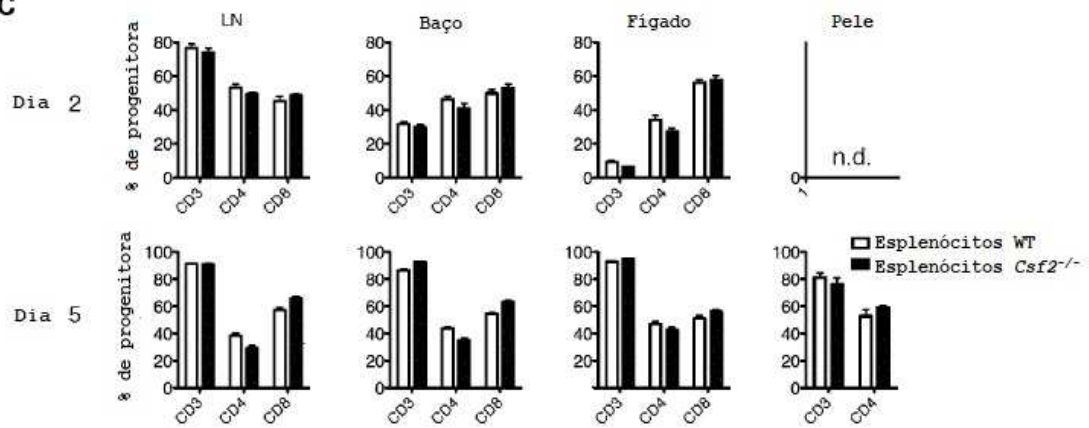
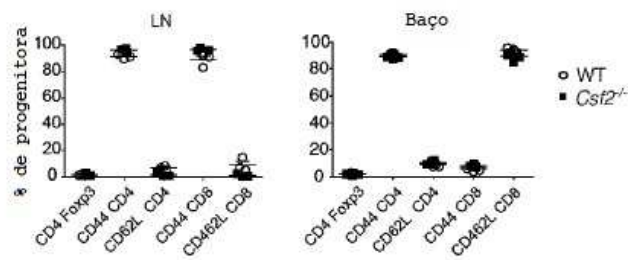


Fig. 5D

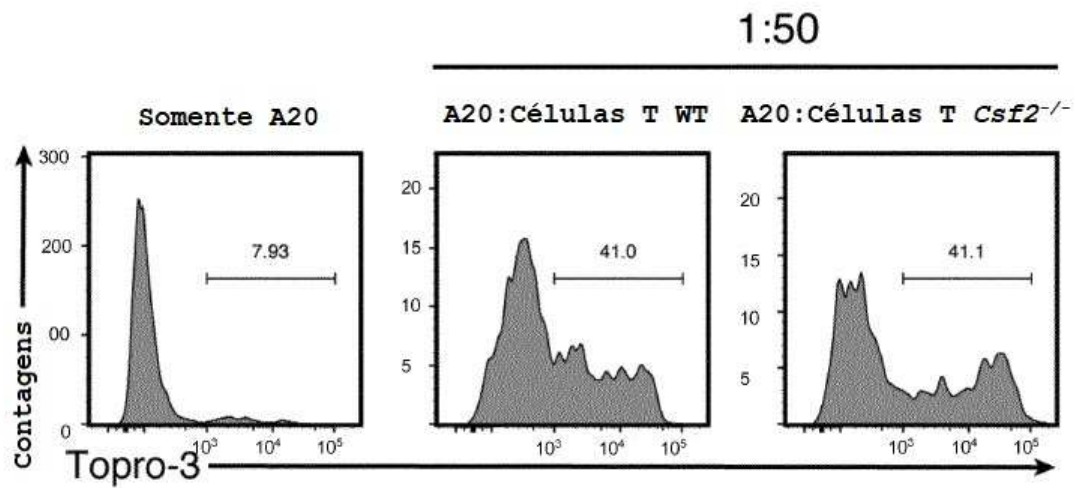


Figs. 6A-6D

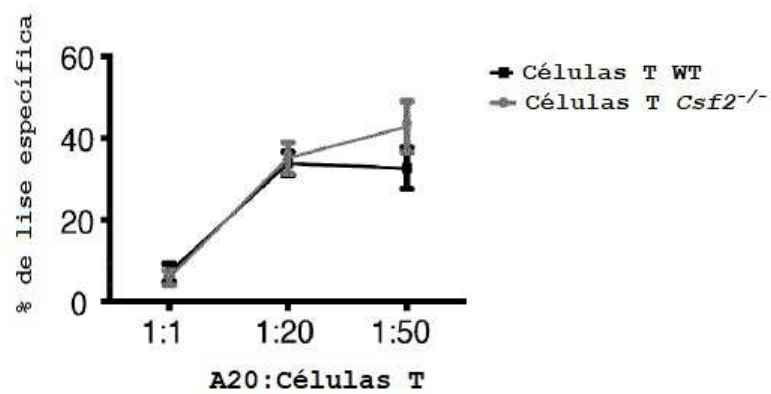
6A**6B****6C****6D**

Figs. 7A e 7B

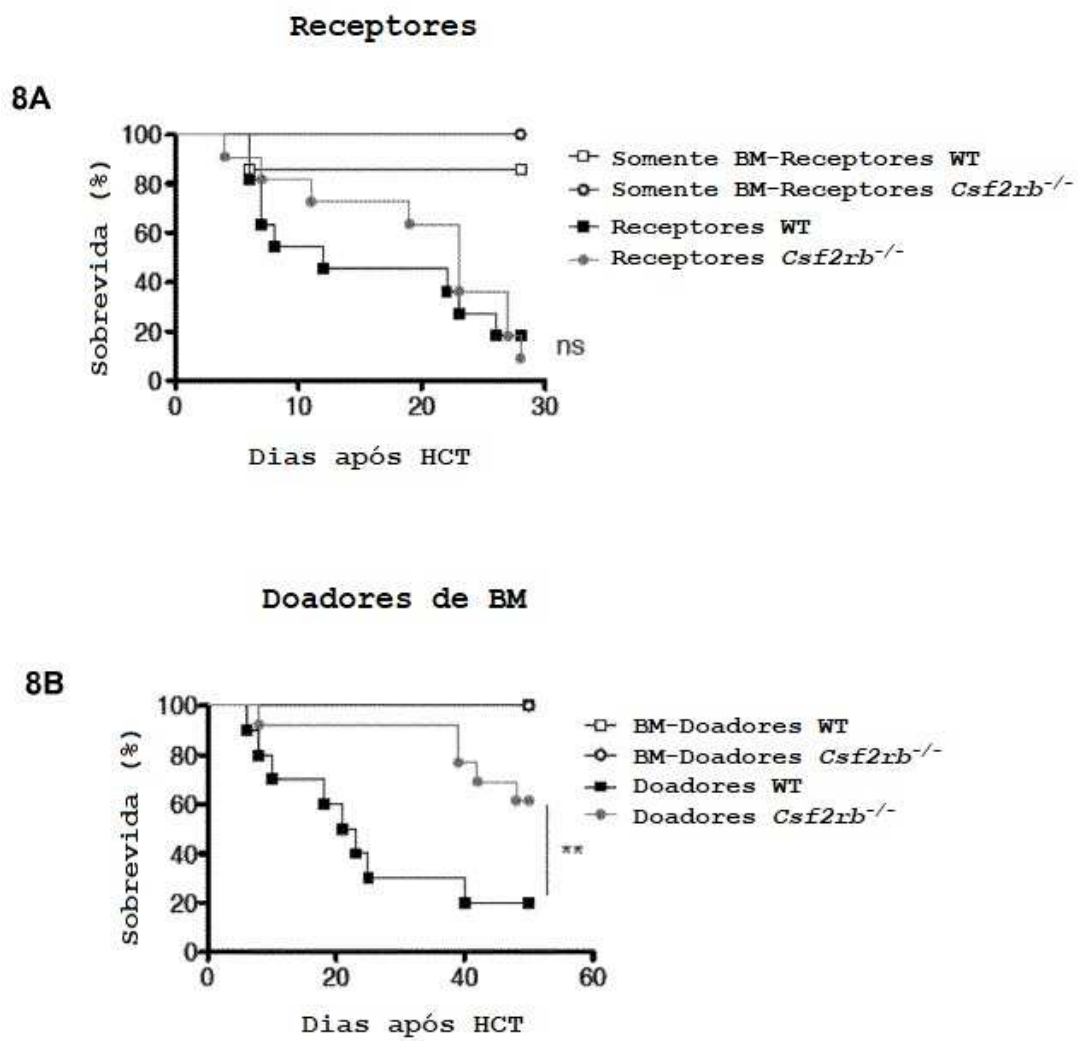
7A



7B

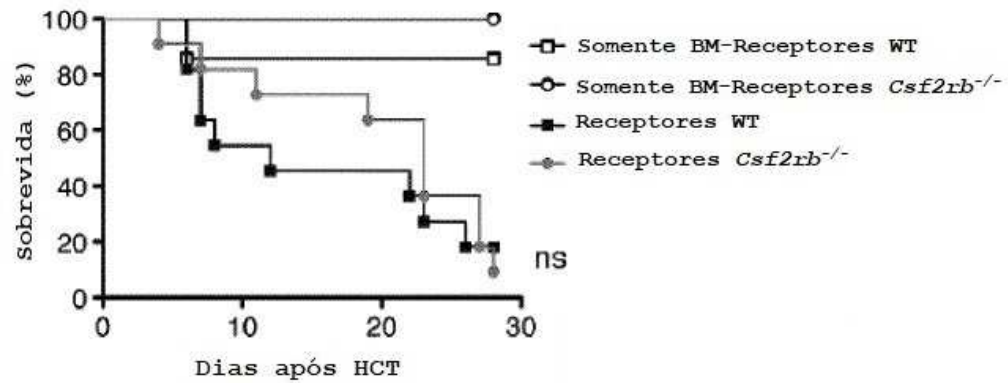


Figs. 8A-8B

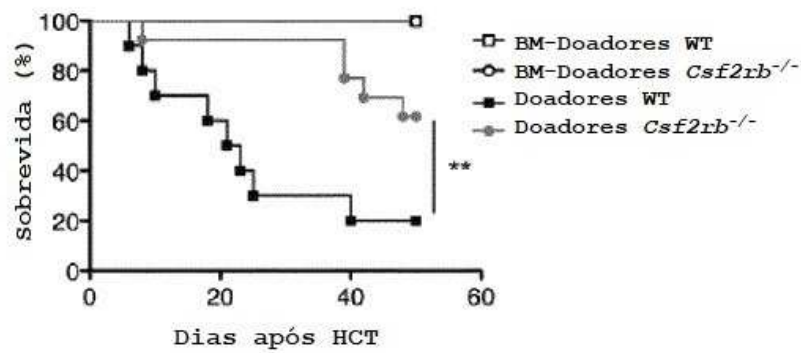


Figs. 9A-9C

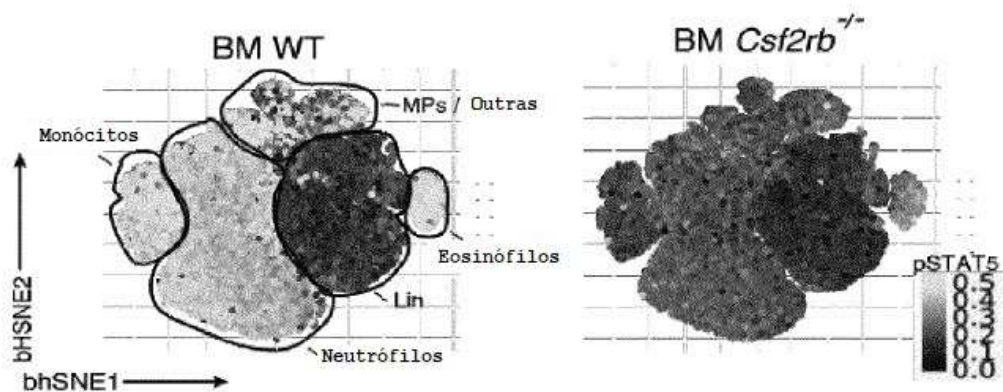
9A



9B



9C



Figs. 9D-9F

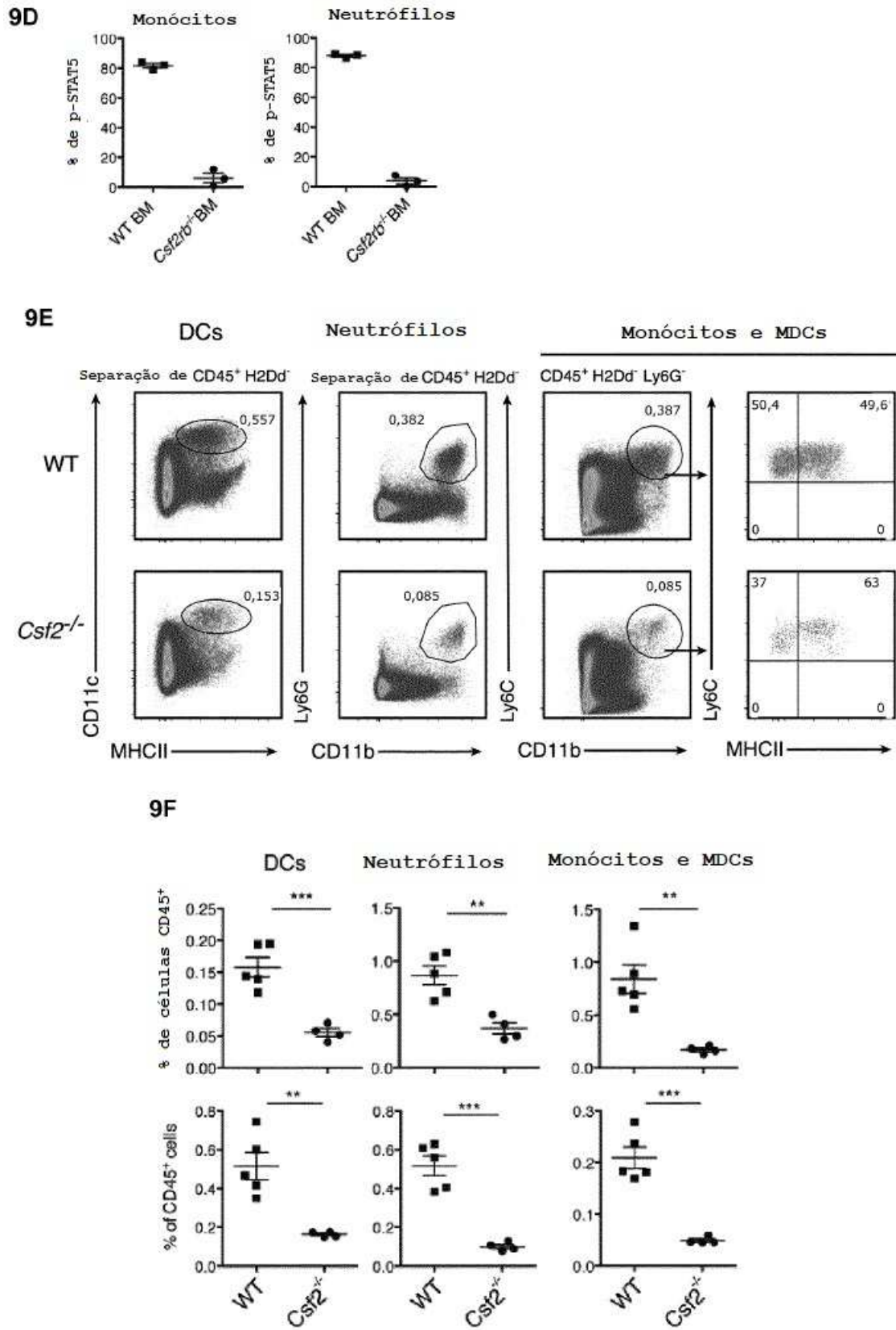


Fig. 9G

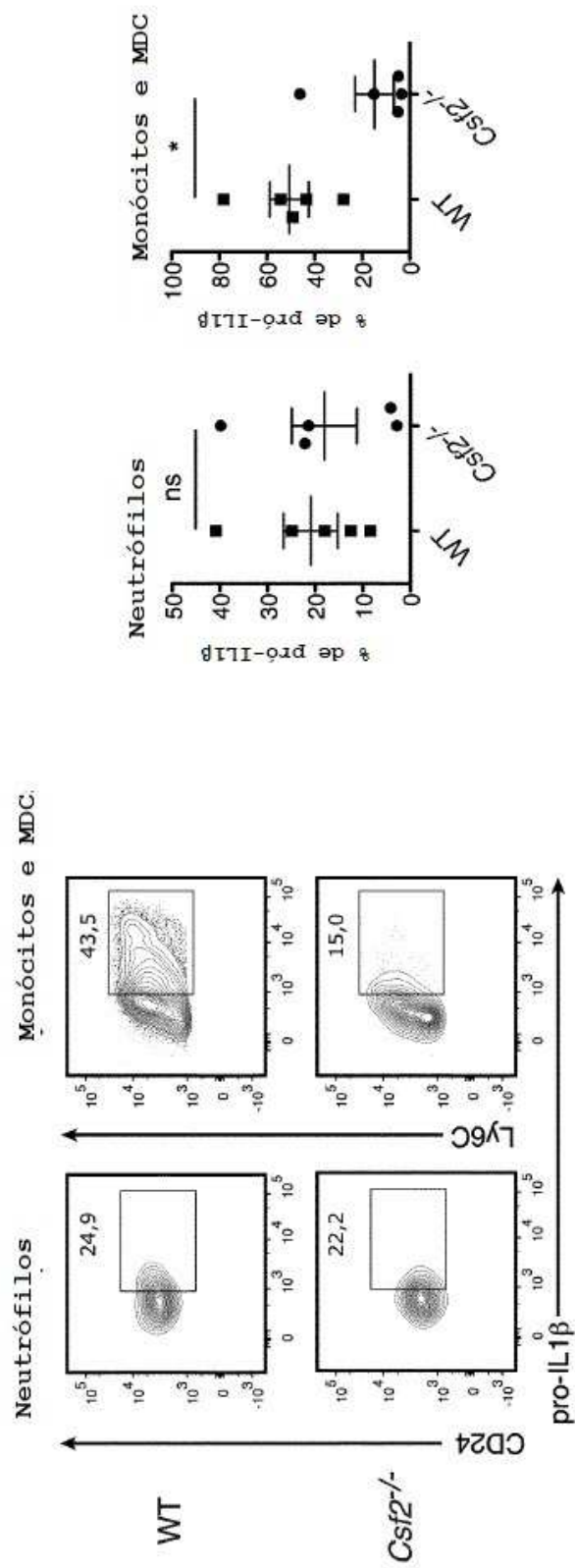
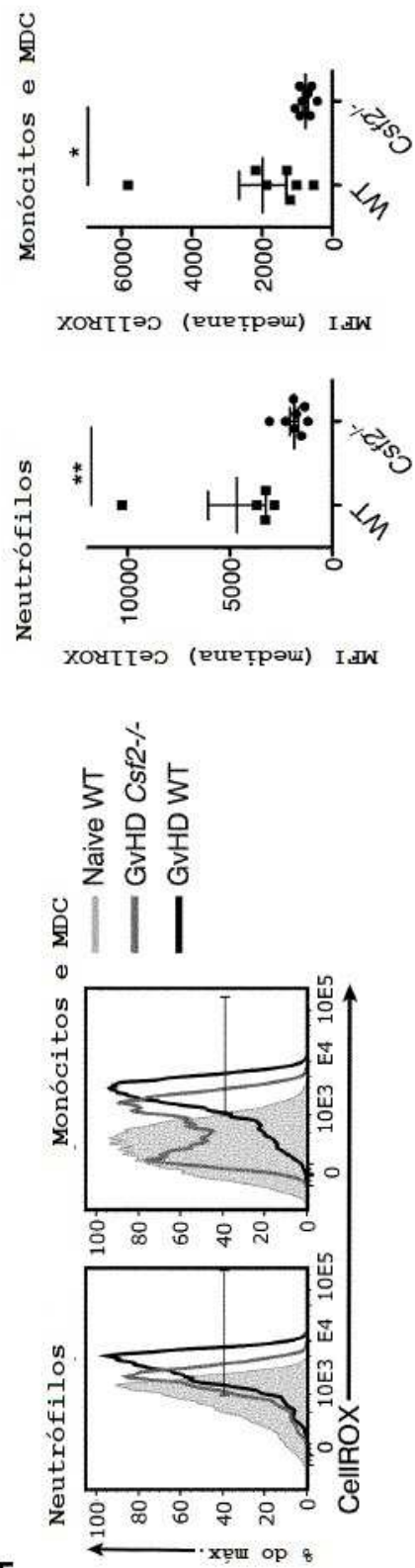


Fig. 9H



RESUMO

LIGANTES PARA GM-CSF OU RECEPTOR GM-CSF PARA USO NO
TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA EM UM PACIENTE
SUBMETIDO A ALO-HCT

É descrito nesse relatório descritivo o uso de um ligante não agonista, particularmente um anticorpo, que se liga especificamente ao GM-CSF ou a um de CD116, CD131 e ao receptor de GM-CSF formado por CD116 e CD131 para uso no tratamento de leucemia em um paciente submetido a alo-HCT ou no tratamento de outras complicações que surgem como consequência de transplante de célula hematopoiética de um doador imunologicamente não idêntico.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202001001 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 24/08/2020
- Hora de Geração do Código: 15:54:23
- Código de Controle:
 - Campo 1: BCF2F29A2518FC2F
 - Campo 2: 0229655C86BBC0BE