

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

(21) **PI0711137-1 A2**

(22) Data de Depósito: 02/05/2007
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/02 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS E REAGENTES PARA DETECÇÃO DE SUSCETIBILIDADE À DOENÇA ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO OU MORTALIDADE TRANSPLANTE-RELACIONADA**

(57) Resumo: MÉTODOS E REAGENTES PARA DETECÇÃO DE SUSCETIBILIDADE À DOENÇA ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO OU MORTALIDADE TRANSPLANTE-RELACIONADA A presente invenção proporciona métodos para determinação da probabilidade e/ou gravidade de GvHD e da probabilidade da ocorrência de mortalidade transplante-relacionada.

(30) Prioridade Unionista: 02/05/2006 US 60/797,037

(73) Titular(es): Therakos, INC.

(72) Inventor(es): Peter J. O'Brien

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007010724 de 02/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/127493 de 08/11/2007

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS E REAGENTES PARA DETECÇÃO DE SUSCETIBILIDADE À DOENÇA ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO OU MORTALIDADE TRANSPLANTE-RELACIONADA**".

5 ESTABELECIMENTO COM RELAÇÃO À PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO FEDERALMENTE CUSTEADO

Nenhum fundo do governo foi usado para fazer a presente invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Doença enxerto versus hospedeiro (GVHD) ocorre no contexto de transplante. Em GVHD, células T doadoras rejeitam os tecidos e órgãos do recipiente montando um ataque contra o corpo do recipiente. Um hospedeiro de outras doenças envolvem desregulação do sistema imune do hospedeiro. Algumas são melhor tratadas com produtos farmacêuticos, algumas
15 com produtos biológicos, outras com tratamentos tal como fotofereze extracorporal e ainda outras têm opções de tratamento muito limitadas.

Foi mostrado que fotofereze extracorporal (ECP) é uma terapia eficaz em determinadas doenças mediadas por células T. No caso de GVHD, fotofereze tem sido usada como um tratamento em associação com
20 pomadas tópicas de triamcinolona, antifúngicos, antivirais, antibióticos, imunoglobulinas e metotrexato. ECP também tem sido usada com agentes imunossuppressores, tais como micofenolato mofetil, tacrolimus, prednisona, ciclosporina, hidroxiclороquina, esteróides, FK-506 e talidomida para cGVHD e cGVHD resistente. Para transplante de órgãos sólidos, ECP tem sido usada
25 em conjunto com agentes imunossuppressores para reduzir o número de episódios de rejeição aguda a aloenxerto associada a aloenxertos renais e transplantes cardíacos. Por exemplo, ECP tem sido usada com OKT3 e/ou os agentes imunossuppressores ciclofosfamida, azatioprina e ciclosporina para reverter rejeição aguda a aloenxerto renal. ECP também tem sido usada
30 da com ciclofosfamida, irradiação fracionada do corpo todo e etoposídeo para transplante de medula alogênico para leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide crônica, linfoma não Hodgkin

ou anemia aplástica grave.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Várias estratégias experimentais identificaram biomarcadores farmacodinâmicos para ECP. Análise citométrica de fluxo de amostras de
5 paciente em experimentos de pGvHD indica que a abundância relativa de determinados subconjuntos de células dendríticas é previsível da propensão de desenvolver GvHD e também reflete o impacto de ECP sobre esse processo.

A correlação dos dados citométricos de fluxo com dados centrais
10 de laboratório levou a biomarcadores candidatos adicionais que se correlacionam com a proporção de DC e, portanto, eliminam a necessidade de estudos citométricos de fluxo. A presente invenção proporciona um conjunto de marcadores que são prontamente medidos e, quando analisados juntos, fornecem uma medida estatisticamente robusta de ação de ECP e progressão
15 da doença.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra o experimento clínico e design de estudo.

A Figura 2 mostra fenotipificação citométrica de PBMC.

A Figura 3 mostra que perfis de DC prevêm GvHD grave. Sub-
20 conjuntos de DC variam com o grau de GvHD. Mapa térmico da abundância de DC o qual, junto com a plotagem de CD11c+/CD11cDC mostrada em (B) demonstram a diferença na expressão relativa desses subtipos de DC em pacientes que depois sofreram GvHD. (C) e (D) mostram os resultados de análise por regressão logística de marcadores na superfície celular. Aqui, a
25 ROC reflete a utilidade do marcador para discriminação entre populações de GvHD grave e de grau 0 ou 1. Um melhor teste tem uma ROC mais próximo de 1, no pior teste a ROC é de 0,5.

A Figura 4 mostra que perfis de DC prevêm TRM.

A Figura 5 mostra modelamento com diferentes biomarcadores e
30 mostra que o melhor indicador de TRM encontrado no estudo é um modelo incluindo células CD11c+ DC e NK.

A Figura 6 mostra A) modelos prevendo GvHD. Com 59 resulta-

dos, apenas contagens de monócitos - (ROC = 0,66) e neutrófilos (ROC = 0,69) se aproximaram do poder previsível de subconjuntos de DC para G-vHD. B) Modelos que prevêm TRM. Combinações de valores de laboratório e dados demográficos de pacientes proporcionaram modelos com poder
5 previsível acentuado para TRM. Os resultados são mostrados independentemente (esquerda abaixo) e quando modelados em combinação (curva de ROC à direita abaixo). A curva de ROC para o modelo incluía albumina, proporção de BUN/creatinina, compatibilidade do doador e relação de compatibilidade e interação com albumina. C) Marcadores de superfície celular correlacionados e valores de laboratório. Valores de marcador de superfície
10 celular foram comparados com resultados de laboratório usando correlação de Pearson para identificar alterações em perfis celulares e ensaios citométricos.

DESCRIÇÃO DETALHA DA INVENÇÃO

15 Todas as referências citadas na presente Descrição são incorporadas na presente especificação em sua totalidade. Os termos "indivíduo" ou "paciente" são usados permutavelmente e se referem a um animal, de preferência um mamífero e, mais preferivelmente, um ser humano.

Uma "população de células" geralmente inclui um tipo de célula
20 encontrado no sangue. O termo pode incluir um ou mais tipos de células sangüíneas, especificamente células sangüíneas vermelhas, plaquetas e células sangüíneas brancas. Uma população de células pode compreender subconjuntos de células sangüíneas brancas, por exemplo, células T, células dendríticas, células B, etc. Em uma modalidade, uma população de células
25 pode compreender uma mistura ou reservatório de tipos células. Alternativamente, uma população de células pode compreender um tipo substancialmente purificado de células, por exemplo, células T ou células dendríticas.

"Procedimento de ECP" ou "ECP" se refere à fotofereze extracorporal, também conhecida como fototerapia extracorporal. Ele é um trata-
30 mento de uma população de células que foi submetida à luz UVA e um composto fotoativável. De preferência, a população de células é de um órgão ou tecido; mais preferivelmente, a população de células é de uma porção do

sangue; e, mais preferivelmente, a população de células é um envoltório da camada leucocitária. ECP é, algumas vezes, usada para se referir a um processo no qual uma população de células foi submetida a um procedimento de indução de apoptose com luz UVA na presença de um agente de ligação cruzada a DNA, tal como psoraleno (de preferência, 8-MOP).

Na modalidade mais preferida da invenção, ECP é usada para induzir à apoptose. Isso envolve um composto fotoativável adicionado a uma população de células *ex vivo*. O composto fotossensível pode ser administrado a uma população de células compreendendo células sangüíneas após sua extração do indivíduo, recipiente ou doador, conforme possa ser o caso, e antes de ou contemporaneamente com exposição à luz ultravioleta. O composto fotossensível pode ser administrado a uma população de células compreendendo sangue íntegro ou uma fração do mesmo, contanto que as células sangüíneas ou componentes sangüíneos alvo recebam o composto fotossensível. Em outra modalidade, uma porção do sangue do indivíduo, sangue do recipiente ou sangue do doador primeiro deverá ser processada usando métodos conhecidos para remover substancialmente os eritrócitos e o composto fotoativo pode, então, ser administrado à população de células resultante compreendendo a fração de leucócitos enriquecida.

Em uma modalidade alternativa, o composto fotoativável pode ser administrado *in vivo*. O composto fotossensível, quando administrado a uma população de células compreendendo o sangue do indivíduo, sangue do recipiente ou o sangue do doador, conforme possa ser o caso, *in vivo* pode ser administrado oralmente, mas também pode ser administrado intravenosamente e/ou através de outras vias de administração convencionais. A dosagem oral do composto fotossensível pode estar na faixa de cerca de 0,3 a cerca de 0,7 mg/kg, mais especificamente cerca de 0,6 mg/kg. Quando administrado oralmente, o composto fotossensível pode ser administrado pelo menos cerca de uma hora antes do tratamento de fotofereze e não mais do que cerca de três horas antes do tratamento de fotofereze.

Compostos foto-ativáveis para uso de acordo com a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, compostos conhecidos como

psoralenos (ou furocumarinas), bem como derivados de psoraleno, tais como aqueles descritos, por exemplo, na Pat. U.S. No. 4.321.919 e Pat. U.S. No. 5.399.719. Compostos preferidos incluem 8-metoxipsoraleno; 4,5'8-trimetilpsoraleno; 5-metoxipsoraleno; 4-metilpsoraleno; 4,4-dimetilpsoraleno; 4-5'-dimetilpsoraleno; 4'-aminometil-4,5',8-trimetilpsoraleno; 4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno; 4',8-metoxipsoraleno; e um 4'-(omega-amino-2-oxa) alquil-4,5'8-trimetilpsoraleno incluindo, mas não limitado a, 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno. Em uma modalidade, o composto fotossensível que pode ser usado compreende o derivado de psoraleno amotosalen (S-59) (Cerus, Corp., Concord, Calif.). Em outra modalidade, o composto fotossensível compreende 8-metoxipsoraleno (8 MOP).

A população de células à qual o composto fotoativável foi adicionado é tratada com uma luz de um comprimento de onda que ativa o composto fotoativável. A etapa de tratamento que ativa o composto fotoativável é, de preferência, realizada usando luz ultravioleta com comprimento de onda longo (UVA), por exemplo, em um comprimento de onda dentro da faixa de 320 a 400 nm. A exposição à luz ultravioleta durante o tratamento de fotofereze é, de preferência, administrado durante uma extensão de tempo suficiente para distribuir cerca de 1-2 J/cm² à população de células.

Aparelhos de fotofereze extracorporal úteis nos métodos de acordo com a invenção incluem aqueles fabricados pela Therakos, Inc., (Exton, Pa.) sob a marca UVARTM. Uma descrição de tal aparelho é encontrada na Pat. U.S. No. 4,683,889. O sistema UVARTM usa um sistema de tratamento e consiste em três fases, incluindo: 1) a coleta de uma fração da camada leucocitária (enriquecida em leucócitos), 2) irradiação da fração da camada leucocitária coletada e 3) re-infusão das células sangüíneas brancas tratadas. A fase de coleta tem seis ciclos de etapas de extração de sangue, centrifugação e re-infusão. Durante cada ciclo, sangue íntegro é centrifugado e separado em um vaso de ferese. A partir dessa separação, plasma (o volume, em cada ciclo, é determinado pelo operador do instrumento UVARTM) e 40 ml de camada leucocitária são guardados em cada ciclo de coleta. As células vermelhas e todo o plasma adicional são reinfundidos ao paciente

antes de início do próximo ciclo de coleta. Finalmente, um total de 240 ml de camada leucocitária e 300 ml de plasma são separados e guardados para irradiação por UVA.

A irradiação do sangue enriquecido em leucócitos dentro do circuito de irradiação começa durante a coleta de camada leucocitária do primeiro ciclo de coleta. O plasma e camada leucocitária coletados são misturados com 200 ml de solução salina normal heparinizada e 200 mg de UVA-DEX™ (8-metoxipsoralina solúvel em água). Essa mistura flui em uma camada de 1,4 mm de espessura através da Câmara de Fotoativação PHOTOCEPTOR™, a qual é inserida entre dois grupos de lâmpadas de UVA PHOTSETTE™. Lâmpadas de UVA PHOTSETTE™ irradiam ambos os lados dessa câmara PHOTOCEPTOR™ UVA-transparente, permitindo uma exposição de 180 minutos à luz ultravioleta A, proporcionando uma exposição média por linfócito de 1-2 J/cm². O preparado de camada leucocitária final contém uma estimativa de 20% a 25% do componente de células mononucleares de sangue periférico total e tem um hematócrito de 2,5% a 7%. Após o período de fotoativação, o volume é reinfundido ao paciente durante um período de 30 a 45 minutos. O pedido de patente U.S. No. de Ser. 09/480.893 (incorporado aqui por referência) descreve outro sistema para uso em administração de ECP. As Pats. U.S. Nos. 5.951.509; 5.985.914; 5.984.887, 4.464.166; 4.428.744; 4.398.906; 4.321.919; Publicações PCT Nos. WO 97/36634; e WO 97/36581 também contêm descrição de dispositivos e métodos úteis a esse respeito.

Outro sistema que pode ser útil nos métodos da presente invenção é descrito no pedido de patente U.S. No. de Ser. 09/556.832. Esse sistema inclui um aparelho pelo qual o volume líquido de fluido coletado ou removido de um indivíduo pode ser reduzido durante ECP. A quantidade eficaz de energia luminosa que é distribuída a uma população de células pode ser determinada usando os métodos e sistemas descritos na Pat. U.S. No. 6.219.584.

Uma variedade de outros métodos para indução de apoptose em uma população de células são bem conhecidos e podem ser adotados para

uso na presente invenção. Um de tais tratamentos compreende sujeição de uma população de células à radiação ionizante (raios gama, raios x, etc.) e/ou radiação eletromagnética não ionizante, incluindo luz ultravioleta, aquecimento, resfriamento, privação de soro, privação de fator de crescimento, acidificação, diluição, alcalinização, alteração da resistência iônica, privação de soro, irradiação ou uma combinação dos mesmos. Alternativamente, apoptose pode ser induzida através de sujeição de uma população de células a ultra-som.

Ainda outro método de indução de apoptose compreende a aplicação extracorporal de estresse oxidativo a uma população de células. Isso pode ser obtido através de tratamento da população de células, em suspensão, com agentes de oxidação química, tais como peróxido de hidrogênio, outros peróxidos e hidroperóxidos, ozônio, permanganatos, periodatos e semelhantes. Agentes de oxidação biologicamente aceitáveis podem ser usados para reduzir problemas potenciais associados a resíduos e contaminações da população de células apoptose-induzida assim formada.

No preparo da população de células apoptose-induzida, cuidado deve ser tomado para não aplicar níveis excessivos de estresse oxidativo, radiação, tratamento com fármaco, etc. porque, de outro modo, pode haver um risco significativo de causar necrose de pelo menos algumas das células sob tratamento. Necrose faz com que a membrana celular se rompa e a liberação de conteúdos celulares freqüentemente com resultados biologicamente prejudiciais, particularmente eventos inflamatórios, de modo que a presença de células necróticas e seus componentes, junto com a população de células compreendendo células apoptóticas é melhor evitada. Níveis apropriados de tratamento da população de células para induzir à apoptose e o tipo de tratamento escolhido para induzir à apoptose são prontamente determináveis por aqueles versados na técnica.

Um processo de acordo com a presente invenção envolve a cultura de células do indivíduo ou uma linhagem de célula de mamífero compatível. As células cultivadas podem, então, ser tratadas extracorporalmente para induzir à apoptose e criar uma população de células da mesma. O tra-

tamento extracorporal pode ser selecionado do grupo consistindo em anticorpos, agentes quimioterapêuticos, radiação, fotoferece extracorporal, ultrassom, proteínas e agentes de oxidação. As células, suspensas no plasma do indivíduo ou outro meio de suspensão adequado, tal como solução salina ou
5 um meio de cultura de células de mamífero equilibrado podem, então, ser administradas ao paciente.

Métodos para a detecção e quantificação de apoptose são úteis para determinação da presença e nível de apoptose no preparado a ser administrado ao indivíduo na presente invenção. O número de células apoptóticas em uma população de células requerido para obter o benefício clínico
10 desejado em um indivíduo pode variar, dependendo da fonte de células, da condição do indivíduo, da idade e peso do indivíduo e outros fatores relevantes, os quais são prontamente determináveis através de métodos bem conhecidos. De preferência, o número de células apoptóticas que são administradas a um paciente é de 0,1 a 50 bilhões, mais preferivelmente 1 a 10 e,
15 ainda mais preferivelmente, 2,5 a 7,5 bilhões.

Em uma modalidade, células que sofrem apoptose podem ser identificadas por um "laddering" característico de DNA observado quando de eletroforese em gel de agarose, resultante da clivagem de DNA em uma série de fragmentos. Em outra modalidade, a expressão na superfície de fosfatidil serina sobre células pode ser usada para identificar e/ou quantificar uma
20 população de células apoptose-induzida. Medição de alterações no potencial da membrana mitocondrial, que refletem alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, é outro método reconhecido de identificação de uma população de células. Uma série de outros métodos de identificação de
25 células que sofreram apoptose e de uma população de células, muitos usando anticorpos monoclonais contra marcadores específicos para uma população de células, foram também descritos na literatura específica.

Rejeição aguda a transplante de órgãos sólidos ocorre em 30%
30 a 60% dos pacientes após transplante de pulmão e, em um grau menor, com fígado, coração, rim, etc. em virtude do sucesso de agentes imunossuppressores. A reação imune a linfócito (célula)-mediada contra antígenos de

transplante é o principal mecanismo de rejeição aguda. Uma rejeição crônica ou retardada causa destruição do enxerto em meses a anos após transplante e é caracterizada por destruição vascular que leva à necrose do tecido transplantado. Essa rejeição não é atualmente suprimida, até grande ponto, pelos regimes padrões e, assim, a necessidade de tolerância imune mais sustentável é uma necessidade não reunida significativa.

Deterioração tardia do enxerto ocorre ocasionalmente e esse tipo crônico de rejeição freqüentemente progride insidiosamente, a despeito de terapia imunossupressora aumentada. O quadro patológico difere daquele de rejeição aguda. O endotélio arterial está primariamente envolvido, com proliferação extensiva que pode gradualmente obstruir o lúmen do vaso, resultando em isquemia e fibrose do enxerto.

Imunossupressores são atualmente usados amplamente para controlar a reação de rejeição e são primariamente responsáveis pelo sucesso do transplante. Contudo, esses fármacos suprimem todas as reações imunológicas, assim, tornando a infecção devastadora que leva à causa de morte em recipientes de transplante.

O tratamento imunossupressor existente pode diferir no caso de diferentes tipos de transplantes. Aloenxertos de fígado são menos agressivamente rejeitados do que outros aloenxertos de órgãos. Por exemplo, rejeição hiperaguda a um transplante de fígado não ocorre invariavelmente em pacientes que foram pré-sensibilizados a antígenos de HLA ou incompatibilidades ABO. Terapia imunossupressora típica em adultos envolve o uso de ciclosporina, usualmente fornecida IV a 4 a 6 mg/kg/dia, começando no momento de transplante e, então, 8 a 14 mg/kg/dia p.o. quando alimentação é tolerada. As doses são ajustadas para menos se disfunção renal ocorre e os níveis no sangue são usados como medidas aproximadas de dosagem adequada.

Em transplante de coração, regimes imunossupressores são similares àqueles para transplante de rim ou fígado. Contudo, em transplantes de pulmão e coração-pulmão, rejeição aguda ocorre em >80% dos pacientes, mas pode ser gerenciada com sucesso. Os pacientes são tratados com

corticosteróides, fornecidos rapidamente IV em alta dosagem, ATG ou OKT3. ALG ou OKT3 profilático também é freqüentemente fornecido durante as primeiras duas semanas pós-transplante. Transplante de pâncreas é único dentre os transplantes de órgãos vascularizados: ao invés de ser usado para salvar uma vida, ele tenta estabilizar ou prevenir as complicações devastadoras sobre o órgão alvo de diabetes do tipo I. Em virtude do fato de o recipiente trocar os riscos da injeção de insulina pelos riscos de imunossupressão, o transplante de pâncreas geralmente tem sido limitado a pacientes que já precisam receber fármacos imunossupressores (isto é, diabéticos com insuficiência renal que estão recebendo um transplante de rim).

Pacientes com leucemia mielóide ou linfoblástica aguda podem se beneficiar de transplante de medula óssea (BMT). BMT pediátrica tem se expandido em virtude de seu potencial para cura de crianças com doenças genéticas (por exemplo, talassemia, anemia de células falciformes, imunodeficiências, erros congênitos de metabolismo). Outra opção para BMT é transplante autólogo (remoção da própria medula do paciente quando uma remissão completa tenha sido induzida, seguido por tratamento ablativo do paciente com a esperança de destruição de qualquer tumor residual e resgate da própria medula óssea do paciente). Uma vez que um auto-enxerto é usado, nenhuma outra imunossupressão é necessária que não a quimioterapia em alta dose a curto prazo usada para erradicação de tumor e ablação da medula óssea; problemas pós-transplante com GVHD são mínimos.

A taxa de rejeição é <5% em transplantes de pacientes com leucemia a partir de doadores HLA-idênticos. Para pacientes com múltiplas transfusões com anemia aplástica, a taxa de rejeição também tem sido significativamente diminuída em virtude de imunossupressão aumentada durante indução de transplante. Todavia, complicações podem surgir, incluindo rejeição pelo hospedeiro do enxerto de medula, GVHD aguda e infecções. Complicações tardias incluem GVHD crônica, imunodeficiência prolongada e recorrência da doença.

Os métodos da presente invenção também podem ser usados em cirurgia de implante, por exemplo, com cirurgia de implante comumente

realizada em cirurgia plástica cosmética ou não-cosmética. Tais implantes podem incluir dental, enxerto de gordura, por exemplo, nas bochechas, lábios e nádegas, implantes faciais, incluindo aqueles do nariz, bochecha, testa, queixo e crânio, implantes na nádega, implantes de mama, etc. Outros
 5 implantes incluem, mas não estão limitados a, anel corneal, cortical, orbital, coclear, muscular (todos os músculos, incluindo peitoral, gluteal, abdominal, panturrilha, soleus, bíceps, tríceps), articulação aloplástica e reposição óssea, raiz vertebral, implante de células-tronco ou fetais.

O desenvolvimento hematopoiético de células dendríticas (DC),
 10 células apresentando antígeno (APCs) potentes, é distinto e pode seguir diversas vias precursoras, algumas intimamente relacionadas a monócitos. DCs podem ser derivadas de um precursor linfóide. Thomas e outros (1993) J. Immunol. 150: 821-834. Assim como no sangue, podem existir três subconjuntos distintos de DCs presentes no timo: 1) DCs CD4⁺ CD11c⁻ plasmacitóides; 2) DCs CD4⁺ CD11c⁺; e 3) DCs de interdigitação.
 15

A geração de grandes números de DCs para uso clínico potencial foi recentemente realizada através da cultura *in vitro* de progenitores com citocinas. Várias estratégias têm sido adotadas para introduzir antígenos em células dendríticas, de modo que elas sejam mais eficazmente apresentadas a células T no contexto de co-estimulação. Também, foi mostrado
 20 que células dendríticas podem influenciar a resposta de células T ao antígeno para acompanhar uma via humoral ou sistêmica.

DCs são APCs que são essenciais para início de respostas imunes primárias e o desenvolvimento de tolerância. DCs expressam MHC, necessário para estimulação de populações de células T naive. O desenvolvimento hematopoiético de DCs é distinto e pode seguir diversas vias precursoras, algumas das quais estão intimamente relacionadas a monócitos. Veja, por exemplo, Avigan (1999) Blood Rev. 13: 51-64. Diferentes subconjuntos de DCs têm vias de desenvolvimento distintas. O conceito emergente é que um subconjunto de DC tem funções regulatórias que podem contribuir para a indução
 25 de tolerância a auto-antígenos. Austyn (1998) Curr. Opin. Hematol. 5: 3-15.
 30

Estudos sobre DCs em sangue foram atrasados pela escassez

de células e a falta relativa de marcadores na superfície celular DC-específicos. Métodos para isolamento de DC são baseados em alteração na maturação após um curto período de cultura, tal como a aquisição de baixa densidade flutuante ou a expressão de antígenos de ativação/maturação de DC (CD83, CMRF-44 e CMRF-56). Young e outros (1988) Cell Immunol. 111: 167; e Van Voorhis e outros (1982) J. Exp. Med. 155: 1172.

O isolamento de DCs do sangue contava anteriormente com uma multiplicidade de critérios imunofenotípicos, tais como a ausência de um painel de antígenos linhagem de leucócito (lin)-específicos (por exemplo, CD3, CD14, CD19 e CD56) e a presença de HLA-DR, CD4 ou CD33. Romani e outros (1996) J. Immunol. Met. 196: 137 151.

A partir de análises de DCs isoladas de sangue não cultivado, se tornou evidente que DCs sangüíneas não são uma população de células homogênea, mas uma mistura de pelo menos duas populações. Thomas e outros (1994). A primeira sub-população de DCs sangüíneas são DCs CD123^{bright} CD11c⁻, as quais possuem uma morfologia de plasmacitóide e potente função estimulatória de células T. A segunda sub-população de DCs sangüíneas é CD123^{dim} CD11c^{bright}, as quais são de aparência monocitóide, expressam CD45RO e se desenvolvem espontaneamente em DCs maduras típicas, mesmo quando cultivadas sem quaisquer citocinas exógenas. DCs CD123^{bright} CD11c⁻ plasmacitóides mostram algumas características, tal como a expressão da receptor de pré-células T de cadeia α , o que indica que elas podem se originar de precursores linfóides. Bruno e outros (1997) J. Exp. Med. 185: 875 884. DCs CD123^{dim} CD11c^{bright} mostram todos os critérios de DCs mielóides. DCs semelhantes à DCs CD123^{bright} CD11c⁻ plasmacitóides foram detectadas em áreas ricas em células T de tecido linfóide e foram, inicialmente, designadas erroneamente como células T plasmacitóides ou monócitos plasmacitóides em virtude de sua morfologia e fenotipo. Grouard e outros (1997) J. Exp. Med. 185: 1101-111.

Agora, foi descoberto um subconjunto de DCs e um método de análise do mesmo como um método de detecção de suscetibilidade à G-VHD, progressão e tratamento de GVHD e como um biomarcador para ECP.

A prevenção de GvHD e consequências clínicas (pelo menos parcialmente como um resultado de ECP) são refletidas na proporção de CD11c+ para CD11c- em sangue periférico e sua alteração após ECP.

Conforme demonstrado por sua identificação em um experimento clínico, esse biomarcador pode ser medido confiavelmente com pouca sofisticação requerida pelo médico, além de flebotomia. Todavia, medição citométrica de fluxo é uma técnica sofisticada e requer mais perícia técnica do que é desejável na maioria das aplicações. Os conjuntos de dados ricos derivados de experimentos de pGvHD têm criado várias oportunidades para identificar biomarcadores adicionais que se correlacionam com a presença desse subconjunto de DCs e que são mais prontamente medidos (veja abaixo).

Um biomarcador é qualquer indício do nível de expressão de um gene marcador indicado. O indício pode ser direto ou indireto e medir a super- ou sub-expressão do gene dados os parâmetros fisiológicos e em comparação com um controle interno, tecido normal ou outro carcinoma. Biomarcadores incluem, sem limitação, ácidos nucleicos (super- e sub-expressão e direto ou indireto). Uso de ácidos nucleicos como biomarcadores pode incluir qualquer método conhecido na técnica incluindo, sem limitação, medição de amplificação de DNA, RNA, micro RNA, perda de heterozigosidade (LOH), polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, Brookes (1999)), DNA microsatélite, hipó- ou hiper-metilação de DNA. Uso de proteínas como biomarcadores inclui qualquer método conhecido na técnica incluindo, sem limitação, medição da quantidade, ativação, modificações, tais como glicosilação, fosforilação, ADP-ribosilação, ubiquitinação, etc. ou imunohistoquímica (IHC). Outros biomarcadores incluem, formação de imagem, contagem de células e marcadores de apoptose.

Um ácido nucleico marcador corresponde à sequência designada por uma SEQ ID NO quando ela contém essa sequência. Um segmento ou fragmento de gene corresponde à sequência de tal gene quando ele contém uma porção da sequência em questão ou seu complemento suficiente para distinguir a mesma como sendo a sequência do gene. Um produto da expressão de gene corresponde a tal sequência quando seu RNA, mRNA,

miRNA ou cDNA se hibridiza à composição tendo tal seqüência (por exemplo, uma sonda) ou, no caso de um peptídeo ou proteína, ele é codificada por tal mRNA. Um segmento ou fragmento de um produto de expressão de gene corresponde à seqüência de tal gene ou produto da expressão de gene
5 quando ela contém uma porção do produto de expressão de gene em questão ou seu complemento suficiente para distinguir a mesma como sendo a seqüência do gene ou produto de expressão do gene.

Os métodos da invenção, composições, artigos e kits descritos e reivindicados no presente relatório descritivo incluem um ou mais genes
10 marcadores. “Marcador” ou “gene marcador” é usado por todo o presente relatório descritivo para se referir a genes e produtos de expressão de gene que correspondem a qualquer gene, a super- ou sub-expressão do qual está associada a uma probabilidade da ocorrência de GvHD ou TRM.

A presente invenção ainda proporciona microarranjos ou lascas
15 de gene para realização dos métodos descritos aqui.

A presente invenção ainda proporciona portfolios diagnósticos/prognósticos contendo reagentes adequados para medição de biomarcadores, tais como seqüências de ácido nucléico isoladas, seus complementos ou porções das mesmas de uma combinação de genes conforme descrito
20 aqui, onde a combinação é suficiente para medir ou caracterizar a expressão de gene em uma amostra biológica.

Qualquer método descrito na presente invenção pode ainda incluir medição de expressão de pelo menos um gene constitutivamente expresso na amostra.

25 A invenção ainda proporciona um método para fornecer orientação de terapia através de determinação da probabilidade de GvHD ou TRM de acordo com os métodos descritos aqui e identificação do tratamento apropriado para os mesmos.

A invenção ainda proporciona um método para fornecer um
30 prognóstico para determinação da probabilidade de GvHD ou TRM de acordo com os métodos descritos aqui e identificação do prognóstico correspondente para os mesmos.

A invenção ainda proporciona um método para descobrir biomarcadores compreendendo determinação do nível de expressão de um gene marcador, medição de um biomarcador para o gene marcador a fim de determinar a expressão do mesmo, análise da expressão do gene marcador de acordo com os métodos descritos aqui e determinação se o gene marcador é eficazmente específico para GvHD ou TRM.

A invenção ainda proporciona kits, artigos, microarranjos ou lascas de gene, portfolios diagnósticos/prognósticos para conduzir os ensaios descritos aqui e relatórios de pacientes para reportar os resultados obtidos através dos presentes métodos.

Descobriu-se que a mera presença ou ausência de seqüências de ácido nucléico particulares em uma amostra tecidual raramente tem valor diagnóstico ou prognóstico. Informação sobre a expressão de várias proteínas, peptídeos ou mRNA, por outro lado, vem sendo crescentemente considerada como importante. A mera presença de seqüências de ácido nucléico tendo o potencial de expressar proteínas, peptídeos ou mRNA (tais seqüências referidas como "genes") dentro do genoma em si não é determinante se uma proteína, peptídeo ou mRNA é expresso em uma determinada célula. Se um determinado gene capaz ou não de expressar proteínas, peptídeos ou mRNA assim o faz e em que extensão tal expressão ocorre, se ocorre, é determinado por uma variedade de fatores complexos. A despeito de dificuldades na compreensão e avaliação desses fatores, ensaio da expressão de gene pode fornecer informação útil sobre a ocorrência de eventos importantes, tais como GvHD ou TRM, e outros fenômenos clinicamente relevantes. Indicações relativas do grau até o qual os genes são ativos ou inativos podem ser encontradas em perfis de expressão de gene.

Métodos preferidos para estabelecer perfis de expressão de gene incluem determinação da quantidade de RNA que é produzido por um gene que pode codificar uma proteína ou peptídeo. Isso é realizado através de PCR com transcriptase reversa (RT-PCR), RT-PCR competitiva, RT-PCR em tempo real, RT-PCR com visualização diferencial, análise de Northern Blot e outros testes relacionados. Embora seja possível conduzir essas téc-

nicas usando reações de PCR individuais, é melhor amplificar DNA complementar (cDNA) ou RNA complementar (cRNA) produzido a partir de mRNA e analisá-lo via microarranjo. Uma série de diferentes configurações de arranjos e métodos para sua produção são conhecidos por aqueles versados na técnica e são descritos, por exemplo, 5445934; 5532128; 5556752; 5242974; 5384261; 5405783; 5412087; 5424186; 5429807; 5436327; 5472672; 5527681; 5529756; 5545531; 5554501; 5561071; 5571639; 5593839; 5599695; 5624711; 5658734; e 5700637.

Tecnologias de microarranjo permitem a medição do nível de miRNA ou mRNA em estado uniforme de milhares de genes simultaneamente, proporcionando uma ferramenta poderosa para a identificação de efeitos, tais como o início ou modulação de GvHD. Duas tecnologias de microarranjo estão atualmente em amplo uso, arranjos de cDNA e oligonucleotídeo. Embora existam diferenças na construção dessas lascas, essencialmente toda a análise de dados a jusante e rendimento são os mesmos. O produto dessas análises são, tipicamente, medições da intensidade do sinal recebido de uma sonda rotulada usada para detectar uma sequência de cDNA a partir da amostra que se hibridiza a uma sequência de ácido nucléico em um local conhecido sobre o microarranjo. Tipicamente, a intensidade do sinal é proporcional à quantidade de cDNA e, assim, mRNA ou miRNA, expresso nas células da amostra. Um grande número de tais técnicas está disponível e útil. Métodos preferidos podem ser encontrados em 6271002; 6218122; 6218114; 6004755; e Keene e outros (2006) RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts Nature Protocols 1: 302-307.

Análise dos níveis de expressão é conduzida comparando tais intensidades de sinal. Isso é feito melhor através de geração de uma matriz de proporção das intensidades de expressão de genes em uma amostra de teste versus aquela em uma amostra de controle. Por exemplo, as intensidades de expressão de gene de um tecido doente podem ser comparadas com as intensidades de expressão geradas de tecido normal do mesmo tipo. Uma proporção dessas intensidades de expressão indica a alteração na ex-

pressão de gene entre amostras de teste e de controle.

A seleção pode ser baseada em testes estatísticos que produzem listas graduadas relacionadas à evidência de significância para expressão diferencial de cada gene entre fatores relacionados à GvHD ou TRM.

5 Exemplos de tais testes incluem ANOVA e Kruskal-Wallis. As classificações podem ser usadas como pesos em um modelo projetado para interpretar a soma de tais pesos, até um corte, como a preponderância de evidência a favor de uma classe com relação à outra. Evidência anterior, conforme descrito na literatura, também pode ser usada para ajustar os pesos.

10 Perfis de expressão de gene podem ser visualizados em uma série de formas. A mais comum é dispor intensidades de fluorescência bruta ou matriz de proporção em um dendograma gráfico onde as colunas indicam amostras de teste e as fileiras indicam genes. Os dados são dispostos de modo que genes que têm perfis de expressão similares estejam próximos uns dos outros. A proporção de expressão para cada gene é visualizada como uma cor. Por exemplo, uma expressão de menos de um (sub-regulação) aparece na porção azul do espectro, enquanto que uma proporção maior do que um (super-regulação) aparece na porção vermelha do espectro. Programas de software de computador comercialmente disponíveis
15 estão disponíveis para visualizar tais dados, incluindo "GeneSpring" (Silicon Genetics, Inc.) e "Discovery" e "Infer" (Partek, Inc.).
20

No caso de medição de níveis de proteína para determinar expressão de gene, qualquer método conhecido na técnica é adequado, contanto que ele resulte em especificidade e sensibilidade adequadas. Por exemplo, os níveis de proteína podem ser medidos através de ligação a um anticorpo ou fragmento de anticorpo específico para a proteína e medição da quantidade de proteína anticorpo-ligada. Anticorpos podem ser rotulados através de reagentes radioativos, fluorescentes ou outros detectáveis para facilitar a detecção. Métodos de detecção incluem, sem limitação, ensaio
25 imunoabsorvente enzima-ligado (ELISA) e técnicas de imunoblot.
30

Os perfis de expressão de gene da presente invenção podem também ser usados em conjunto com outros métodos diagnósticos não ge-

néticos úteis em diagnóstico, prognóstico ou monitoramento de tratamento. Por exemplo, em algumas circunstâncias, é benéfico combinar o poder diagnóstico dos métodos baseados em expressão de gene descritos acima com dados de marcadores convencionais, tais como marcadores de proteína no soro. Em tal método, sangue é periodicamente coletado de um paciente e, então, submetido a um imunoensaio enzimático para marcadores no soro, tal como albumina. Quando a concentração do marcador sugere a probabilidade de GvHD ou TRM, uma fonte de amostra passível de análise de expressão de gene é tomada. Essa abordagem pode ser particularmente útil quando

5 10 15 20 25 30

testagem adicional produz resultados ambíguos.

Kits feitos de acordo com a invenção incluem ensaios formatados para determinação da expressão de biomarcador. Esses podem incluir todos ou alguns materiais necessários para conduzir os ensaios, tais como reagentes e instruções e um meio através do qual biomarcadores são ensaiados.

Os artigos da presente invenção incluem representações da expressão de biomarcador úteis para o tratamento, diagnóstico, prognóstico e, de outro modo, avaliação de doenças. Essas representações de perfil são reduzidas para um meio que pode ser automaticamente lido por uma máquina, tal como meios legíveis em computador (magnéticos, ópticos e semelhantes). Os artigos podem também incluir instruções para avaliação dos perfis de expressão de gene em tais meios. Por exemplo, os artigos podem compreender um CD ROM tendo instruções de computador para comparação de perfis de expressão de gene dos portfolios de genes descritos acima. Os artigos também podem ter perfis de expressão de gene digitalmente registrados nos mesmos, de modo que eles podem ser comparados com dados de expressão de gene de amostras de um paciente. Alternativamente, os perfis podem ser registrados em um formato representacional diferente. Um registro gráfico é um de tais formatos. Algoritmos de agrupamento, tais como aqueles incorporados nos softwares "DISCOVERY" e "INFER" da Par-

15 20 25 30

tek, Inc. mencionados acima podem auxiliar melhor na visualização de tais dados.

Diferentes tipos de artigos de fabricação de acordo com a inven-

ção são meios ou ensaios formatados usados para revelar perfis de expressão de gene. Esses podem compreender, por exemplo, microarranjos nos quais complementos de seqüência ou sondas são afixadas a uma matriz à qual as seqüências indicativas de genes de interesse se combinam, criando uma determinante legível de sua presença. Alternativamente, artigos de acordo com a invenção podem ser feitos em kits de reagentes para conduzir hibridização, amplificação e geração de sinal indicativa do nível de expressão dos genes de interesse para prever GvHD ou TRM.

Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar, mas não limitar, a invenção reivindicada. Todas as referências citadas aqui são aqui incorporadas por referência.

Exemplo 1

I. Candidato 1 a Biomarcador: subconjuntos de células dendríticas de sangue periférico: (biomarcador previsível de doença, mecanismo de ação de biomarcador (MOA), biomarcador de eficácia de tratamento)

Análise citométrica de fluxo de amostras de sub-estudo de um experimento de prevenção de GvHD mostrou uma diferença estatisticamente significativa na proporção de células dendríticas CD11c+ e CD11c- (células mononucleares lin-/HLADR+, expressas como uma fração de células mononucleares) no sangue periférico de pacientes que sofreram GvHD de grau dois, três ou quatro comparado com pacientes que desenvolveram nenhuma ou apenas GvHD branda ("sem GvHD", grau zero ou um). Os resultados são mostrados nas Tabelas 1 e 2. A Figura 1 esboça o experimento e a Figura 2 mostra fenotipificação citométrica de PBMC.

25 Tabela 1

		% de HLA-DR+/CD11C+		% de HLA-DR+/CD11C-	
Linha de base	GvHD	23,7 ± 21,00	P = 0,001	73,1 ± 22,11	P = 0,002
	Sem GvHD	45,6 ± 11,81		51,1 ± 12,20	
Pós-ECP	GvHD	34,5 ± 24,91	P = 0,011	63,2 ± 25,30	P = 0,008
	Sem GvHD	53,7 ± 11,63		43,1 ± 10,51	

Fio examinado, sangue de um subconjunto de 32 pacientes tratados com ECP para identificar marcadores na superfície celular de sangue periférico que poderiam prever GvHD e TRM. Amostras foram extraídas imediatamente antes de ECP (na linha de base) e imediatamente após ECP, mas antes de condicionamento mieloablativo, então, avaliadas através de citometria de fluxo. Dados de citometria foram agrupados e modelados para avaliar sua precisão prognostica sozinhos ou em combinação com valores clínicos de laboratório. Regressão logística mostrou que marcadores para subconjuntos de DC específicos presentes antes de mieloablação eram os melhores indicadores dos resultados. A probabilidade de GvHD de grau II-IV (aGvHD) aumenta quando células mielóides lin- HLA-DR+ CD11c⁺ de linha de base compõem uma proporção menor de células Lin- HLA-DR+ em circulação com uma precisão prognostica, refletida na área sob a curva de receptor-operador (ROC) de 0,83. O melhor modelo prognóstico para TRM foi uma menor abundância absoluta de DCs plasmacitóides lin- HLA-DR+ CD123+ em circulação na linha de base (ROC = 0,86). Nenhum poder prognóstico adicional surge com relação a aGvHD ou TRM após inclusão de valores de laboratório. Contudo, modelos que combinam determinados resultados clínicos de laboratório e fatores demográficos também prevêem esses resultados clínicos e oferecem uma possível alternativa a ensaios citométricos complexos. O melhor de tais modelos incluía medições de linha de base da proporção de BUN/creatinina, albumina no soro e os dados de compatibilidade/relação do doador do enxerto e do recipiente (ROC = 0,82, n = 59) para TRM, enquanto que as contagens de neutrófilos de linha de base eram mais prognósticas de aGvHD (ROC = 0,69, n = 60). Em suma, foram identificados biomarcadores, incluindo subconjuntos de DCs do hospedeiro, testes clínicos prontamente medidos e fatores demográficos que, pelo menos em pacientes que receberam ECP, estão presentes antes de condicionamento e podem prever resultados.

Quando contagens de células DC absolutas são considerados, se torna evidente que a contribuição relativa de DCs CD11 c⁺ e CD11 c⁻ para uma determinada população de células de sangue periférico pode ser um

indicador do eventual desenvolvimento de GvHD nesse paciente. Especificamente, a proporção de células DC CD11c+ para CD11c- em uma determinada amostra do paciente de desvio daquela de um paciente que não desenvolve subsequentemente GvHD grave (grau 2 a 4) para tão baixo quanto 0,006 em pacientes que desenvolvem depois GvHD grave.

Padrões nos dados ilustram a rigorosidade desse biomarcador. Embora as contagens absolutas mostradas abaixo sejam pequenas em uma base por microlitro, os resultados são reproduzíveis em termos de contagem absoluta e proporção quando considerando contagens das populações CD123+/- relacionadas. Essa comparação mostra uma duplicação considerável nas contagens absolutas de marcador (-) e uma forte relação entre populações CD123- e CD11c-. Na verdade, as populações Lin-/HLA-DR+/CD11c- e Lin-/HLA-DR+/CD123- são altamente correlacionadas em amostras pré- e pós-ECP (coeficientes de correlação de Pearson $r = 0,95$ e $0,985$, respectivamente), sugerindo que essas medições podem representar a mesma população de células. Além disso, essas contagens absolutas estão em concordância com contagens de DC previamente reportadas em populações normais e com GvHD. Essa pesquisa é única pelo fato de que ela examina populações CD11c- e CD123-, enquanto que a maioria dos estudos examina as populações antígeno-positivas mais maduras de DC. Assim, foi identificada uma nova população de DCs relacionadas a um resultado clínico.

Tabela 2

Valores absolutos de DC pré-ECP

Grau de GvHD	HLA-DR+/CD123+	HLA-DR+/CD123-	HLA-DR+/CD11c+	HLA-DR+/CD11c-	HLA-lin	WBS abs.
0	7	15	10	12	670	3300
0	5	12	9	8	401	2400
0	1	8	3	6	383	1200
0	2	15	9	8	947	3200
0	4	11	6	8	847	5800
0	3	4	3	4	252	3500
0	3	6	5	4	462	1600

Grau de GvHD	HLA-DR+/CD123+	HLA-DR+/CD123-	HLA-DR+/CD11c+	HLA-DR+/CD11c-	HLA-lin	WBS abs.
0	5	19	16	6	1290	2300
0	0	2	1	1	597	3000
0	5	5	3	7	578	5300
0	3	17	15	5	672	4700
1	5	18	9	14	984	4600
1	4	8	6	6	585	3800
1	5	7	5	7	942	2700
1	1	103	44	59	1643	8300
2	7	19	11	15	332	2200
2	4	34	13	25	492	6000
2	31	27	7	50	1085	2700
2	2	15	2	14	2845	10900
2	1	6	5	2	1502	3500
2	0	267	7	260	1288	3700
2	3	11	4	9	832	3300
3	0	2	1	1	1140	3700
3	1	4	1	3	499	5200
3	2	7	3	5	779	4100
3	1	487	3	485	1705	3500
3	163	25	4	187	2415	11500
4	0	2	0	2	274	11900
4	1	29	5	23	611	8600
4	0	4	3	1	281	2300
4	2	24	3	23	422	1500
4	1	9	3	8	352	4000

Uma plotagem da proporção de DCs Cd11c+ para CD11c- versus o grau de GvHD revela uma correlação entre a proporção e a eventual gravidade de GvHD em um paciente (Figura 3). As Figuras 4-6 mostram perfis de DC prognósticos de TRM.

- 5 Outros padrões incluem uma propensão para que essa proporção se desvie para positivo após tratamento com ECP e para os pacientes com uma proporção pré-BMT mais próxima de um tendo menor mortalidade (2 mortes em 0-1 vs. Cinco no grupo 2-4). Nem a variabilidade da medição,

nem a relação do doador para o recipiente parecem se correlacionar com o grau de GvHD, sugerindo ainda que características recipiente-específicas acionam a propensão à GvHD.

Proporções de DC1/DC2 e a proporção relativa de DCs imaturas foram propostas como indicadores prognósticos de progressão de doença e resultados de tratamento em numerosas condições relevantes, incluindo síndrome de Sezary, transplante de órgãos sólidos e de medula óssea, incluindo GvHD, tumores sólidos, dermatite atópica, doença inflamatória do intestino e infecção viral sistêmica.

O número de DCs antígeno-negativas se correlaciona bem com populações de células B ativadas. O número de DCs CD11c- e, provavelmente, o número de CD123-, se correlaciona com CD19+/CD27+ e CD19+/CD40+ ($r = 0,91$ e $0,8$, respectivamente) e menos com a contagem de células CD19+/CD20+B totais ($r = 0,64$) através de todos os participantes do sub-estudo. Esses dados mostram que o número absoluto de DCs CD11c-/CD123- em circulação reflete o grau de ativação de células B, uma consideração relevante em GvHD.

Exemplo 2

II. Candidatos 2 e 3 a biomarcadores, GGT no soro e LDH (biomarcadores para prognóstico de doença, MOA, eficácia de tratamento)

Usando a proporção CD11c+/CD11c-, dados de um laboratório central foram examinados para correlações da proporção de subconjunto de DC e gravidade de GvHD. Duas novas correlações emergiram a partir de amostras pré-transplante, GGT e LDH elevados no soro. Elevação nesses marcadores, junto com contagens de plaquetas significativamente diminuídas, permitem a discriminação de indivíduos que depois sofreram de GvHD de grau alto daqueles com GvHD de grau zero e um em amostras de linha de base e pós-ECP.

Dado sua derivação a partir de proporção de CD11c, esses marcadores de laboratório central vão de encontro a todos os critérios descritos para o marcador citométrico de fluxo, mas têm a vantagem adicional de serem prontamente medidos e interpretados. GGT é amplamente usado como

um marcador para dano hepático em cirrose e outros distúrbios hepáticos e LDH é, tipicamente, considerado uma medida de lise celular. Dado que esses marcadores estão elevados em pacientes pré-transplante e parecem se correlacionar com um fator de risco previamente identificado para GvHD (baixa contagem de plaquetas), eles podem proporcionar uma vantagem adicional com relação à medição citométrica de fluxo descrita acima.

Capacidade diagnóstica de GvHD:

Essas observações representam o primeiro marcador ou conjunto de marcadores prognósticos para o início e gravidade de GvHD aguda. Um laboratório qualificado pode realizar prontamente citometria de fluxo com quantificação absoluta ou relativa de subconjuntos de DC para prever o início de doença. Alternativamente, o uso de contagens de monócitos e neutrófilos em combinação com outros marcadores de suscetibilidade pode intensificar o prognóstico e orientar terapia após transplante de medula óssea.

O uso desses subconjuntos de células prognósticas em combinação com outros diagnósticos pode permitir a identificação de analitos co-variáveis (isto é, constituintes do plasma ou soro ou outros marcadores biológicos) que são prognósticos ou aumentam o poder prognóstico de subconjuntos de DC. Essa observação e subsequente diagnóstico também são relevantes e são aplicáveis, em geral, para todos os pacientes que receberam transplantes de medula óssea.

Exemplo 3

Análise por regressão logística é usada para identificar pacientes de alto risco (morte por transplante e GvHD de Grau II-IV) aos quais foi fornecida ECP, usando marcador de linha de base, variáveis de laboratório e demográficas para prever o resultado. Informação demográfica foi coletada de 62 subconjuntos, 13 indivíduos tiveram uma morte relacionada a transplante e 22 indivíduos tiveram GvHD aguda de grau III/IV. GvHD aguda de grau III/IV estava ausente em um indivíduo, esse indivíduo não estava nos subconjuntos de marcador. O número de indivíduos com valores de laboratório varia em virtude de dados que faltam. O subconjunto de pacientes com valores de marcador coletados tinha um número total de 23 pacientes, 9 in-

divíduos tiveram uma morte relacionada a transplante e 15 indivíduos tiveram GvHD aguda de grau III/IV.

Valores de marcador n = 32

O subconjunto de pacientes com valores de marcador de linha de base foi avaliado para determinar se qualquer um dos valores de marcador contribua para o prognóstico de cada um dos resultados (morte pelo transplante e GvHD de Grau II-IV). As variáveis fornecidas nas Tabelas 3 e 4 são os melhores indicadores dentre todas as variáveis de marcador coletadas. Os valores de marcador foram colocados no modelo como variáveis contínuas.

Tabela 3

Resultado: MORTE PELO TRANSPLANTE					
Indicador: marcadores					
Modelo	n	proporção de chances	estimativa	p-valor*	ROC**
p_HLAmDRsCD123s	32	1,07	0,0715	0,06	0,79
p_HLAmDRsCD11cs	32	1,06	0,0538	0,03	0,80
p_HLAmDRsCD123m	32	0,94	-0,0639	0,08	0,76
p_HLAmDRsCD11cm	32	0,95	-0,0492	0,03	0,79
HLAmDRsCD123s	32	1,76	0,5673	0,04	0,78
HLAmDRsCD123cs	32	1,90	0,6397	0,02	0,86

*p-valor de qui-quadrado de Wald para coeficiente do modelo.

ROC = Área sob a curva de receptor-operador (sensibilidade vs. 1-especificidade)

() indica a proporção de chances inversa.

Tabela 4

Resultado: GvHD de grau II-IV					
Indicador: marcadores					
Modelo	n	proporção de chances	estimativa	p-valor*	ROC**
p_HLAmDRsCD11cs	32	1,08	0,074	0,01	0,83
p_HLAmDRsCD11cm	32	0,94	-0,067	0,01	0,80
HLAmDRsCD11cs	32	1,27	0,241	0,05	0,75

*p-valor de qui-quadrado de Wald para coeficiente do modelo.

ROC = Área sob a curva de receptor-operador (sensibilidade vs. 1-especificidade)

() indica a proporção de chances inversa.

- 5 Nesse subconjunto de pacientes, o melhor indicador de morte em virtude de transplante é uma diminuição em HLA_mDRsCD123cs. O melhor indicador de GvHD de Grau II-IV é uma diminuição em p_HLA_mDRsCD11cs.

Valores de laboratório e demográficos N = 62

- 10 Todos os pacientes que receberam ECP foram analisados para determinar se qualquer um dos valores de laboratório ou valores demográficos de linha de base contribuíam para o prognóstico de cada um dos resultados. Modelos foram selecionados como o “melhor” modelo baseado no nível de significância determinado pela diferença no modelo saturado e no valor de probabilidade -2 log dos modelos básicos. Os resultados do “melhor” modelo são apresentados nas Tabelas 5-10.

O melhor modelo para prever morte por transplante continha as variáveis L_BUN_CREATININA_PROPORÇÃO, L_ALBUMINA_G_DL_ e Não compatível vs. compatível.

20 Tabela 5

Resultado: MORTE PELO TRANSPLANTE			
Resultados do melhor modelo*			
Indicadores no Modelo	proporção de chances	estimativa	p-valor**
L_BUN_CREATININA_PROPORÇÃO	0,83 (1,20)	-0,1849	0,01
L_ALBUMINA_G_DL_	8,84	2,1794	0,06
Não compatível	4,93	0,7983	0,08

**p-valor de qui-quadrado de Wald.

() indica a proporção de chances inversa.

O melhor modelo para prognóstico de GvHD de Grau II-IV contém apenas a variável L_NEUTRÓFILO_.

Tabela 6

Resultado: GvHD DE GRAU II-IV			
Resultados do melhor modelo*			
Indicadores no Modelo	proporção de chances	estimativa	p-valor**
L_NEUTRÓFILO_	0,386	1,039	0,03

*AUC = 0,69, n = 60 (estava faltando o resultado de um indivíduo para GvHD de grau II-IV)

**p-valor de qui-quadrado de Wald.

5 Resultados: valores de laboratório e linha de base

As tabelas precedentes foram extraídas dos seguintes dados.

Tabelas 7 e 8

Valor de marcador			Morte n = 9	Nenhum n = 23	Total n = 32
HLAmDRsCD11cs	<= 3	n	8,0	5,0	13,0
		%	88,9	21,7	40,6
	3-5	n	1,0	5,0	6,0
		%	11,1	21,7	18,8
	5-9	n	0	7,0	7,0
		%	0	30,4	21,9
	9 <	n	0	6,0	6,0
		%	0	26,1	18,8
CD3mCD16sCD56s	<= 110	n	5,0	4,0	9,0
		%	5,6	17,4	28,1
	110-206	n	2,0	6,0	8,0
		%	22,2	26,1	25,0
	206-385	n	1,0	8,0	9,0
		%	11,1	34,8	28,1
	> 385	n	1,0	5,0	6,0
		%	11,1	21,7	18,8

Resultados: valores de laboratório e linha de baseTabelas 9 e 10

Valores de laboratório e linha de base			Morte n = 13	Nenhum n = 49	Total n = 62
L_BUN_CREATINI- NA_PROPORÇÃO	<= 11	n	3,0	12,0	15,0
		%	23,1	24,5	24,2
	11-14	n	0	15,0	15,0
		%	0	30,6	24,2
	14-19	n	3,0	14,0	17,0
		%	23,1	28,6	27,4
	> 19	n	6,0	6,0	12,0
		%	46,2	12,2	19,4
	faltando	n	1,0	2,0	3,0
		%	7,7	4,1	4,8
L_ALBUMINA_G_DL_	< = 3,9	n	6,0	10,0	16,0
		%	46,2	20,4	25,8
	3,9-4,15	n	4,0	11,0	15,0
		%	30,8	22,4	24,2
	4,51-4,5	n	2,0	16,0	18,0
		%	15,4	32,7	29,0
	> 4,5	n	1,0	12,0	13,0
		%	7,7	24,5	21,0
compatível vs. Não compatível	compatível	n	11,0	22,0	33,0
		%	84,6	44,9	53,2
	compatível	n	2,0	27,0	29,0
		%	15,4	55,1	46,8

Resultados: GVHD de grau 2-4

Valor de marcador			GvHD n = 15	Nenhum n = 17	Total n = 32
p_HLAmDRsCD11cs	<= 20,6	n	8,0	0	8
		%	53,3	0	25
	20,6-35,44	n	4,0	4,0	8
		%	26,7	23,5	25
	35,44-46,67	n	1,0	7,0	8
		%	6,7	41,2	25
	> 46,67	n	2,0	6,0	8
		%	13,3	35,5	25
	Valor de laboratório		GvHD n = 22	Outros n = 39	Total n = 61
	L_NEUTRÓFILO_<= 42,1	n	7,0000	4,0000	11,0000
		%	31,8000	10,300	18,0000
	42,1-57,65	n	6,0000	9,0000	15,0000
		%	27,3000	23,1000	24,6000
L_NEUTRÓFILO_	57,65-70,45	n	5,0000	9,0000	14,0000
		%	22,7000	23,1000	23,0000
	> 70,45	n	4,0000	16,0000	20,0000
		%	18,2000	41,0000	32,8000
	faltando	n	0	1,0000	1,0000
		%	0	2,6000	1,6000

Nota: dados de GvHD faltando em um indivíduo

Exemplo 4

- Transplante de medula é um tratamento geralmente aceito para
- 5 pacientes sofrendo de leucemia ou outras anomalias genéticas que ameaçam a vida. Infelizmente, 20-50% dos recipientes de transplante de células-tronco hematopoiéticas alogeneicas sucumbem à doença enxerto versus hospedeiro, a qual é um ataque mediado por células T do doador sobre os tecidos do recipiente. Atualmente, prevenção de GvHD conta grandemente
- 10 com imunossupressão global (CSA, etc.) dirigida contra células T. depleção

de células T da população do doador diminui significativamente as reações de enxerto versus hospedeiro, mas compromete, adicionalmente, o enxerto, inibe a erradicação de células malignas no recipiente e compromete a reconstituição de imunidade ao doador (*torna o recipiente suscetível a recorrência de leucemia*).

Em virtude de seus efeitos imunomodulatórios, foi mostrado que ECP proporciona proteção benéfica (salva vidas) em várias doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo linfoma de células T cutâneas, escleroderma, artrite reumatóide, rejeição a transplante, GvHD aguda e crônica. Acredita-se que pré-tratamento de pacientes com BMT com ECP funciona através de modulação do compartimento de células que apresentam antígeno. Mais especificamente, células dendríticas (DCs) no enxerto e no recipiente podem ser responsáveis pela estimulação de rejeição ao transplante de BM alogênico. Maturação de DCs é uma etapa importante para a estimulação de rejeição ao transplante. Para avaliar se ECP tem um efeito imunomodulatório sobre as células imunes (células T, células NK e DCs), esse sub-estudo foi conduzido para monitorar alterações fenotípicas no compartimento de células imunes. Amostras de sangue são coletadas de cada paciente antes de e subsequente à fototerapia, mas antes de irradiação do corpo todo (TBI). Uma terceira amostra de sangue é coletada por ano após recebimento do transplante.

Objetivo do estudo

Estudar o efeito imunomodulatório de ECP com UVADEX® sobre o compartimento de células dendríticas e células T no sangue periférico de pacientes que receberam regime de condicionamento mieloablativo padrão historicamente comparado com o regime de condicionamento mieloablativo padrão apenas sobre a incidência de GvHD aguda e crônica em pacientes que sofreram BMT alogênico de irmãos ou não relacionado ou transplante de células-tronco de sangue periférico (PBSCT) para tratamento de malignidades hematológicas.

Design de estudo e tamanho de amostra

Esse sub-estudo multicentro determina os efeitos imunomodula-

tórios de ECP com UVADEX® sobre os compartimentos de células dendríticas de sangue periférico, células T e células NK em pacientes que receberam ECP, seguido por um regime de condicionamento mieloablativo de ciclofosfamida e TBI imediatamente antes de transplante de medula óssea. Apenas pacientes que correspondiam aos critérios de inclusão para experimento de pGvHD e que forneceram consentimento por escrito para esse sub-estudo são incluídos. O tamanho de amostra, portanto, é dependente do número de pacientes arrolados no experimento de pGvHD que forneceram consentimento por escrito.

Aproximadamente 5-6 centros participaram no estudo de prevenção de GvHD. Aproximadamente 10 pacientes por centro receberam ECP para um total de 50-60 pacientes arrolados no estudo de prevenção de GvHD e é esperado que aproximadamente 20-30 pacientes venham a fornecer consentimento por escrito para participar desse sub-estudo clínico. Os pacientes participaram desse sub-estudo durante 365 dias.

Explicação específica de procedimentos de estudo

Tempo de amostragem

De forma a realizar esse sub-estudo, um total de 3 amostras de sangue por paciente é coletado nos seguintes pontos de tempo:

- Amostra PT1: extraída no Dia -21 ao Dia -10 antes de tratamentos de ECP
- Amostra PT2: extraída no Dia 7 pós-recebimento do transplante
- Amostra PT3: extraída no Dia 365 pós-recebimento do transplante

Sangue do paciente é coletado em tubos Vacutainer heparinizados rotulados com o número do paciente, número da visita, data e momento exato de coleta do sangue. As amostras de sangue são transportadas via distribuição noturna para a Esoterix, Inc. (Tennessee). Leucócitos são separados do sangue íntegro via gradientes de Ficoll. Células mononucleares são reagidas com anticorpos fluorescentemente rotulados específicos para várias linhagens, ativação e marcadores de diferenciação. Os painéis utilizados

para amostras de sangue de imunotipo do paciente incluirão, mas não estarão limitados a, anticorpos específicos para células T, células NK e células dendríticas. Análise dos níveis de expressão de antígeno é realizada através de citometria de fluxo sobre um Becton Dickinson FACScan.

5 Procedimento Técnico

Em cada ponto de amostragem, uma amostra de 8 ml de sangue foi coletada de uma veia do antebraço via venipunção em tubos de vidro contendo heparina sódica. As amostras foram misturadas através de inversão em temperatura ambiente antes de acondicionamento em recipientes de transporte fornecidos.

Métodos estatísticos

Testagem estatística foi realizada com os dados resultantes para determinar se correlações podem ser feitas entre alterações nos fenotipos de DC, células T ou NK e resultados da doença ou tratamento.

15 Exemplo 5

Perfil de expressão de miRNA

DCs foram obtidas conforme descrito acima e miRNA foi obtido e analisado conforme anteriormente descrito. Keene e outros (2006) RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts Nature Protocols 1: 302-307. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11

	Média (Pré-ECP) *	Média (Pós-ECP)*	Média (Pré-ECP) *	Média (Pós-ECP)*
ID de Coluna	sem gvhd)	sem_gvhd)	GvHD gvjd grave)	Gvhd grave)
hsa_miR_223	12,70	11,91	11,60	13,79
hsa_miR_15b	9,76	10,55	12,88	10,68
hsa_miR_486	9,64	10,59	12,40	8,97
hsa_miR_185	8,70	10,38	11,54	9,08
hsa_miR_23a	9,62	9,16	9,32	11,58
Hsa_miR_106b	7,86	11,15	9,93	8,81
hsai_miR_92	7,16	8,29	10,39	7,92
hsa_miR_18a	6,69	9,14	7,99	6,88
hsa_miR_194	6,81	7,45	9,04	6,46

ID de Coluna	Média (Pré-ECP) *	Média (Pós-ECP)*	Média (Pré-ECP) *	Média (Pós-ECP)*
	sem gvhd)	sem_gvhd)	GvHD gvjd grave)	Gvhd grave)
mo_miR_363_3p	6,60	7,61	8,62	6,28
hsa_miR_363	6,69	7,61	8,49	6,14
hsa_miR_182	6,49	8,13	8,36	5,03
hsa_miR_27a	6,79	5,96	5,34	8,21
hsa_miR_145	6,48	5,71	5,01	8,13
hsa_miR_140	7,77	5,09	3,96	6,00
hsa_miR_130a	3,96	5,22	7,81	5,66
ambi_miR_11541	4,77	5,47	6,78	4,50
ambi_miR_3998	4,93	4,04	4,96	7,51
hsa_miR_143	5,02	3,74	3,91	7,25
hsa_miR_489	2,47	2,47	10,60	3,04
hsa_miR_101	3,06	4,44	6,50	3,75
hsa_miR 151	2,25	4,99	6,06	4,24

REIVINDICAÇÕES

1. Método de previsão do início e/ou gravidade de doença enxerto versus hospedeiro (GvHD) em um paciente compreendendo as etapas de:
 - a. obtenção de uma amostra contendo células dendríticas (DCs) do paciente;
 - b. medição de biomarcadores associados à CD11c na superfície da DC; e
 - c. determinação da proporção entre células CD11c⁺ e CD11c⁻; em que uma proporção de menos de cerca de um é indicativa da ocorrência de GvHD.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra é obtida após tratamento do paciente com células apoptóticas autólogas.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que as células são obtidas através de tratamento do paciente com fotoforese extracorporeal (ECP).
4. Método de previsão do início e/ou gravidade de doença enxerto versus hospedeiro (GvHD) em um paciente compreendendo as etapas de:
 - a. obtenção de uma amostra de soro do paciente;
 - b. medição de biomarcadores associados à γ -glutamyl transferase (GGT) e dehidrogenase de lactato (LDH); e
 - c. determinação se os níveis desses biomarcadores estão elevados, em que uma elevação desses biomarcadores antes de transplante é indicativa da ocorrência de GvHD.
5. Método de previsão do início e/ou gravidade de doença enxerto versus hospedeiro (GvHD) em um paciente compreendendo as etapas de:
 - a. obtenção de uma amostra contendo neutrófilos do paciente;
 - b. medição do número de neutrófilos em um volume conhecido; em que uma redução de neutrófilos antes de transplante é indicativa da ocorrência de GvHD.
6. Método para proporcionar orientação de terapia através de determinação da probabilidade da ocorrência de GvHD como definido na reivindicação 1, 4 ou 5 e identificação do tratamento apropriado para a

mesma.

7. Método para proporcionar um prognóstico através de determinação da probabilidade de ocorrência de GvHD de acordo com a reivindicação 1, 4 ou 5 e identificação do prognóstico correspondente para a mesma.

5 8. Kit para conduzir um ensaio de acordo com a reivindicação 1, 4 ou 5 compreendendo: reagentes de detecção de biomarcadores.

9. Microarranjo ou lasca de gene para realização do método de acordo com uma das reivindicações 1, 4 ou 5.

10 10. Método de previsão do início e/ou gravidade de mortalidade transplante-relacionada (TRM) em um paciente compreendendo as etapas de:

a. obtenção de uma amostra contendo células dendríticas (DCs) do paciente;

15 b. medição de biomarcadores associados à superfície de DCs plasmacitóides lin, HLA-DR e CD123; e
em que uma menor abundância absoluta de DCs plasmacitóides lin⁺HLA-DR⁺CD123⁺ na linha de base é indicativa da ocorrência de TRM.

20 11. Método de previsão do início e/ou gravidade de mortalidade transplante-relacionada (TRM) em um paciente compreendendo as etapas de:

a. obtenção de uma medição na linha de base de γ -glutamyl transferase e dehidrogenase de lactato no soro;

em que a elevação desses biomarcadores antes de transplante é indicativa da ocorrência de TRM.

25 12. Método para proporcionar orientação de terapia através de determinação da probabilidade da ocorrência de TRM de acordo com a reivindicação 10 ou 11 e identificação do tratamento apropriado para a mesma.

30 13. Método para proporcionar um prognóstico através de determinação da probabilidade da ocorrência de TRM de acordo com a reivindicação 10 ou 11 e identificação do prognóstico correspondente para a mesma.

14. Kit para conduzir um ensaio de acordo com a reivindicação

10 ou 11 compreendendo: reagentes de detecção de biomarcador.

15. Microarranjo ou lasca de gene para realização do método como definido na reivindicação 10 ou 11.

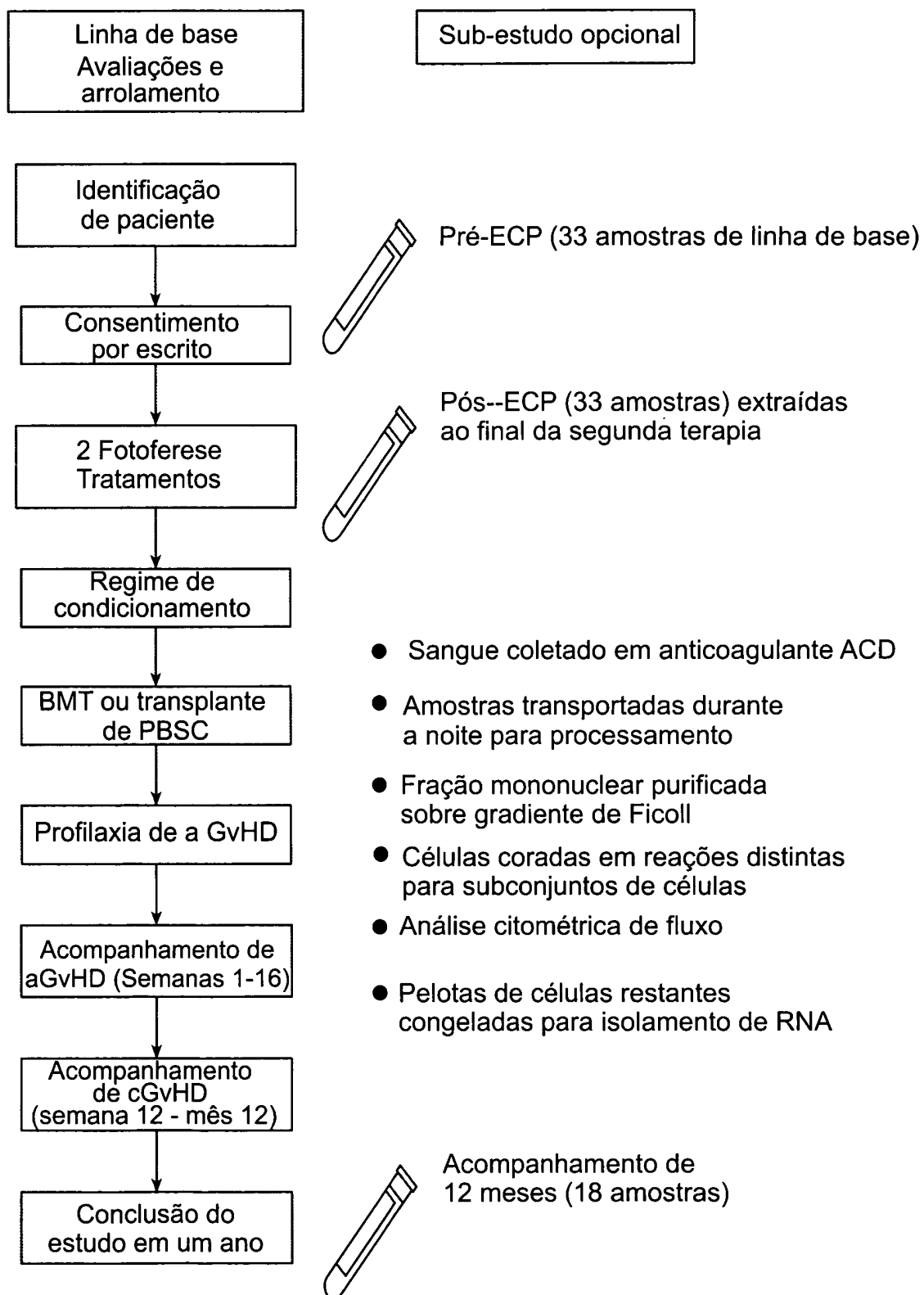
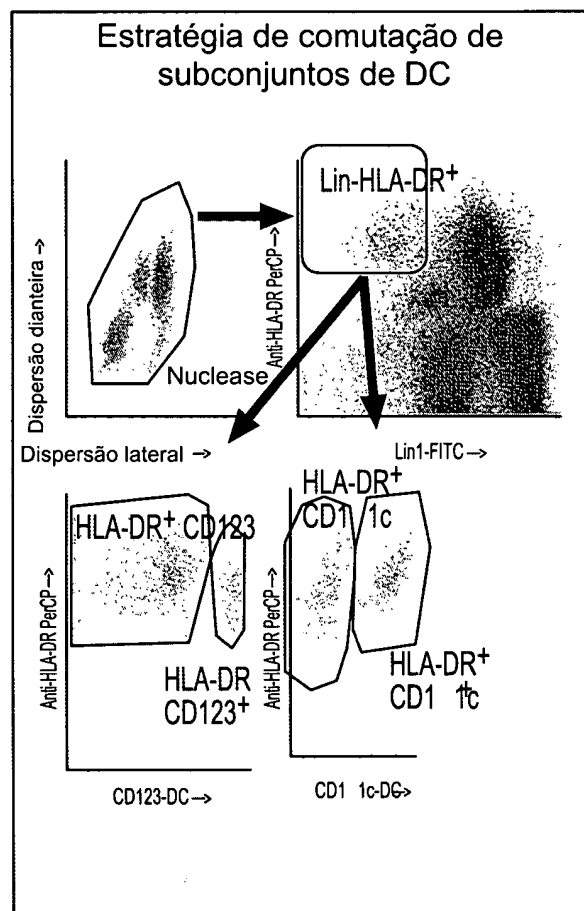
FIG. 1

FIG. 2

Tipo de célula	Marcador na superfície
Monócitos	CD14+
Linfócitos totais	
Linfócitos B	CD19+ CD20+
	CD19+ CD27+
	CD19+ CD40+
Linfócitos T	CD3+
	CD3+ CD4+
	CD3+ CD4 CD45RO+
	CD3+ CD4 HLADR+
	CD3+ CD4+ CD25+ CD62L+
	CD3+ CD4+ CD25+
	CD3+ CD4+ CD45RO+
	CD3+ CD4+ CD62L+
	CD3+ CD4+ HLADR+
Treg	CD3+ CD4+ CD25++
Células assassinas naturais	CD3+ CD4+ CD25++ CD62L+
	CD3+ CD16+
	CD3+ CD16+ CD56+
Células dendríticas	Lin HLADR+
Célula dendrítica "mDC"	Lin HLADR+ CD1 1c+
Célula dendrítica "pDC"	Lin HLADR+ CD123+

Fenotipos de célula examinados
para esse estudo



A estratégia de comutação usada para
identificar células dendríticas Lin-HLA-DR+

FIG. 3A

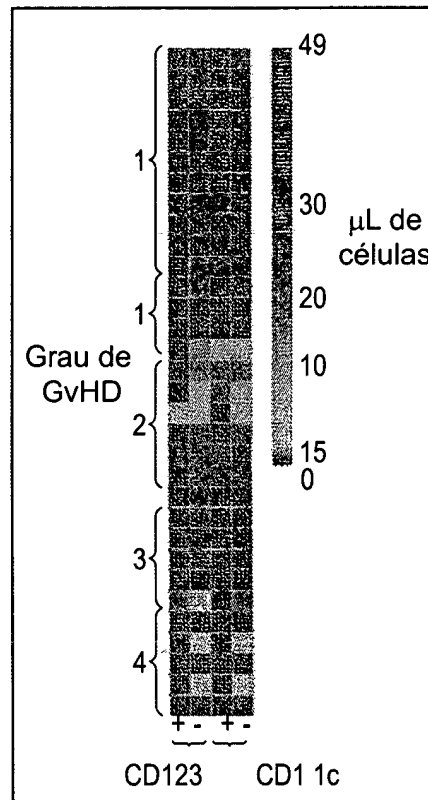


FIG. 3B

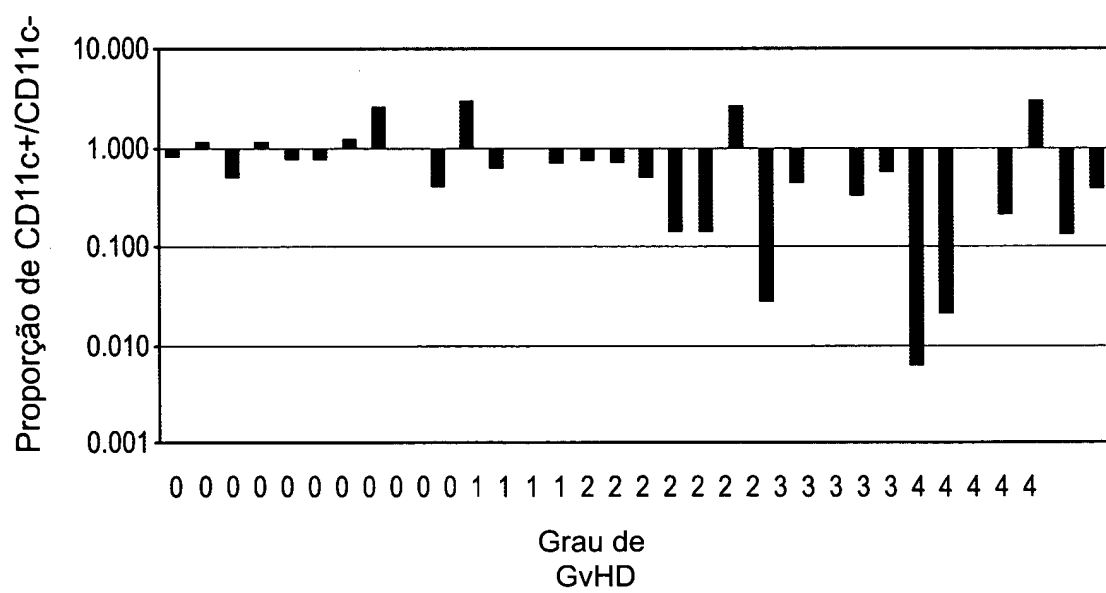


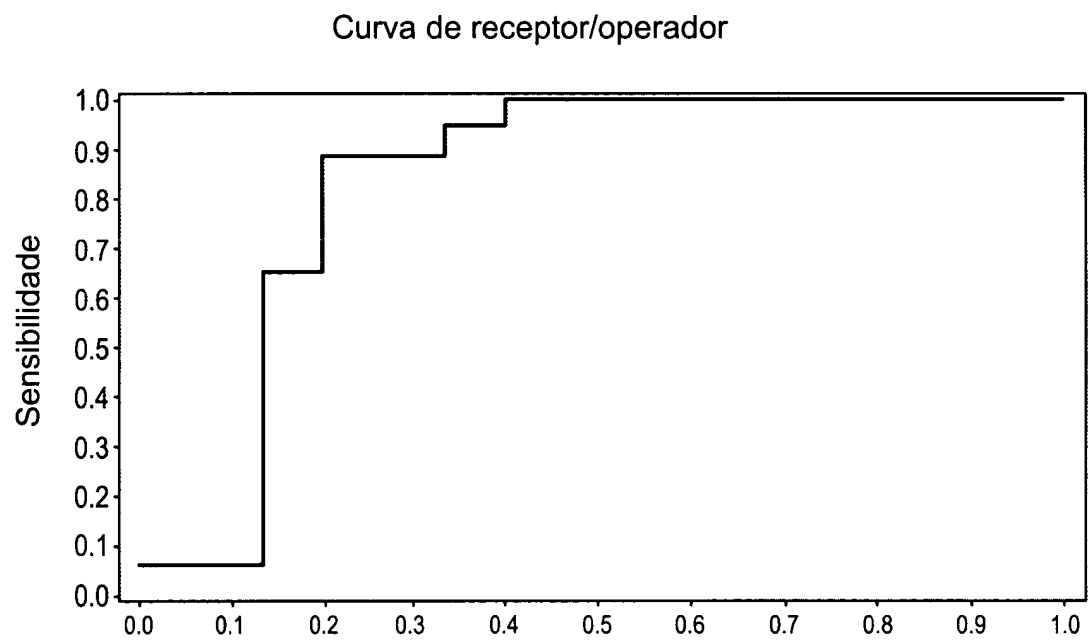
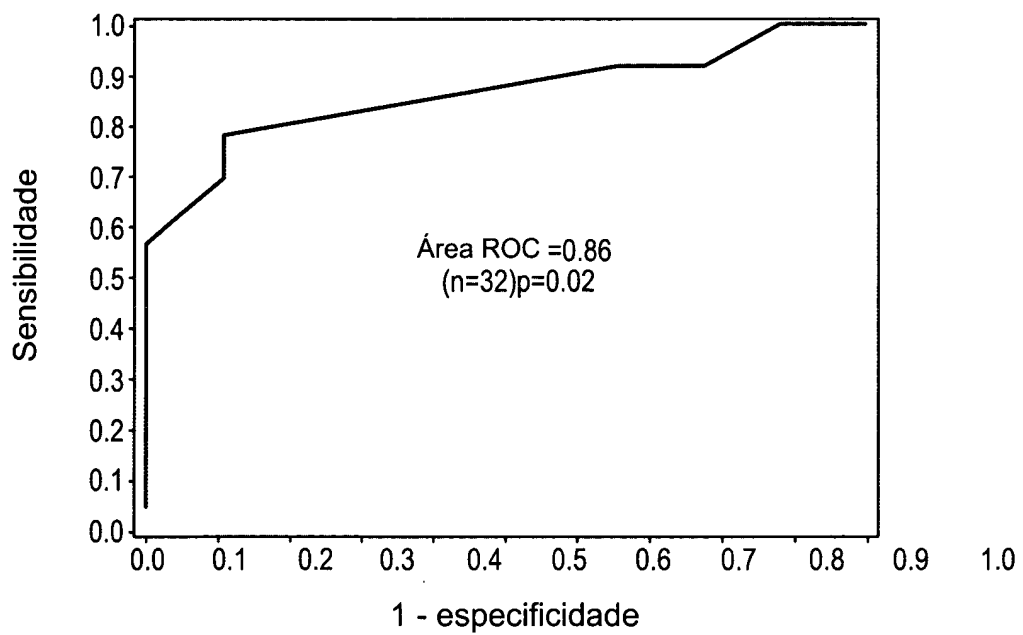
FIG. 3C

FIG. 4

A. Curva de receptor/operador para contagem absoluta de DC Cd11c+



Resultados: MORTE PELO TRANSPLANTE
Indicador: marcadores de superfície celular

Indicador	p-valor	ROC
% HLA-DR+CD123+	0.06	0.79
% HLA-DR+CD1 1c+	0.03	0.80
% HLA-DR+CD123-	0.08	0.76
% HLA-DR+CD1 1c-	0.03	0.79
Abs. Count HLA-DR+CD123+	0.04	0.78
Abs. Count HLA-DR+CD1 1c+	0.02	0.86

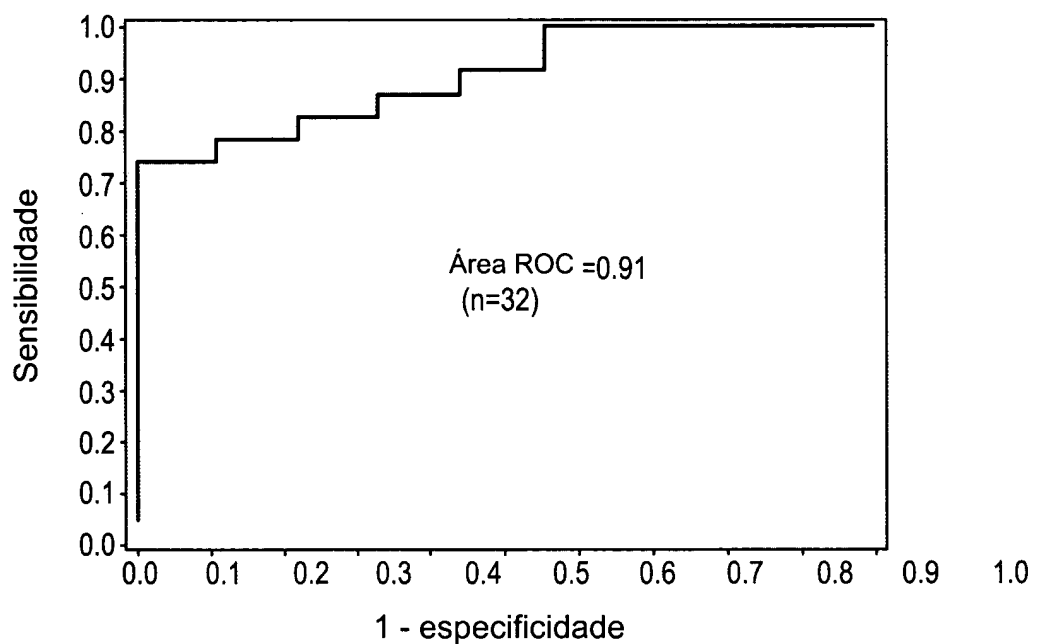
FIG. 5**5. Modelamento com múltiplos biomarcadores**

Previsão de GvHD

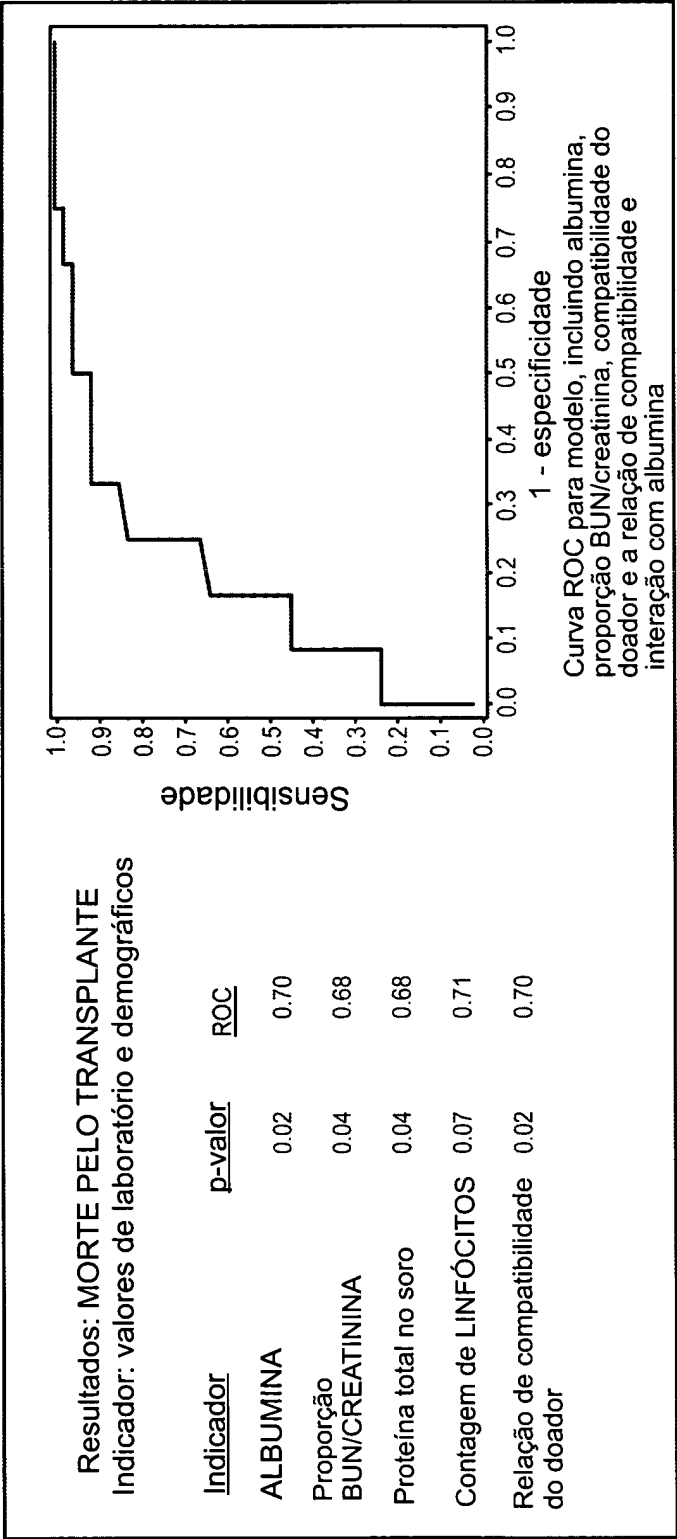
Nenhuma combinação de marcadores melhorou o poder prognóstico dos marcadores únicos já descritos

Previsão de TRM

Curva ROC para modelo, incluindo células dendríticas Lin-HLA-DR+CD11c+, células assassinas CD3-CD16+CD56+ e sua interação



o melhor indicador de TRM encontrado nesse estudo é um modelo incluindo células NK e DC CD11c+



C. Marcadores na superfície celular correlacionados e laboratório. Valores de marcador na superfície celular foram comparados com resultados de laboratório usando correlação de Pearson para modificar alterações correlacionadas em perfis de célula e valores de laboratório cruzados em amostras pré- e pós-ECP. Esses valores de laboratório podem ser substituídos úteis para ensaios citométricos e podem proporcionar “insights” sobre a fração mecânica da ECP.

p-valor	p-valor	p-valor
% CD3 CD4 CD25	BUN_CREATININA_PROPORÇÃO	0.0193
% CD3 CD4 CD25 CD62	BUN_CREATININA_PROPORÇÃO	0.0044
proporção /Cd11c	BUN_CREATININA_PROPORÇÃO	0.0034
% CD3 CD16 CD56	GGT	0.0226
% HLA-DR CD123	GGT	0.0033
% HLA-DR CD123	GGT	0.0028

FIG. 6

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS E REAGENTES PARA DETECÇÃO DE SUSCETIBILIDADE À DOENÇA ENXERTO VERSUS HOSPEDEIRO OU MORTALIDADE TRANSPLANTE-RELACIONADA"

- 5 A presente invenção proporciona métodos para determinação da probabilidade e/ou gravidade de GvHD e da probabilidade da ocorrência de mortalidade transplante-relacionada.