



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111886248 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 04

(21) 申请号 201980020251.7

(22) 申请日 2019.02.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111886248 A

(43) 申请公布日 2020.11.03

(30) 优先权数据
18158169.5 2018.02.22 EP
18189562.4 2018.08.17 EP
18194549.4 2018.09.14 EP
16/269,572 2019.02.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/054493 2019.02.22

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/162472 EN 2019.08.29

(73) 专利权人 苏黎世大学
地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 S·图格斯 B·比彻

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
专利代理师 王健

(51) Int.Cl.
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101501070 A, 2009.08.05
CN 103827143 A, 2014.05.28

审查员 陈盛峰

权利要求书2页 说明书25页
序列表2页 附图25页

(54) 发明名称

GM-CSF或GM-CSF受体的配体用于在已接受
Allo-HCT的患者中治疗恶性血液病

(57) 摘要

本文描述了与GM-CSF或与CD116、CD131和由
CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种特异性
结合的非激动剂配体,特别是抗体,用于在已
接受allo-HCT的患者中治疗白血病或用于治疗
因来自免疫学上不同的供体的造血细胞移植引
起的其他并发症的用途。

1. 与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂配体在制备一种治疗患有恶性血液病的患者的药物组合物中的用途,所述患者已接受同种异体造血干细胞移植,其中所述恶性血液病为白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤,其中所述白血病选自以下组成的组中:慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和急性单核细胞白血病,其中所述与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂配体是中和人源化抗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子抗体lenzilumab。

2. 根据权利要求1的用途,其中所述淋巴瘤为霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤。

3. 根据权利要求1至2中任一项的用途,其中所述非激动剂配体lenzilumab为由核酸所编码的蛋白质。

4. 与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂配体在制备一种治疗患有恶性血液病的患者,从而抑制移植物抗宿主病的发展或降低移植物抗宿主病的严重程度的药物组合物中的用途,其中所述患者已接受同种异体造血干细胞移植,其中所述恶性血液病为白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤,其中所述白血病选自以下组成的组中:慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和急性单核细胞白血病,其中所述与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂配体是中和人源化抗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子抗体lenzilumab。

5. 根据权利要求4的用途,其中将所述同种异体造血干细胞移植提供给所述患者以治疗恶性血液病。

6. 根据权利要求4或5的用途,其中在所述同种异体移植的同时或之后将所述lenzilumab提供给所述患者。

7. 一种核酸分子在制备用于在已接受同种异体造血干细胞移植的患者中治疗恶性血液病的药物组合物中的用途,其中所述核酸分子编码与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂蛋白配体,所述与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂蛋白配体是中和人源化抗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子抗体lenzilumab,其中所述恶性血液病为白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤,其中所述白血病选自以下组成的组中:慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和急性单核细胞白血病。

8. 根据权利要求7的用途,其中所述核酸分子为DNA分子或RNA分子。

9. 一种包含核酸分子的核酸表达构建体在制备用于在已接受同种异体造血干细胞移植的患者中治疗恶性血液病的药物组合物中的用途,其中所述核酸分子编码与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂蛋白配体,所述与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子特异性结合的非激动剂蛋白配体是中和人源化抗粒细胞巨噬细胞集落刺激因子抗体lenzilumab;其中所述核酸分子是DNA分子或RNA分子,其中所述恶性血液病为白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤,其中所述白血病选自以下组成的组中:慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病和急性单核细胞白血病。

10. 根据权利要求9的用途,其中所述表达构建体为DNA质粒。

11. 根据权利要求9的用途,其中所述表达构建体为双链线性DNA。

12. 根据权利要求9的用途,其中所述表达构建体为单链RNA和病毒。

13. 根据权利要求9的用途,其中所述表达构建体为病毒。

14. 根据权利要求9的用途,其中所述表达构建体为慢病毒、疱疹病毒、腺病毒或腺相关病毒。

GM-CSF或GM-CSF受体的配体用于在已接受Allo-HCT的患者中 治疗恶性血液病

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求欧洲专利申请号EP18158169.5(于2018年2月22日提交);EP18189562.4(于2018年8月17日提交);EP18194549.4(于2018年9月14日提交)和US16/269,572的优先权。前述专利申请的内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及与GM-CSF(CSF-2)或其由CSF2R β (CD131)和CSF2R α (CD116)组成的受体复合物特异性结合的非激动剂配体,特别是抗体,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(haematologic malignancy)。

背景技术

[0004] 对于恶性血液病患者,同种异体造血细胞移植(allo-HCT)是一种可能治愈和挽救生命的干预措施;但是,所有患者中有40%至60%会发展出具有临床意义的急性或慢性移植物抗宿主病(GvHD),其死亡率总计约为50%。供体来源的T细胞介导这两个过程:来自移植物的同种异体反应性T细胞攻击宿主的恶性细胞,产生有益的移植物抗白血病(GvL)效应;而这种同种异体反应性可以针对健康组织(通常为皮肤、肠道和肝脏),从而导致GvHD。尽管在allo-HCT之前从供体材料中去除T细胞可以预防/减轻GvHD,相应地,这是以降低移植物抗白血病(GvL)活性并增加复发率为代价的。因此,迫切需要了解如何在T细胞水平上分离GvL和GvHD的机制,并进行调节以实现临床益处。

[0005] 已尝试了大量工作来定义鼠模型中支持GvHD的关键T细胞亚群和细胞因子,但迄今为止,尚未得出一致的结论。尽管最初提出GvHD是T_H1介导的病理,但对小鼠的研究表明,缺乏T_H1细胞因子IFN γ 的供体T细胞可加剧该疾病。T_H2细胞既可以抑制实验性GvHD,又可以诱导GvHD影响肝脏和皮肤。同样,尽管有证据表明通常产生IL-17A的T细胞为炎性疾病中组织损伤的主要介体,但其在GvHD中的作用仍存在争议,因为在鼠模型中,IL-17似乎能够促进或改善GvHD,具体取决于实验条件。归纳起来,极化的T_H细胞显然与GvHD的出现和延续有关,但是到目前为止,尚不可能在鼠模型和人类中鉴定出在该疾病的发病机理中具有可重复且非冗余功能的任何特异的溶解性介体。

[0006] 基于上述现有技术,本发明的目的为提供在保持有益的GvL效应的同时减弱GvHD的手段和方法。该目的通过本申请的独立权利要求的主题来实现。

发明内容

[0007] 本发明的第一方面涉及一种治疗患有移植物抗宿主病的患者的方法,或一种在接受同种异体移植的患者中预防、抑制移植物抗宿主疾病的发生或降低移植物抗宿主疾病的发生的严重程度的方法。

[0008] 本发明的第二方面涉及治疗患有癌症(特别是恶性血液病)并已接受同种异体造

血干细胞移植(allo-HCT)的患者的方法。

[0009] 根据本发明任何方面的方法包含干扰免疫细胞因子GM-CSF触发GvHD的信号传导。这可以通过配体,特别是抗体,更特别是中和抗体抑制GM-CSF来实现。本发明的目的还可以通过干扰GM-CSF与其天然受体的结合,或通过对这些受体施用非激动剂配体,特别是通过施用针对GM-CSF受体的中和抗体来抑制信号级联来实现。另一种可能的机制为通过核酸干扰(RNAi,反义)暂时或长期抑制GM-CSF或其受体中的一种的表达。

[0010] 在特别实施方案中,本发明包括向患者施用非激动剂配体,特别是抗体,更特别地是对GM-CSF或对CD116、CD131和由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种具有反应性的中和非激动剂抗体。

[0011] 可替代地,该方面可被表述为提供选自以下的试剂:

[0012] -中和多肽配体,特别是与GM-CSF、CD116、CD131或由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种反应的中和抗体,以及

[0013] -抑制GM-CSF、CD116和/或CD131表达的核酸试剂,

[0014] 以用于在患有恶性血液病的患者中治疗或预防GvHD。

[0015] 附图简述

[0016] 图1A-1H供体T细胞在同种异体应答期间分泌GM-CSF和IFN γ

[0017] 图1A:单独用CD45.1⁺WT C57BL/6TCD-BM或与CD45.1⁺WT C57BL/6脾细胞联合进行allo-HCT后经致死性照射的CD45.2⁺BALB/c小鼠的存活率。收集4个独立实验的数据,每个实验n=5/组。对于存活曲线比较,使用Lox-rank (Mantel-Cox) 检验,***p<0.001。图1B:在allo-HCT后3天和6天,脾脏、肝脏和皮肤中活单细胞(live singlets)内CD45.1⁺细胞的频率。收集数据,n=10/组。图1C:allo-HCT后3天,小鼠肝脏的CD45.1⁺群体中产生IFN γ 、GM-CSF和IL-17A的CD4⁺和CD8⁺T细胞的频率。共有3个独立实验显示了代表性图。图1D:allo-HCT后3天和6天,肝脏、脾脏和皮肤的CD45.1⁺群体内产生IFN γ 、GM-CSF和IL-17A的CD4⁺和CD8⁺T细胞的频率。收集3个独立实验的数据,总计n=10/组。图1E:allo-HCT后6天,小鼠的血清IFN γ 和GM-CSF水平。收集3个独立实验的数据,n=2-5/组。对于均值比较,使用采用Welch校正的未配对双尾t检验,*p<0.05,**p<0.01。图1F:WT C57BL/6小鼠的T细胞与同基因(C57BL/6)或同种异体(BALB/c)脾CD11c⁺DC共培养的上清液中的IFN γ 、GM-CSF和IL-17A。收集3个独立实验的数据,n=3-5/组。对于均值比较,使用采用Welch校正的未配对双尾t检验,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。图1G:与同基因(C57BL/6)或同种异体(BALB/c)脾CD11c⁺DC共培养的C57BL/6wt、Ifng^{-/-}、Csf2^{-/-}或Il17a^{-/-}小鼠的T细胞的氚标记胸腺嘧啶的掺入量。收集3个独立实验的数据,n=2-5/组。对于均值比较,使用采用邦弗朗尼(Bonferroni)事后检验的单因素ANOVA。数据在图1B中显示为平均值+/-SD,在图1D-1G中显示为平均值+/-SEM。图1H:allo-HCT后3天和6天,肝脏和脾脏的CD45.1⁺群体中产生IFN γ 和GM-CSF的CD4⁺和CD8⁺T细胞的频率。显示了3个实验中的1个收集的代表性数据,n=3-4/组。缩写:TCD:T细胞去除、BM:骨髓、HCT:造血细胞移植、WT:野生型、Cpm:每分钟计数。

[0018] 图2A-2K GM-CSF对于完全MHC不匹配的allo-HCT后的急性GvHD很关键

[0019] 图2A:单独用WT C57BL/6TCD-BM或与C57BL/6WT Csf2^{-/-}、Ifng^{-/-}或Il17a^{-/-}小鼠的脾细胞联合进行allo-HCT后,经致死性照射的BALB/c小鼠的存活率。收集4个独立实验的数据,每个实验n=5/组。对于存活曲线比较(WT与其他组),使用Lox-rank (Mantel-Cox) 检

验, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。图2B: 单独用WT C57BL/6TCD-BM或与从C57BL/6WT或Csf2^{-/-}小鼠脾脏纯化的T细胞联合进行allo-HCT后, 经致死性照射的BALB/c小鼠的存活率。收集3个独立实验的数据, 每个实验n=5/组。对于存活曲线比较(WT与Csf2^{-/-}), 使用Lox-rank (Mantel-Cox) 检验, $***p < 0.001$ 。图2C: allo-HCT后6天, BALB/c小鼠的肝脏、小肠和皮肤的综合组织病理学评分。收集3个独立实验的数据, n=5/组。对于均值比较(WT与Csf2^{-/-}), 使用未配对双尾t检验, $*p < 0.05$ 。图2D: 用WT C57BL/6TCD-BM联合WT或Csf2^{-/-} C57BL/6小鼠的脾细胞进行allo-HCT后6天, 小鼠皮肤和小肠的苏木精和曙红染色切片的代表性图像, n=4-5/组(比例尺: 100 μ m)。图2E-2F: 用WT C57BL/6TCD-BM联合来自WT或Csf2^{-/-} C57BL/6小鼠的脾细胞进行allo-HCT后6天, 小鼠(图2E) 肝脏和(图2F) 小肠(比例尺: 100 μ m) 切片的p22phox标记的代表性图像, n=4-5/组(上图)。每个视野中p22phox阳性标记的总面积平均%的定量。对于均值比较(WT与Csf2^{-/-}), 使用未配对双尾t检验, $*p < 0.01$ 。图2G: 单独用WT C57BL/6TCD-BM或与C57BL/6WT小鼠的脾细胞联合进行allo-HCT后, 经致死性照射的BALB/c小鼠的存活率。在实验期间, 从HCT前2天开始, 每周3次用PBS、同种型对照抗体或抗GM-CSF抗体处理小鼠。收集2个独立实验的数据, 每个实验n=5/组。对于存活曲线比较(aGM-CSF与同种型), 使用Lox-rank (Mantel-Cox) 检验, $***p < 0.001$ 。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。图2H: allo-HCT后6天, BALB/c小鼠的结肠长度(以cm), 如a中所述。收集2个独立实验的数据。图2I: allo-HCT后6天, BALB/c小鼠的结肠中的凋亡细胞(TUNEL染色)的代表性图像和定量, 如a中所述。收集3个独立实验的数据(比例尺顶部50 μ m, 底部20 μ m)。图2J: allo-HCT后6天, BALB/c小鼠的血清中的碱性磷酸酶(AP)、丙氨酸转氨酶(ALT)、血尿素氮(BUN)和白蛋白的水平。数据代表2个独立实验, n=3-5/组。图2K: 单独用WT C57BL/6TCD-BM或与从C57BL/6WT或Csf2^{-/-}小鼠(CD4WTCD8WT、CD4WTCD8Csf2^{-/-}、CD4Csf2^{-/-}CD8WT和CD4Csf2^{-/-}CD8Csf2^{-/-})脾脏纯化的CD4和CD8 T细胞联合进行allo-HCT后, 经致死性照射的BALB/c小鼠的存活率。仅用TCD-BM处理的小鼠用作对照。数据代表2个独立实验, n=5/组。对于存活曲线比较(CD4WTCD8WT与其他组), 使用Log-rank (Mantel-Cox) 检验, ns(不显著), $**p < 0.01$ 。缩写: TCD: T细胞去除、BM: 骨髓、HCT: 造血细胞移植、WT: 野生型。

[0020] 图3A-3H GM-CSF在部分MHC不匹配的allo-HCT之后介导GvHD病理

[0021] 图3A: 单独用WT C57BL/6TCD-BM或与C57BL/6WT、Csf2^{-/-}或Ifng^{-/-}小鼠的脾细胞联合进行部分MHC不匹配的allo-HCT后, 经致死性照射的B6D2F1小鼠的存活率。收集5个独立实验的数据, 每个实验n=5/组。对于存活曲线比较(WT与其他组), 使用Lox-rank (Mantel-Cox) 检验, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ 。图3B: 单独用WT C57BL/6TCD-BM或与C57BL/6WT、Csf2^{-/-}或Ifng^{-/-}小鼠脾脏纯化的T细胞联合进行allo-HCT后, 经致死性照射的B6D2F1小鼠的存活率。收集2个独立实验的数据, 每个实验n=5/组。对于存活曲线比较(WT与其他组), 使用Lox-rank (Mantel-Cox) 检验, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ 。图3C: allo-HCT后11天, B6D2F1小鼠的肝脏、小肠和皮肤切片的综合组织病理学评分。收集2个独立实验的数据, n=5/组。对于均值比较(WT、Csf2^{-/-}和Ifng^{-/-}), 使用采用Bonferroni事后检验的单因素ANOVA, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ 。图3D: 用WT C57BL/6TCD-BM与WT、Ifng^{-/-}或Csf2^{-/-} C57BL/6小鼠的脾细胞联合进行allo-HCT后11天, 小鼠皮肤的苏木精和曙红染色切片的代表性图像, n=4-5/组(比例尺: 100 μ m)。图3E-3F: 用WT C57BL/6TCD-BM与来自C57BL/6WT或Csf2^{-/-}小鼠的脾细胞联合进行allo-HCT后9天, 小鼠(图3E) 肝脏和(图3F) 小肠(比例尺: 100 μ m) 切片的p22phox(上图)和

F4/80标记的代表性图像, $n=4-5$ /组。每个视野中p22phox或F4/80阳性标记的总面积的%的定量。对于均值比较(WT与Csf2^{-/-}), 使用未配对双尾t检验, *** $p<0.001$, * $p<0.01$ 。图3G: 用WT C57BL/6TCD-BM与来自C57BL/6WT、Ifng^{-/-}或Csf2^{-/-}小鼠的脾细胞联合进行allo-HCT后9天, 小鼠的血清IFN γ 和GM-CSF水平。收集2-3个独立实验的数据, $n=4-5$ /组。对于均值比较(WT与Ifng^{-/-}或WT与Csf2^{-/-}), 使用采用Welch校正的未配对双尾t检验, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。图3H: allo-HCT后9或28天, B6D2F1小鼠的肝脏切片的综合组织病理学评分, 如a中所述。数据代表2个独立实验, $n=4-6$ /组。缩写: TCD: T细胞去除、BM: 骨髓、HCT: 造血细胞移植、WT: 野生型。

[0022] 图4A-4H GM-CSF对于allo-HCT后的抗肿瘤活性是非必需的

[0023] 图4A-4D: 在单独用WT C57BL/6TCD-BM或与来自C57BL/6WT或Csf2^{-/-}小鼠脾脏纯化的T细胞联合进行MHC不匹配的allo-HCT同时, 向经致死性照射的BALB/c小鼠静脉注射表达GFP和荧光素酶的A20肿瘤细胞。仅用TCD-BM处理的小鼠用作对照。(图4A) 通过体内生物发光成像监测肿瘤生长。显示了来自两个的一个代表性实验的图像。(图4B) 随时间监视感兴趣区域(region of interest, ROI)中的信号强度。在每个具有致死性GvHD(灰色)、肿瘤(黑色)或存活者(白色)的治疗组中, (图4C) 随时间的存活率和(图4D) 死亡原因以小鼠的百分比表示。收集2个独立实验的数据, $n=5$ /组。对于存活曲线比较(WT与其他组), 使用Log-rank (Mantel-Cox) 检验, ns (不显著), ** $p<0.01$ 。(图4E-4H) 在单独用WT C57BL/6TCD-BM或与来自C57BL/6WT小鼠脾脏纯化的T细胞联合进行MHC不匹配的allo-HCT同时, 向经致死性照射的BALB/c小鼠静脉注射表达GFP和荧光素酶的A20肿瘤细胞。仅用TCD-BM处理的小鼠用作对照。在实验期间, 从HCT前2天开始, 每周3次用同种型对照或抗GM-CSF抗体处理小鼠。(图4E) 通过体内生物发光成像监测肿瘤生长。显示了来自 $n=6-7$ /组的一个实验的图像。(图4F) 随时间监视感兴趣区域(ROI)中的信号强度。在每个具有致死性GvHD(灰色)、肿瘤(黑色)或存活者(白色)的治疗组中, (图4G) 随时间的存活率和(图4H) 死亡原因以小鼠的百分比表示。对于存活曲线比较(WT与csf2^{-/-}), 使用Log-rank (Mantel-Cox) 检验, * $p<0.05$ 。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。缩写: TCD: T细胞去除、BM: 骨髓、HCT: 造血细胞移植、WT: 野生型、BLI: 生物发光成像、ROI: 感兴趣区域。

[0024] 图5A-5D严重GvHD的患者在肠道活检中表达高水平的GM-CSF

[0025] 图5A: GM-CSF在不同GvHD等级患者的胃肠活检中在mRNA水平上的相对表达, 参见表3。对于均值比较, 使用采用Bonferroni事后检验的单因素ANOVA, ** $p<0.01$ 。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。图5B: 来自allo-HCT患者的小肠的对照和GvHD IV级活检中GM-CSF标记的图像, 参见表1和表2。棕色: 抗人GM-CSF, 蓝色: 苏木精。比例尺为100 μ m(放大图像中为20 μ m)。显示了3个独立对照和患者样品的代表性图像。图5C: 来自IV级GvHD患者的胃肠活检的CD3(粉红色)、CD68(绿色)和GM-CSF(红色)的免疫荧光染色。显示了3个个体患者样品的代表性图像。细胞核描绘为蓝色(DAPI) (比例尺顶部50 μ m, 底部20 μ m)。图5D: 从健康供体(HD)和GvHD患者(GP)收集的PBMC(用PMA/离子霉素刺激4小时)的流式细胞检测分析。显示了表达细胞因子的T细胞的代表性FACS图。产生GM-CSF、IFN和IL-17的CD4⁺和CD8⁺T细胞以单独的频率显示。 $n=10-9$ /组, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。缩写: TCD: T细胞去除、BM: 骨髓、HCT: 造血细胞移植。

[0026] 图6A-6D WT和Csf2^{-/-}小鼠的T细胞群体的比较表型分析

[0027] 在未经免疫的(naïve)C57BL/6WT和Csf2^{-/-}小鼠中脾脏(图6A) T细胞群体频率和(图6B) 活化标志物表达频率的流式细胞检测分析。收集2个独立实验的数据,每个实验n=3/组。图6C:在用WT C57BL/6TCD-BM与C57BL/6WT或Csf2^{-/-}小鼠的脾细胞联合重建的经致死性照射的BALB/c小鼠的allo-HCT后2天和5天,受体淋巴结(LN)、脾脏、肝脏和皮肤中的供体T细胞浸润的流式细胞检测分析。细胞在H2-Db和CD45上预门控;CD4和CD8 T细胞在CD3上预门控。显示了n=4/组的一个实验。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。图6D:在用WT C57BL/6TCD-BM与C57BL/6WT或Csf2^{-/-}小鼠的脾细胞联合重建的经致死性照射的BALB/c小鼠的allo-HCT后5天,受体LNH和脾脏中的供体T细胞浸润的流式细胞检测分析。细胞在H2-Db和CD45;CD4和CD8T细胞上预门控。显示了n=4/组的一个实验。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。缩写:TCD:T细胞去除、BM:骨髓、HCT:造血细胞移植、WT:野生型。

[0028] 图7A和7B使用A20肿瘤细胞和分别从C57BL/6WT或Csf2^{-/-}小鼠的脾脏和淋巴结分离的T细胞进行杀伤试验。图7A:显示了通过TO-PRO3染色的死细胞的流式细胞检测分析的代表性图。图7B:通过指示的T细胞以1:1、1:20和1:50的靶标:效应物比率对A20肿瘤细胞的特异性裂解。数据代表两个实验,每个实验n=3只小鼠/组。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。缩写:WT:野生型。

[0029] 图8A和8B图8A:单独用WT Balb/c T细胞去除(TCD)-BM或与Balb/c WT小鼠的脾细胞联合进行allo-HCT后,经致死性照射的C57BL/6WT或Csf2rb^{-/-}小鼠的存活率。收集2个独立实验的数据,每个实验n=5-7/组。图8B:单独用C57BL/6WT或Csf2rb^{-/-} TCD-BM或与C57BL/6WT小鼠的脾细胞联合进行allo-HCT后,经致死性照射的Balb/c WT小鼠的存活率。收集2个独立实验的数据,每个实验n=5-7/组。

[0030] 图9A-9H GM-CSF通过供体来源的骨髓细胞驱动GvHD

[0031] 图9A:单独用WT Balb/c TCD-BM或与Balb/c WT小鼠的脾细胞联合进行MHC不匹配的allo-HCT后,经致死性照射的WT C57BL/6和Csf2rb^{-/-}小鼠的存活率。收集2个独立实验的数据,每个实验n=5/组。图9B:单独用C57BL/6WT或和Csf2rb^{-/-}小鼠TCD-BM或与C57BL/6WT小鼠的脾细胞联合进行MHC不匹配的allo-HCT后,经致死性照射的Balb/c WT小鼠的存活率。收集2个独立实验的数据,每个实验n=5/组。对于存活曲线比较(WT与Csf2rb^{-/-}受体/供体),在a和b中使用Log-rank (Mantel-Cox) 检验,**p<0.01。图9C:带注释的t-SNE图,其展示了来自WT C57BL/6和Csf2rb^{-/-}小鼠的骨髓的200,000个随机采样的细胞,显示了GM-CSF刺激后的STAT5磷酸化(黑色至黄色梯度),通过流式细胞检测分析进行分析。数据代表两个独立的实验,n=3/组。图9D:WT C57BL/6和Csf2rb^{-/-}小鼠的单核细胞和嗜中性粒细胞中GM-CSF诱导的pSTAT5上调的频率,如图9B重叠所示。图9E:HCT后不同骨髓细胞群体(DC、嗜中性粒细胞、单核细胞和MDC)的流式细胞检测分析。显示了肝脏的示例门控。图9F:在脾脏(上排)和肝脏(下排)中的骨髓细胞群体(来自图9E)的定量。显示了来自3个独立实验的一个代表,n=4-5/组。(g) allo-HCT后6天,小鼠脾脏的H2Db⁺、CD45⁺群体内产生pro-IL-1 β 的嗜中性粒细胞和单核细胞的频率。显示了嗜中性粒细胞、单核细胞和MDC的代表性图(如e中所示门控)。数据代表两个独立的实验,n=5/组。图9H:allo-HCT后6天,小鼠中ROS (CellROX试剂)的流式细胞检测分析。嗜中性粒细胞、单核细胞和MDC的MFI代表性直方图(如图9E所示门控)。数据代表一个实验,n=5-7/组。对于均值比较,在f-h中使用未配对双尾t检验,***p<0.001,**p<0.01,*p<0.05。数据显示为平均值 $\pm$ SEM。缩写:TCD:T细胞去

除、BM:骨髓、HCT:造血细胞移植、WT:野生型。

[0032] 所述序列的简述

[0033] 使用37C.F.R.1.822中所定义的核苷酸碱基的标准字母缩写来表示本文所提供的核酸序列。每个核酸序列仅显示一条链,但是应理解通过对所展示链的任何参考包括了互补链。序列表以命名为“Seq protocol uz349wo_ST25.txt”的ASCII文本文件(约2KB)提交,其通过引用并入本文。

[0034] SEQ ID No:1和2:CSF2基因的正向和反向PCR扩增引物。

[0035] SEQ ID No:3和4:GAPDH基因的正向和反向PCR扩增引物。

具体实施方式

[0036] 术语和定义

[0037] 在本说明书的上下文中,术语GvHD涉及移植物抗宿主病,其为一种将免疫细胞移植到遗传上不同的患者中引起的并发症。GvHD通常与干细胞移植相关,尤其是在恶性血液病治疗的背景下,但可能由其他移植的背景引起。

[0038] 在本说明书的上下文中,术语allo-HCT涉及同种异体造血细胞移植。

[0039] 在本说明书的上下文中,术语GM-CSF涉及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Uniprot P04141;CAS号83869-56-1)。

[0040] 在本说明书的上下文中,术语CD116涉及分化簇116,也称为GM-CSF受体的 α 链(Uniprot P15509)。GM-CSF受体由GM-CSF特异性 α 链(CD116)和 β 链(CD131,其也存在于IL-3R和IL-5R白介素受体中)组成。

[0041] 根据本发明的GM-CSF或CD116、CD131和由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种的配体能够消除或中和当GM-CSF与其受体结合时开始的信号传导。

[0042] 在本说明书的上下文中,术语CLL涉及急性慢性淋巴细胞(lymphocytic)或成淋巴细胞(lymphoblastic)白血病。

[0043] 在本说明书的上下文中,术语ALL涉及急性成淋巴细胞性白血病。

[0044] 在本说明书的上下文中,术语CML涉及慢性骨髓性(myelogenous)或髓样(myeloid)白血病。

[0045] 在本说明书的上下文中,术语AML涉及急性骨髓性白血病。

[0046] 在本说明书的上下文中,术语AMoL涉及急性单核细胞白血病。

[0047] 在本说明书的上下文中,术语“抗体”以其在细胞生物学和免疫学领域中已知的含义使用;其指完整的抗体,包括但不限于免疫球蛋白G型(IgG)、A型(IgA)、D型(IgD)、E型(IgE)或M型(IgM),其任何抗原结合片段或单链以及相关或衍生的构建体。完整的抗体是一种糖蛋白,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 组成。每条轻链由轻链可变区(在本文中简称为 V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补系统的第一组分)的结合。类似地,该术语涵盖所谓的纳米抗体或单结构域抗体、由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。

[0048] 术语抗体包括骆驼抗体,特别是人源化骆驼抗体。

[0049] 在本说明书的上下文中,术语抗体样分子是指能够以高亲和力/ $K_d \leq 10E-8 \text{ mol/l}$ 与另一分子或靶标特异性结合的分子。抗体样分子与其靶标的结合类似于抗体的特异性结合。术语抗体样分子涵盖重复蛋白,诸如设计的锚蛋白重复蛋白(Molecular Partners, Zürich),一种工程化的抗体模拟蛋白,表现出高度特异的和高亲和力的靶蛋白结合(参见US2012142611,US2016250341,US2016075767和US2015368302,其全部通过引用并入本文)。术语抗体样分子进一步涵盖,但不限于,衍生自犰狳(armadillo)重复蛋白的多肽、衍生自富亮氨酸重复蛋白的多肽和衍生自三角形四肽重复蛋白(tetratricopeptide repeat proteins)的多肽。

[0050] 术语抗体样分子还涵盖衍生自蛋白A结构域的多肽、衍生自纤连蛋白结构域FN3的多肽、衍生自共有纤连蛋白结构域的多肽、衍生自脂质运载蛋白的多肽、衍生自锌指的多肽、源自Src同源结构域2(SH2)的多肽、衍生自Src同源结构域3(SH3)的多肽、衍生自PDZ结构域的多肽、衍生自 γ -晶状体蛋白的多肽、衍生自泛素的多肽、衍生自半胱氨酸结多肽的多肽和衍生自打结素(knottin)的多肽、衍生自半胱氨酸蛋白酶抑制剂的多肽、衍生自Sac7d、三螺旋卷曲螺旋(triple helix coiled coil)(也称为alphabody)的多肽、衍生自Kunitz型蛋白酶抑制剂的Kunitz结构域的多肽以及衍生自碳水化合物结合模块32-2的多肽。

[0051] 术语蛋白A结构域衍生的多肽是指作为蛋白A的衍生物并且能够特异性结合免疫球蛋白的Fc区和Fab区的分子。

[0052] 术语犰狳重复蛋白是指包含至少一个犰狳重复的多肽,其中犰狳重复的特征在于形成发夹结构的一对 α 螺旋。

[0053] 在本说明书的上下文中,术语“人源化抗体”以其在细胞生物学和生物化学领域中已知的含义使用;其是指最初由非人类物种的免疫细胞产生的抗体,其蛋白质序列已经过修饰以增加其与人类天然产生的抗体变体的相似性。

[0054] 在本说明书的上下文中,术语人源化骆驼抗体是指仅由重链或重链可变域(VHH结构域)组成的抗体,且其氨基酸序列已被修饰以增加其与人类天然产生的抗体的相似性,因此,当施用于人类时,显示降低的免疫原性。用于人源化骆驼抗体的一般策略显示于Vincke et al. “General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold”, J Biol Chem. 2009 Jan 30; 284(5):3273-3284以及US2011165621A1。

[0055] 在本说明书的上下文中,术语嵌合抗体以其在细胞生物学和免疫学领域中已知的含义使用;其是指一种抗体分子,其中恒定区或其一部分被改变、置换或交换,使得抗原结合位点(可变区)与不同或改变的类别、效应子功能和/或种类的恒定区或与赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子(例如酶,细胞因子,毒素,激素,生长因子,药物等)相连。例如,可以通过用细胞因子置换其恒定区来修饰抗体。由于用细胞因子置换,嵌合抗体可保留其识别抗原的特异性,同时还具有原始细胞因子分子的功能或其部分。

[0056] 在本说明书的上下文中,术语解离常数(K_D)以其在化学和物理领域中已知的含义使用;其是指一种平衡常数,其用于衡量较大的物体在可逆地解离成较小的成分时(当复合物分解成其成分分子时)的倾向。 K_D 以摩尔单位[M]表示,并对应[Ag]结合位点被占据一半

时的[Ab]浓度。换言之,未结合的[Ab]的浓度等于[AbAg]复合物的浓度。解离常数可以根据下式计算:

$$[0057] \quad K_D = \frac{[Ab] * [Ag]}{[AbAg]}$$

[0058] [Ab]:抗体浓度;[Ag]:抗原浓度;[AbAg]:抗体抗原复合物的浓度

[0059] 在本说明书的上下文中,术语解离速率(off-rate) (Koff; [1/sec]) 和结合速率(on-rate) (Kon; [1/sec*M]) 以其在化学和物理领域中已知的含义使用;它们是指测量5抗体与其靶抗原的解离(Koff) 或结合(Kon) 的速率常数。Koff和Kon可以使用本领域公知的方法通过实验确定。一种测定抗体的Koff和Kon的方法采用表面等离子体共振。这是生物传感器系统(诸如Biacore®或ProteOn®系统)背后的原理。它们也可以用于通过下式确定解离常数KD:

$$[0060] \quad K_D = \frac{[K_{off}]}{[K_{on}]}$$

[0061] 如本文所用,在一个实施方案中,任何疾病或病症(例如癌症或移植物抗宿主病)的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指改善该疾病或病症(例如减慢或阻止或减少该疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指减轻或改善至少一种身体参数,包括那些患者可能无法辨别的参数。在又一实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指身体上(例如,可辨别的症状的稳定)、或生理上(例如,身体参数的稳定),或在两者上调节疾病或病症。除非下文具体描述,用于评估疾病的治疗和/或预防的方法通常是本领域公知的。

[0062] 在本说明书的上下文中,术语适配体是指能够以 $K_d \leq 10E-8 \text{ mol/l}$ 的高亲和力特异性结合另一分子或靶标的寡核苷酸或肽。适配体与其靶标的结合类似于抗体的特异性结合。术语适配体涵盖RNA或DNA分子、核酸类似物或肽分子。适配体还可与自我切割的RNA分子偶联,所谓的核酶。用于从头(de-novo)获得适配体的方法是已知的;这些方法包括所谓的“selex”方法和其他基于从随机选择中进化特异结合物的方法。

[0063] 使用完全和部分MHC不匹配的HCT的鼠模型,发明人证明了GM-CSF(Csf-2)(一种在多种炎症性疾病中起新兴作用的细胞因子)在移植后早期由供体T细胞大量产生。当供体T细胞缺乏GM-CSF时,GvHD得到明显改善。重要且令人惊讶的是,GM-CSF的缺乏不会影响供体T细胞控制小鼠肿瘤生长的能力(GvL效应),并且即使在完全MHC不匹配的情况下,也可以在不出现GvHD的情况下实现这种控制。发明人还在来自GvHD患者的胃肠道活检中发现了高水平的GM-CSF,这与人类症状中的平行作用一致。因此,本发明人提出GM-CSF作为新的治疗靶标,在接受a11o-HCT的患者中维持GvL的同时减弱GvHD。

[0064] 虽然已在GvHD的背景下提出了使用抗GMCSF或抗GMCSFR抗体,但此处提供的的数据首次表明,GvHD可以被治疗或抑制,而不影响同种异体移植的治疗益处,并且存在使用本发明的配体的临床依据,其允许身体在抑制GvHD(吞噬细胞介导的)的同时引发移植物抗白血病反应。这将准许包括患者(其由于GvHD所致的风险,目前尚未安排a11o-HCT)进行a11o-HCT,并可进一步允许限制a11o-HCT后免疫抑制剂的使用。

[0065] 本发明的第一方面涉及一种非激动剂配体,其与GM-CSF或与CD116、CD131以及由

CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种特异性结合,其用于在已接受同种异体造血干细胞移植(allo-HCT)的患者中治疗白血病。换言之,该配体用于同种异体造血干细胞移植后的白血病治疗。

[0066] 本发明的非激动剂配体消除了GM-CSF对其受体施加的生物学信号,从而导致了GM-CSF相互作用的下游效应。因此,将理解的是,本文描述的方法可以在任何能发生GvHD的同种异体移植的背景下用于抑制或降低GvHD的严重程度,但不会显著减弱同种异体移植的有益作用。在特别的实施方案中,本文描述的是通过在提供对恶性血液病的allo-HCT治疗的同时或之后,用于向患者施用所描述的非激动剂配体来治疗该恶性血液病的方法,该恶性血液病包括白血病、淋巴瘤或多发性骨髓瘤。在其他实施方案中,用于抑制或降低GvHD严重程度的方法使得能够提供同种异体移植,其中存在由产生或诱导足够GM-CSF的细胞(其与同种异体移植植物一起被移植)诱导GvHD的风险。肝脏移植是这种移植的一个非限制性实例。

[0067] 在某些实施方案中,非激动剂抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131或抗GM-CSF受体配体为抗体、抗体片段、抗体样分子、适配体或蛋白A结构域衍生的多肽。尽管抗体(特别是单克隆抗体)的使用在人类患者中通常用于治疗用途,并且实际上已经开发了GM-CSF特异性抗体和CD116特异性抗体用于其他治疗目的,但是本领域技术人员理解,可以采用其他形式(诸如DARPIN、适配体或抗体衍生的分子)以实现基本相同的目的。

[0068] 在一些实施方案中,非激动剂抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131或抗GM-CSF受体多肽配体是由两条重链和两条轻链组成的免疫球蛋白。在一些实施方案中,非激动剂抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131或抗GM-CSF受体多肽配体是由来自重链或轻链的分离的可变结构域组成的单结构域抗体。在一些实施方案中,非激动剂抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131或抗GM-CSF受体多肽配体为仅由重链组成的重链抗体,诸如骆驼中发现的抗体。

[0069] 在某些实施方案中,非激动剂抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131或抗GM-CSF受体多肽配体为抗体片段。在某些实施方案中,非激动剂抗GM-CSF、抗CD116、抗CD131或抗GM-CSF受体多肽配体为Fab片段,即抗体的抗原结合片段,或单链可变片段,即通过肽接头连接的抗体的重链和轻链的可变区的融合蛋白。

[0070] 在post-allo-HCT白血病治疗的小鼠模型中用抗GM-CSF抗体治疗的效果示于图4。

[0071] 在某些实施方案中,配体为单克隆抗体。在某些实施方案中,配体为人抗体。

[0072] 在某些实施方案中,用于在已接受同种异体造血干细胞移植(allo-HCT)的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的方法中使用的配体为人源化抗体。在某些实施方案中,配体为嵌合抗体。

[0073] 在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的方法中使用的配体为Mavrilimumab(CAS号1085337-57-0)。

[0074] 在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的方法中使用的配体为Namilumab(CAS号1206681-39-1)。

[0075] 在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的方法中使用的配体为Lenzilumab(CAS号1229575-09-0)。在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的方法中使用的配体为Otilimab(MOR103或GSK-3196165;CAS号1638332-55-4)。在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT

的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的方法中使用的配体为Gimsilumab(MORAb-022; CAS号1648796-29-5)。

[0076] 将理解的是,在特别的实施方案中,可以在提供同种异体移植的方法中使用抗体,诸如mavrilimumab,namilumab,lenzilumab,otilimab或gimsilumab,其中GvHD的发展被抑制或其严重程度被降低。

[0077] 在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗白血病的方法中使用的配体的特征在于 K_D 小于($<$) 10^{-7}molL^{-1} ,特别是 $K_D < 10^{-8}\text{molL}^{-1}$,特别是 $K_D < 10^{-9}\text{molL}^{-1}$ 。

[0078] 本发明的第二方面涉及编码如本发明的第一方面或其任何特别的实施方案中所指定的配体的核酸分子,其用于在已接受allo-HCT的患者中治疗白血病。

[0079] 在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的核酸分子为单链或双链DNA分子或单链或双链RNA分子。

[0080] 在某些实施方案中,用于在根据本发明的已接受allo-HCT的患者中治疗白血病或其他恶性肿瘤(malignancy)的核酸分子为核酸表达构建体,其包含在哺乳动物细胞中可操作的启动子的控制下的上述指定的核酸序列。

[0081] 在某些实施方案中,用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的核酸分子为选自DNA质粒、双链线性DNA、单链RNA和病毒(特别是慢病毒、疱疹病毒、腺病毒或腺相关病毒)的表达构建体。

[0082] 核酸表达构建体用于将特定基因导入靶细胞,并可以控制细胞的蛋白质合成机制以产生该基因编码的蛋白质。核酸表达构建体被工程化以含有充当启动子区域的调节序列,以及任选地还含有充当增强子区域并导致该表达构建体上携带的基因的有效转录的序列。

[0083] 用于所述方法的核酸表达载体在本领域中是常见的。用于表达哺乳动物蛋白的说明性载体包括尤其可从Promega Corp(Madison,WI)和Thermo Fisher Scientific,Inc.(Waltham,MA)获得的那些。

[0084] 在另一实施方案中,作为施用非激动剂配体的替代,所描述的治疗方法包括抑制GM-CSF、其受体(CD116和CD131)或GM-CSF受体的单个亚单位(CD116和/或CD131)的表达。在这些方法中,将能够抑制GM-CSF或其受体肽表达的核酸提供给有此需要的患者(例如,在allo-HCT之后或期间)。在特别实施方案中,靶向核酸可以为反义DNA、siRNA等。确定合适的靶标和靶向序列的方法是本领域已知的。

[0085] 本发明的上述方面的替代涉及一种药物组合物,其用于在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)。该组合物包含与GM-CSF或与CD116、CD131和由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种特异性结合的非激动剂配体或编码其的核酸表达构建体,以及药学上可接受的载体,特别地其被配制为肠胃外施用的施用形式,更特别地为静脉内施用的施用形式。

[0086] 抗GM-CSF以及抗CD116、CD131以及由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种的抗体是本领域已知的。已经开发出了特异性针对GM-CSF的单克隆抗体,并在临床上测试了在类风湿性关节炎中的功效。用于实施本发明的抗体的非限制性实例包括公开于Cohen等人的US2014079708、US2012141464、US2009130093、US2014079708和US2015376285中公开的CD116/131抗体(Mavrilimumab),其通过引用并入本文。

[0087] 另一非限制性实例为在Haertle等人的US2015246969中公开的GM-CSF抗体(Otilimab),以及Kirchner等人的US2011189082和US2013071923中公开的抗体,其全部通过引用并入本文。

[0088] 另一非限制性实例为在Steidl等人的US2009053213、US2011045000、US2017218061中公开的GM-CSF抗体,其全部通过引用并入本文。

[0089] 另一种抗GM-CSF的抗体由Takeda以名称Namilumab开发用于类风湿性关节炎。

[0090] 另一种抗GM-CSF的抗体正在进行在先前治疗过的慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)的受试者中的临床试验,其名称为Lenzilumab(CAS号1229575-09-0)。

[0091] 类似地,在本发明范围内的是一种在已接受allo-HCT的患者中治疗恶性血液病(诸如白血病)的方法,其包含向该患者施用如上所述的与GM-CSF或与CD116、CD131以及由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种特异性结合的非激动剂配体,特别是抗体。

[0092] 类似地,提供了一种用于在已接受allo-HCT的患者中预防或治疗白血病的剂型,其包含根据本发明上述方面之一的配体或核酸构建体。

[0093] 剂型可以用于肠内施用,诸如经鼻、颊、直肠、透皮或口服施用,或作为吸入剂或栓剂。或者,可使用肠胃外施用,诸如皮下、静脉内、肝内或肌内注射形式。任选地,可存在药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0094] 在本文中单个可分离特征的替代布置为“实施方案”的任何地方,应当理解,这种替代可自由组合以形成本文公开的本发明的离散实施方案。

[0095] 本发明通过以下各项被示例性地进一步描述:

[0096] 第1项:一种非激动剂配体,其与以下特异性结合并能够中和其生理功能:

[0097] -GM-CSF或

[0098] -CD116、CD131以及由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种,

[0099] 其用于治疗GvHD。

[0100] 第2项:根据第1项的用于治疗GvHD的配体,其中所述配体为抗体、抗体片段、适配体或抗体样分子。

[0101] 第3项:根据第1或2项的用于治疗GvHD的配体,其中所述配体为人抗体或人源化抗体。

[0102] 第4项:根据前述项目中任一项的用于治疗GvHD的配体,其选自Mavrilimumab、Namilumab、Lenzilumab、MOR103和MORAb-022。

[0103] 第5项:根据前述项目中任一项的用于治疗GvHD的配体,其中所述配体与GM-CSF或与CD116、CD131和由CD116和CD131组成的GM-CSF受体中的一种的结合的特征在于 K_D 小于($<$) 10^{-7} ,特别地 $K_D < 10^{-8}$,更特别地 $K_D < 10^{-9}$ 。

[0104] 第6项:一种编码根据前述项目1至4任一项的配体的核酸分子,其用于治疗GvHD。

[0105] 第7项:根据第6项的用于治疗GvHD的核酸分子,其中所述核酸分子为DNA分子或RNA分子。

[0106] 第8项:一种包含根据第5或7项的核酸序列的核酸表达构建体,其用于治疗GvHD。

[0107] 第9项:根据第8项的用于治疗GvHD的核酸表达构建体,其中所述表达构建体选自DNA质粒、双链线性DNA、单链RNA和病毒,特别是慢病毒、疱疹病毒、腺病毒或腺相关病毒。

[0108] 第10项:根据第1至5项中任一项的配体或根据第6或7项的核酸分子,或根据第8或

9项的核酸表达构建体,其用于治疗因allo-HCT引起的并发症。

[0109] 第11项:根据第1至5项中任一项的配体或根据第6或7项的核酸分子,或根据第8或9项的核酸表达构建体,其用于在患有恶性血液病或从恶性血液病恢复的患者中治疗因allo-HCT引起的并发症,

[0110] -特别地恶性血液病选自白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤,

[0111] -更特别地恶性血液病选自慢性骨髓性白血病(chronic myeloid leukemia, CML)、急性骨髓性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)、慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)和急性单核细胞白血病(acute monocytic leukemia, AMoL)、霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤。

[0112] 通过以下实施例和附图进一步说明本发明,从这些实施例和附图可以得出其他实施方案和优点。这些实施例旨在说明本发明,而非限制其范围。

[0113] 实施例

[0114] 材料和方法

[0115] 研究设计

[0116] 该研究的开始是为了确定某些T细胞来源的细胞因子是否可以将GvHD与GvL分离,因此可能代表用于治疗恶性血液病的有前景的新治疗靶标。为了实现此目标,我们使用了两种不同的GvHD实验模型、GvL的实验模型和人类受试者。对于动物研究,使用8至12周龄的小鼠。所有动物实验均已获得地方当局(Swiss Cantonal Veterinary Office)的批准,并在适当的实验许可(76/2012和052/2015)下进行。将动物随机分配进实验组,以盲法(blinded fashion)进行生存中(in-life)临床评分,并对器官切片进行图像分析处理。在先前研究的基础上选择样本大小和疾病终点时间点。进行流式细胞术、组织病理学分析、混合淋巴细胞反应(MLR)、杀伤试验和细胞因子分析来表征GvHD/GvL靶器官。由对治疗不知情的研究者评估特异性封闭GM-CSF的抗体对临床评分的影响。

[0117] 为了进行可靠的统计分析,除非附图图例中另有说明,否则对手稿中显示的每个数据至少进行三个独立的实验。经书面知情同意后,所有人类样品均在获得Albert-Ludwigs University(Freiburg, Germany)的伦理委员会批准(协议号码:267/11)后收集。对肠道活检组织进行了免疫组织化学和定量RT-PCR,并对PBMC进行了多参数流式细胞术。

[0118] 小鼠和体内操作。将小鼠在无特定病原体的条件下保存在单独通风的笼中。WT C57BL/6、BALB/c和B6D2F1小鼠购自Janvier Laboratories, France。同类系的C57BL/6CD45.1小鼠在室内饲养。Ifng^{-/-}小鼠获自Jackson Laboratories;Cs2^{-/-}小鼠由Jeffrey Whitsett提供,并使用快速同类系法(speedy congenics)进一步回交C57BL/6。Il17a^{-/-}小鼠由Y. Iwakura提供。所有动物实验均已获得地方当局(Swiss Cantonal Veterinary Office)的批准,并在适当的实验许可(76/2012和052/2015)下进行。实验全程使用7-12周大的雌性小鼠。

[0119] GvHD的诱导:供体C57BL/6或BALB/c小鼠的脾脏和BM的单细胞悬液的制备如下所述(在“淋巴细胞分离”)。对于BM的T细胞去除,将细胞以 25×10^6 /ml在含有 α CD90.2-生物素(1:100, eBioscience)的RMPI完全培养基(含10%FCS、1%青霉素/链霉素、2mM L-谷氨酰胺和0.5mM β -巯基乙醇的RPMI 1640)中在4°C搅拌下温育30分钟。随后,在采用冷MACS缓冲液

(含0.5% BSA和2mM EDTA的PBS)的洗涤步骤之后,将细胞以 100×10^6 细胞/ml的浓度重悬于MACS缓冲液中并与抗-生物素珠(1:5, Miltenyi)或链霉亲和素珠(1:10, Miltenyi)在4°C搅拌孵育20分钟。用MACS缓冲液洗涤后,使用AutoMACS Pro, Miltenyi Biotech和“depletes”程序分离细胞。收集阴性级分,并使用计数室(counting chamber)确定细胞数。通过流式细胞术分析去除效率。BM中的T细胞频率从1-3%降低至 $0.055 \pm 0.022\%$ 。为了从脾细胞中分离未接触的T细胞,根据制造商的方案使用来自Miltenyi的全T细胞分离试剂盒(II)。使用AutoMACS Pro, Miltenyi Biotech和“deplete”程序分离细胞。收集阴性级分并使用计数室确定细胞数。通过流式细胞术分析富集效率,并且T细胞纯度通常为 $95.2 \pm 2.16\%$ 。根据制造商的说明(Biolegend),使用MojoSort小鼠CD4 T细胞分离和MojoSort小鼠CD8 T细胞分离试剂盒分离CD4和CD8 T细胞。

[0120] 在无特定病原体的条件下,在滤笼(filter-cages)中对受体BALB/c或B6D2F1小鼠以分剂量850 (BALB/c)、1200 (B6D2F1) 或1100 (C57BL/6) rad进行致死性照射,间隔至少5小时。受体被静脉内注射 5×10^6 BM细胞和 $0.1-10 \times 10^6$ 脾细胞或 $6-7.5 \times 10^6$ T细胞/只C57BL/6或B6D2F1小鼠。受体被静脉内注射 7×10^6 BM细胞和 20×10^6 脾细胞/BALB/c小鼠。小鼠用饮用水中的0.1% Borgeal (Intervet)处理三周,以防止细菌感染。每天还对小鼠的GvHD症状进行评分,改编自(Cooke, K.R. et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. Blood 88, 3230-3239 (1996)),并显示于补充表4中。在对GvHD进行评分时,研究者对组分配不知情。在注射移植细胞之前的第0天测量参考体重。为了阻断GM-CSF,从HCT前2天开始,每周用PBS、300 μ g同种型对照(2A3)或300 μ g抗GM-CSF抗体(MP1) (BioXCell)处理小鼠3次。

[0121] GvL的诱导:通过用编码CMV-GFP-(T2A)-Luc的慢病毒转导A20 (ATCC),在BALB/c背景上产生A20-荧光素酶⁺GFP⁺B细胞淋巴瘤细胞系(A20-luc-gfp,由Emma Svensson, Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Sweden惠赠)。WEHI-3-荧光素酶⁺细胞由R. Zeiser捐赠。在HCT当天,每只小鼠静脉注射 2.5×10^5 A20细胞、 5×10^5 A20细胞或 1×10^5 WEHI-3细胞,伴随单独的 5×10^6 WT C57BL/6 BM细胞或其与来自WT或Csf2^{-/-} C57BL/6小鼠的 1×10^5 纯化的脾T细胞/小鼠。在HCT当天,每只小鼠静脉注射 2.5×10^5 A20细胞,伴随单独 5×10^6 WT C57BL/6 BM细胞或其与来自WT或Csf2^{-/-} C57BL/6小鼠的 1×10^5 纯化的脾T细胞/小鼠。通过生物发光成像(BLI)监测肿瘤进展:在使用Xenogen IVIS 200临床前体内成像系统(PerkinElmer, Waltham, MA)进行成像前10分钟,将小鼠腹膜内注射在PBS中150mg/kg的D-荧光素(Promega);曝光时间1-120s, binning 2-8, FOV 15cm, f/stop 1,无滤光片。在成像之前和成像期间,将小鼠用异氟烷(在O₂中蒸发2%)麻醉。使用Living Image软件(PerkinElmer)从全身的固定感兴趣区域(ROI)测量总光子通量(光子/秒)。总是对每个笼子拍照片,并且当不同组的小鼠在同一笼子中混合时,照片已被裁剪。肿瘤和GvHD死亡率通过BLI信号强度(对于肿瘤发生率,ROI> 1×10^7)、后肢麻痹(指示肿瘤发展)和GvHD的临床表现(在两个单独的GvHD标准中至少达到2级)来区分。为了阻断GM-CSF,从HCT前2天开始,每周用300 μ g同种型对照(2A3)或300 μ g抗GM-CSF抗体(MP1) (BioXCell)处理小鼠3次。从第3周开始,抗体剂量降低至150 μ g。

[0122] 淋巴细胞分离。使用CO₂吸入使小鼠安乐死,并用40ml冷PBS灌注。除非下文另有说

明,否则收集器官,切成碎片并在37°C与胶原酶孵育,然后通过反复通过20号针头进行机械破裂。进行红细胞裂解。然后将所得细胞悬浮液通过70 μ m细胞滤网过滤,并用于进一步的操作。

[0123] 脾脏:为了分离骨髓细胞,将器官碎片在2ml胶原酶D(0.4mg/ml,Roche)和0.1mg/ml DNase I(Sigma)的RPMI中在37°C孵育30分钟。对于T细胞的分离,通过机械破碎将脾脏匀浆,然后通过70 μ m细胞滤网过滤。BM:用PBS冲洗股骨、胫骨和骨盆,以获得BM干细胞。肝脏:将器官碎片在1.6mg/ml IV型胶原酶(来自溶组织梭状芽胞杆菌(*Clostridium histolyticum*),Sigma)的HBSS(含有10%FCS)中在37°C孵育约45分钟。将细胞重悬于10ml Percoll中(连续梯度,27%,GE)并在室温以1700rpm离心30分钟。除去脂肪和上清液并将沉淀物进行红细胞裂解。皮肤:将器官碎片在1mg/ml IV型胶原酶(得自溶组织梭状芽胞杆菌,Sigma)和0.1mg/ml DNase I(Sigma)的RPMI中在37°C孵育1.5-2小时。小肠:在机械去除腔粘液之前,将器官与肠系膜脂肪分离;然后将器官在含2%FCS、1mM DTT和1.35mM EDTA的不含钙和镁的HBSS中在37°C孵育15分钟。在补充有EDTA的HBSS中在37°C进一步孵育30分钟后,将结肠切割并在37°C使用0.4mg/ml胶原酶IV(Sigma Aldrich)消化45分钟。然后使用带有18号针头的注射器将样品均质化,并通过70 μ m细胞滤网过滤。

[0124] 流式细胞术。流式细胞检测分析是按照标准方法进行的,其综述于(Perfetto, S.P., Chattopadhyay, P.K. & Roederer, M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 648-655 (2004))。对于所有荧光染料缀合的抗体,使用滴定实验确定最佳浓度。对小鼠CD4(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 I类H2-D^d(34-2-12)和H2-D^b(KH95)、GM-CSF(MP1-22E9)、IFN γ (TC11-18H10)、IL-17A(XMG1.2)和FoxP3(FJK-16s)特异的抗体克隆可从BD、BioLegend或者eBioscience获得。对于表面染色,将细胞与各自的抗体在4°C孵育20-30分钟。对于所有实验,使用Aqua或Near-IR Live/Dead可固定染色试剂(Invitrogen/BioLegend)将死细胞排除在分析之外;通过FSC-Area vs. FSC-Height门控排除双联体(doublet)。对于细胞内细胞因子染色,将T细胞在含有10%FCS和PMA(50ng/ml)、离子霉素(500ng/ml)和GolgiPlug(含有Brefeldin A, BD, 1:1000稀释)的RPMI中在37°C孵育4-5小时。在表面染色后,根据制造商的说明使用Cytofix/Cytoperm(BD),以及内部(in-house)制备Perm/Wash缓冲液(含有0.5%皂苷和5%BSA的PBS)。对于细胞内染色,将细胞与各自的抗体在4°C孵育20-30分钟。对于核内FoxP3染色,在表面染色后使用Fixation/Permeabilization缓冲液(eBioscience),然后使用内部制备的Perm/Wash缓冲液。通常,基于FSC-Area和SSC-Area对细胞进行门控以排除碎片,通过FSC-Area vs. FSC-Height门控排除双联体。使用Aqua或Near-IR Live/Dead可固定染色试剂(Invitrogen/BioLegend)将死细胞排除在分析之外。在适用的情况下,在对CD4或CD8 T细胞进行门控之前对CD45.1细胞进行门控。用于门控的所有标志物(CD4、CD8、CD3、CD44、CD62L、CD69)显示出阴性群体和阳性群体的明显分离。对于杀伤试验细胞,如上所述对单细胞(singlet)进行门控,然后通过Cell trace violet鉴定肿瘤细胞,并产生显示TOPRO-3摄取的直方图。使用带有FACS Diva Software的FACSCanto II(BD)或者LSR II Fortessa(特殊订购的研究产品, BD, 并配备405nm、488nm、561nm和640nm激光线)进行流式细胞检测分析。使用FlowJo 10.0.x(Treestar)进行数据分析。

[0125] STAT5磷酸化的流式细胞检测分析

[0126] 将骨髓的单细胞悬浮液表面染色20分钟,其后将含有GM-CSF的培养基(20ng/ml)添加到样品中。将细胞在37°C孵育30分钟以诱导STAT5磷酸化,然后添加4%PFA溶液(pH 7.4)至终浓度2%。将细胞固定20分钟,洗涤并重悬于1ml 4°C甲醇中。40分钟后,将细胞洗涤两次,并重悬于45μl FACS缓冲液中。加入5μl抗pSTAT5 APC(BD Biosciences)以使最终染色比为1:10。在最终的洗涤步骤和采集之前,将细胞在4°C孵育45分钟。使用带有FACS Diva Software的LSR II Fortessa(特殊订购的研究产品,BD,并配备405nm、488nm、561nm和640nm激光线)进行流式细胞检测分析。使用FlowJo10.0.x(Treestar)进行数据分析。

[0127] 通过流式细胞术对人PBMC的表型分析

[0128] 将冷藏保存的PBMC保存于液氮中,直到在37°C水浴中解冻。将细胞轻轻重悬于补充有1:10000benzonase(Invitrogen)的1ml预热细胞培养基(CCM;RPMI-1640[PAN biotech],10%FCS[Biochrom],1×l-谷氨酰胺和1×青霉素/链霉素[两者都来自Life Technologies])。然后将细胞转移至5ml试管中,并用CCM洗涤。计数细胞,并在CCM中调节至 20×10^6 细胞/ml。为了通过流式细胞术确定细胞因子的产生,在GolgiPlug(含Brefeldin A,BD,1:1000稀释)和GolgiStop(含Monensin,BD,1:1000稀释)存在下,用50ng/ml佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA;Sigma-Aldrich)和1μg/ml离子霉素(Sigma-Aldrich)在37°C刺激细胞4小时。使用Human TruStain FcX(Biolegend)阻断非特异性结合。

[0129] 混合淋巴细胞反应(MLR)。将C57BL/6WT、Csf2^{-/-}、Ifng^{-/-}或Il17a^{-/-}应答T细胞与BALB/c(同种异体)或C57BL/6(同基因)小鼠的DC共培养。或者,将BALB/c WT应答T细胞与BALB/c(同基因)或C57BL/6WT的DC以及Csf2rb^{-/-}DC(同种异体)共培养。通过分别使用抗CD4和抗CD8(对于T细胞)或抗CD11c(对于DC)磁珠(Miltenyi Biotec)和AutoMACS Pro进行阳性筛选,从脾细胞中纯化T细胞和DC。将细胞一式三份以1/10的刺激细胞/应答细胞比率(2×10^4 DC, 2×10^5 T细胞)铺板在U型底96孔板中,在37°C和5%CO₂在RPMI 1640完全培养基中培养3天。然后收集培养上清液,并用稀释的3H-胸腺嘧啶(1/100,50μCi)置换16小时。使用96孔收集器(PerkinElmer)收集细胞,并通过beta计数器(1450Microbeta Plus,Wallac)测量闪烁。

[0130] 杀伤试验。使用小鼠全T细胞分离试剂盒II(Pan T Cell Isolation Kit II,MACS Miltenyi Biotec)分离脾脏和淋巴结T细胞。用CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit(ThermoFisher Scientific,C34557)对A20-荧光素酶⁺GFP⁺或WEHI-3-荧光素酶⁺细胞进行染色。将细胞以1:1、20:1和50:1的效应物/靶标比率在可溶性α-CD3(1μg/ml)和α-CD28(0.5μg/ml)存在下在补充有10%FCS的RPMI中在37°C,5%CO₂中孵育24小时。除去培养基后,将Topro(0.8μM)加入细胞中并在LSRII Fortessa流式细胞仪(BD)上获取细胞。使用FlowJo Version X(Tree Star)分析数据。特异性裂解的百分比计算如下:[(实验裂解-自发裂解)/(最大裂解-自发裂解)]×100%。

[0131] Treg抑制测定

[0132] 如前所述,从C57BL/6WT和Csf2^{-/-}小鼠的淋巴结和脾脏中分离T细胞。首先使用CD4分离试剂盒(MojoSort™ Mouse CD4 Nanobeads)富集CD4 T细胞,然后用CD45、CD25、CD62L和CD4染色。

[0133] 使用BD FACS ARIA II细胞分选仪通过流式细胞术对CD4+CD25-CD62L+(Tconv)和

CD4+CD25^{high}(Treg) 细胞进行分选,纯度为98-99%。将APC用>3400rad (4min,12.2Gy/min, 225kV,17.7mA) 照射,并在10%克隆培养基中稀释至 4×10^6 /mL (或 2×10^6 细胞/ml)。在96孔圆形底板中,将APC和Tconv细胞与自体Treg细胞以不同的浓度共培养(4×10^4 Tconv/孔)。将细胞用浓度为1 μ g/ml的 α CD3在37℃刺激2天,然后与3H-胸腺嘧啶孵育16小时。使用FilterMate (PerkinElmer) 收集细胞,并使用程序Microbeta通过beta计数器进行分析。在活细胞之间的Treg抑制百分比计算为 $[(\text{cpm Tconv}-\text{cpm Treg:Tconv})/\text{cpm Tconv单独}] \times 100$,cpm为每分钟计数,计算为Tconv细胞的%抑制。

[0134] 细胞因子分析。在指定的时间从allo-HCT受体小鼠获得血清。共培养3天后,收集MLR的培养上清液。血清或细胞培养上清液中GM-CSF、IFN γ 和IL-17A的测定按照制造商的说明(BD Biosciences and Biolegend)通过细胞因子特异性ELISA进行。

[0135] 肝功能参数

[0136] 使用Piccolo Liver Panel Plus (Abaxis) 测量小鼠血清中的肝酶((丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(AP))、白蛋白和血尿素氮(BUN))。

[0137] 组织学。对于组织病理学评估,将器官固定在HOPE (DCS,Hamburg,Germany) 中并包埋在石蜡中。用切片机(Micro HM 325,Thermo Scientific) 切割3-5 μ m切片,然后用苏木精和曙红染色。为了生成组织学GvHD评分,采用半定量组织特异性评分系统:对于小肠参数(包括绒毛变钝(villous blunting)、隐窝再生(crypt regeneration)、隐窝细胞凋亡、完全的隐窝破坏(outright crypt destruction)和固有层淋巴细胞浸润),通过以下评分进行评估:0=正常;0.5=局灶性且很少;1=局灶性且轻度;2=弥漫性且轻度;3=弥漫性且中度;4=弥漫性且重度,改编自(Hill,G.R.et al.Total body irradiation and acute graft-versus-host disease:the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines.Blood 90,3204-3213(1997))。对于皮肤,对以下参数进行评估:估计的毛囊数量:0=正常(相对紧密排列),0.5=数量稍微减少(通常局灶性);估计的皮脂腺数目:0=正常(相对较大的细胞,小群体,处于发颈水平(hair neck level)),1.0=略有减少(数量和大小,通常为局灶性),2.0=明显减少(仅少量细胞);皮脂腺凋亡与退化:0=不存在,0.5=很少,1=累及腺体数量少,2=累及腺体数量中等;毛囊的凋亡与退化:0=不存在,0.5=很少,1=累及毛囊数量少,2=累及毛囊数量中等,3=累及毛囊数量大;白细胞浸润(附件外(extra-adnexal)):0=低,1=略有增加,2=中度增加;白细胞浸润(附件):0=不存在,1=轻度,2=中度;表皮(凋亡细胞,白细胞浸润):0=不存在,0.5=很少,1=少量,2=中等数量,3=大量;皮下脂肪:0=连续,1=不连续,2=不存在,改编自(Kaplan,D.H.et al.Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype.J.Immunol.173,5467-5475(2004))。对于肝脏参数(包括门静脉扩张和浸润、胆管浸润、核胆管多层化、固缩胆管细胞(pyknotic bile duct cells)、上皮内胆管细胞、血管内皮炎、肝细胞性全小叶坏死(hepatocellular pan-lobular necrosis)、嗜酸性体、微脓肿、有丝分裂像和肝细胞脂肪变性),通过以下评分进行评估:0=正常;0.5=局灶性且很少;1=局灶性且轻度;2=弥漫性且轻度;3=弥漫性且中度;4=弥漫性且重度,改编自(Hill,G.R.et al.Interleukin-11promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation.J.Clin.Invest.102,115-123(1998))。所有载玻片均已编码并在Olympus BX41TF显微镜上以盲

法读取。

[0138] 人类受试者。经书面知情同意后,所有人类样品均在获得Albert-Ludwigs University (Freiburg, Germany) 的伦理委员会批准(协议号码:267/11)后收集。在2007年至2014年之间,以前瞻性方式从GvHD或健康对照个体中收集肠道组织活检样本。肠道GvHD分级由经验丰富的病理学家根据组织病理学依据已发布的分期系统进行(Lerner, K.G. et al. Histopathology of graft-vs.-host reaction (GvHR) in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplant. Proc. 6, 367-371 (1974))。对照个体在肠活检中未显示任何异常。患者的特征(包括受体年龄、性别、基础诊断、供体和移植物的类型、调理方案(conditioning regimen)、免疫抑制方案和GvHD等级)在GvHD患者的补充表1和3中以及在对照受试者的补充表2中进行了详述。

[0139] 免疫组织化学。根据制造商的说明,使用两步IHC染色试剂盒EnVision+System HRP DAKO (Glostrup, Denmark) 在固定的石蜡包埋的组织切片中进行免疫组织化学检测。将切片用Dako Target Retrieval Solution(1x)进行10分钟的热介导的抗原修复。在室温用DAKO内源性过氧化物酶封闭试剂盒封闭内源性过氧化物酶活性30分钟。将一抗稀释于PBS+5%正常山羊血清(NGS)中。单次免疫染色由以下组成:与用于人类受试者的活检的未缀合的mAb抗人GM-CSF抗体(克隆3209.1; R&D Systems)或IgG同种型对照,以及与用于小鼠组织切片的大鼠 α -F4/80(克隆CI:A3-1, BioRad)和兔 α -p22phox(克隆FL-195, Santa Cruz)在4°C过夜孵育。DAB用作色原。然后将切片用苏木精复染,用DPX封固,并用与彩色相机ColorViwerIIIu(Olympus)和Fiji/ImageJ软件包(GNU General Public License)连接的光学显微镜Olympus BX41进行分析。

[0140] 免疫荧光

[0141] 使用Hyrax C60 cryostat (Zeiss) 将组织冷冻切片(10 μ m厚)用于免疫组织化学,并保存在-80°C。将切片固定在4%PFA中,在PBS中洗涤,并用补充有0.1% Triton X-100和4%正常山羊血清的PBS封闭。随后,将切片与下列一抗、大鼠抗GMCSF抗体(BD Pharmingen, 克隆BVD2-21C11, 1:50)、兔 α -CD3 (Novus, 克隆SP7, 1:200)和小鼠抗CD68抗体(DAKO, 克隆EMB11, 1:50)一起孵育,并在4°C在封闭溶液中稀释过夜。然后将切片在PBS中洗涤,并与AF647标记的山羊抗大鼠、AF488标记的山羊抗小鼠和AF555标记的驴抗兔二抗(Life Technologies, 1:500)一起在4°C孵育过夜或在室温孵育1小时。将切片用含DAPI (Invitrogen)的SlowFade Gold抗褪色试剂固定。使用采用40x物镜(油浸, NA1.25)的装有氩气和氦气激光器的SP5 Leica共聚焦激光扫描显微镜(SP5; Leica, Heerbrug, Switzerland)捕获荧光显微照片。图像由Imaris成像软件(Bitplane, Zurich, Switzerland)处理并合并。

[0142] TUNEL分析

[0143] 将固定在4%PFA中的切片处理用于进行TUNEL分析以检测结肠中的碎片核。根据制造商的说明,使用ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit。简而言之,将载玻片用H₂O₂预处理,并与含TdT和地高辛配基(digoxigenin)缀合的dUTP的反应混合物在37°C孵育1小时。标记的DNA用AF488缀合的二抗进行可视化。使用采用40x物镜(油浸, NA1.25)的装有氩气和氦气激光器的SP5 Leica共聚焦激光扫描显微镜(SP5; Leica, Heerbrug, Switzerland)捕获荧光显微照片。图像由Imaris成像软件(Bitplane, Zurich,

Switzerland) 处理并合并。

[0144] RNA分离和定量rt-PCR。根据制造商的说明,使用RNeasy FFPE试剂盒(Qiagen,使用二甲苯进行脱石蜡)从固定的石蜡包埋的组织切片中分离RNA。使用NanoDrop1000分光光度计(Thermo Scientific)估算RNA浓度。对于第一链cDNA合成,根据制造商的说明使用MLV逆转录酶(Invitrogen)。使用带有SYBR Green Supermix(Bio-Rad)的CFX 384实时检测系统(Bio-Rad,Hercules,CA,USA),通过实时定量PCR分析测量基因表达。下表列出了PCR引物的序列。将转录物表达针对GAPDH管家基因进行标准化,并表示为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_{T_{对照}}$)。

[0145]	基因	引物序列 (5'至 3')
	<i>CSF2</i>	Fwd: CAC TGC TGC TGA GAT GAA TGAA AA (SEQ ID NO:1) Rev: GTC TGT AGG CAG GTC GGC TC (SEQ ID NO: 2)
	<i>GAPDH</i>	Fwd: GAA GGT GAA GGT CGG AGT CAA C (SEQ ID NO: 3) Rev: TGA TTT TGG AGG GAT CTC GCT C (SEQ ID NO: 4)

[0146] 高维数据分析中的自动化群体识别

[0147] 在FlowJo Version v10.4(TreeStar)中对在BD FACSymphony™细胞分析仪中获取的数据进行补偿、导出,使用Cyt MATLAB进行归一化(版本2017b),并按照(Nowicka et al.F1000Res 6,748(2017);Hartmann et al.,J.Exp.Med.213,2621-2633(2016).)中所述进行无偏分析。

[0148] 统计学。用GraphPad Prism(GraphPad Software)制备图。通过Kaplan-Meier方法绘制存活曲线,并且为了比较存活曲线,使用Lox-rank(Mantel-Cox)检验。数据显示为单独的数据点或平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)或平均值的标准误差(SEM),如图中的图例所示。分别使用未配对双尾学生t检验(如适用,采用Welch校正)或采用Bonferroni事后检验的单向和双向ANOVA进行均值比较。未使用统计方法来确定样本量,但是我们的样本量与本领域中通常使用的样本量相似。未使用随机化方法。

[0149] 数据可用性。在本研究期间生成和/或分析的数据集可应合理要求从相应的作者处获得。

[0150] 实施例1:

[0151] MHC不匹配的HCT后组织浸润的供体T细胞产生GM-CSF和IFN γ

[0152] 为了理解T细胞来源的GM-CSF对急性GvHD的贡献,发明人首先采用了MHC不匹配的HCT模型。发明人用致死性照射的野生型(WT)BALB/c CD45.2⁺小鼠(MHC单倍型H2d),然后对这些小鼠静脉注射来自WT CD45.1 C57BL/6(B6)小鼠(MHC单倍型H2b)的T细胞去除的(TCD)骨髓(BM)细胞,与或不与B6 CD45.1⁺脾细胞一起(其作为成熟T细胞的来源)。allo-HCT后第3天和第6天之间,BM加脾细胞的受体发展出致死性GvHD(图1A),这与脾脏、肝脏和皮肤中供体CD45.1⁺细胞的重建和扩增相吻合(图1B)。在CD45.1⁺供体区室(compartment)中,T细胞群包含高频率的产生GM-CSF和IFN γ 的细胞,首先从allo-HCT后第3天开始在肝脏(图1C)和脾脏(图1D)中观察到,然后从第6天开始在皮肤(图1D)中观察到。在这些群体中几乎检测不到IL-17A(图1C,1D)。因此,发明人发现,与单独使用BM相比,接受BM加脾细胞的小鼠血清中的

GM-CSF和IFN γ 的量明显更高(图1E)。发明人证实了使用同种异体混合淋巴细胞反应(MLR)的体外同种异体反应期间GM-CSF和IFN γ 的产生(图1F)。此外,wt、Csf2^{-/-}、Il17a^{-/-}和Ifng^{-/-}T细胞与同种异体DC共培养后同等增殖,这排除了这些细胞增殖潜能的先验差异(图1G)。总之,GM-CSF和IFN γ ,而非IL-17A,是由GvHD期间浸润靶器官的T细胞产生的。

[0153] 实施例2:

[0154] 同种异体T细胞产生GM-CSF对GvHD病理至关重要

[0155] 考虑到同种反应性T_H细胞产生GM-CSF和IFN γ ,发明人评估了这些细胞因子在确定急性GvHD严重程度方面的相关性。如上所述,发明人用致死性照射的WT BALB/c小鼠,然后比较注射来自WT B6小鼠的TCD-BM细胞与含有或不含有来自WT B6小鼠,或来自缺乏GM-CSF(Csf2^{-/-})、IFN γ (Ifng^{-/-})或IL-17(Il17a^{-/-})的B6小鼠的脾细胞的结果。接受BM加Csf2^{-/-}脾细胞的小鼠在allo-HCT后长达20天受到保护免于致死性GvHD,而所有用BM加WT脾细胞处理的小鼠都在HCT后第15天死亡(图2A)。用BM加Ifng^{-/-}或Il17a^{-/-}脾细胞注射小鼠也显著影响了致死性GvHD动力学,但依然几乎100%的这些小鼠在第20天死亡(图2A)。

[0156] 由于供体脾细胞制剂包含多种不同的免疫细胞类型,因此发明人随后提问T细胞是否确实是本发明的GvHD模型中GM-CSF的生物学重要来源。发明人向用致死性照射的BALB/c受体注射来自WT B6供体的TCD-BM细胞(与或不与从WT或Csf2^{-/-}B6小鼠的脾脏分离的纯化的T细胞一起);这种方法证实了接受Csf2^{-/-}T细胞的小鼠在allo-HCT后长达70天完全被保护免于致死性GvHD,这与接受WT T细胞的小鼠形成鲜明对比(图2B)。没有证据表明这种保护作用与来自WT和Csf2^{-/-}小鼠的脾脏T细胞之间的先天差异有关,因为这两个群体显示出相当的组成(图6A)、活化状态(图6B)、HCT后浸润GvHD靶标器官的能力(图6C)、脾脏或外周淋巴结(LN)中活化的(CD44^{high})T细胞的频率(图6D)、调节性T细胞(Treg)和粒酶产生的频率(数据未显示)或其产生促炎细胞因子(诸如IFN γ 、TNF α 或IL-17A)的能力。然后,发明人检查了来自CD4和CD8 T细胞的GM-CSF对GvHD病理的相对贡献。为此,发明人使用4种组合:CD4 WT T细胞+CD8 WT T细胞、CD4 WT T细胞+CD8 Csf2^{-/-}T细胞、CD4 Csf2^{-/-}T细胞+CD8 WT T细胞以及CD4 Csf2^{-/-}T细胞+CD8 Csf2^{-/-}T细胞,进行了“交叉”(“criss-cross”)实验。只有CD4 T细胞中缺少GM-CSF的组合才能提供针对致死性GvHD的保护(图2K),这支持同种异体反应性TH细胞是GM-CSF在GvHD病理中的重要来源的观点。因此,发明人得出结论,在MHC不匹配的HCT之后,T细胞来源的GM-CSF负责触发致死性GvHD。

[0157] 缺乏GM-CSF的T细胞的allo-HCT所赋予的存活优势在个体GvHD靶组织的水平上也很明显。allo-HCT后6天的组织病理学分析揭示了与WT脾细胞的移植相比,Csf2^{-/-}脾细胞的移植造成了对皮肤和小肠的明显更少的组织损伤(图2C,2D)。更详细地讲,接受Csf2^{-/-}细胞的小鼠皮肤显示了减少的在毛囊和表皮周围以及内部的细胞凋亡和细胞浸润,而小肠显示了减少的完全的隐窝破坏(图2D)。发明人在此进一步报道了Csf2^{-/-}细胞移植时结肠病理减少,如结肠长度增加和细胞凋亡指数降低所示的(图2H,2I)。此外,针对肝功能障碍的亚临床体征的筛查显示了,与WT对应物相比,Csf2^{-/-}脾细胞移植的小鼠中降低的丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(AP)和血尿素氮(BUN)的血清水平(图2G)。此外,在不存在GM-CSF的情况下,全身TNF α 血清水平降低,而IL-6的量没有变化(数据未显示)。

[0158] 由于活性氧(ROS)已与GvHD组织损伤有关,因此发明人提问这种减少的组织损坏是否与较低水平的ROS产生有关。发明人发现,与接受WT脾细胞的小鼠的切片相比,来自

Csf2^{-/-}脾细胞移植后第6天的老鼠的肝脏和小肠的切片含有显著更少的表达p22phox(一种吞噬细胞ROS产生机制的关键成分)的细胞(图2E, 2F)。

[0159] 为了进一步证实GM-CSF在GvHD中的功能作用,发明人在单独用WT B6 TCD-BM或用BM和WT脾细胞一起对BALB/c老鼠的MHC不匹配的HCT之前,用抗GM-CSF抗体处理受体老鼠。全身阻断GM-CSF的作用成功复制了将Csf2^{-/-}脾细胞移植到这些老鼠中的存活优势(图2G)。

[0160] 尽管完全MHC不匹配的HCT的老鼠模型提供了信息,但发明人接下来提问,在与临床更相关的急性GvHD单倍不匹配模型设置中,GM-CSF在GvHD病理学中的作用是否得到了保留。发明人将WT B6 TCD-BM与WT、Csf2^{-/-}或Ifng^{-/-}脾细胞结合,并将所述细胞移植到经致死性照射的B6D2F1老鼠中,该老鼠是B6和DBA老鼠之间的杂交,并因此具有MHC单倍型H2b/d。同样在这里,与接受WT脾细胞的老鼠相比,Csf2^{-/-}脾细胞的移植赋予明显的存活优势,保护老鼠免于致死性GvHD至几乎与单独的TCD-BM相当的水平(图3A),其在纯化的Csf2^{-/-}脾T细胞移植后再次复制(图3B)。在脾细胞移植实验和T细胞移植实验中,发明人还注意到,Ifng^{-/-}细胞移植后死亡率明显增加(图3A, 3B),这与该细胞因子在GvHD中的已知保护性免疫调节功能一致。HCT后第9天,皮肤是最受影响的器官,其组织学评分最高;在此,发明人发现,与WT脾细胞相比,在接受Csf2^{-/-}的老鼠中组织损害更少,而在Ifng^{-/-}脾细胞的受体中组织损害更多(图3C, 3D)。这与毛囊和表皮周围和内部的皮脂腺数量、组织结构和细胞浸润的变化相吻合(图3D)。在allo-HCT后的较晚阶段(28天),Csf2^{-/-}脾细胞的移植也导致肝脏病理减少(图3H),其特征为门静脉浸润和胆管紊乱的改变。在这种部分不匹配模型中,皮肤是最受影响的器官,GvHD评分最高;在此,发明人发现,与WT脾细胞相比,在接受Csf2^{-/-}的老鼠中组织损害明显更少,而在Ifng^{-/-}脾细胞的受体中组织损害明显更多(图3C, 3D)。在细胞水平上,发明人还观察到接受Csf2^{-/-}细胞的老鼠的肝脏和小肠中GvHD降低的迹象,该老鼠的p22phox⁺细胞明显较少,伴有F4/80⁺骨髓细胞的浸润减少(图3E, 3F)。考虑到在这些老鼠中观察到的IFN γ 的GvHD保护作用,发明人然后提问是否没有GM-CSF与这种细胞因子的水平有关:单倍-不匹配HCT后10天,发明人发现,与WT脾细胞相比,在接受csf2^{-/-}脾细胞的老鼠中IFN γ 水平明显更高(图3G)。有趣的是,发明人还发现,接受Ifng^{-/-}脾细胞的老鼠血清中GM-CSF增加的证据(图3G),表明GM-CSF可能还介导由于没有IFN γ 而引起的增强的GvHD。

[0161] 总之,我们得出结论,在allo-HCT的两种鼠模型中,T细胞来源的GM-CSF在GvHD免疫病理学的发展中具有至关重要的作用。

[0162] 实施例3:

[0163] GM-CSF通过供体来源的骨髓细胞介导GvHD致死性

[0164] 致死性条件后,HCT后的头几天内,失去放射敏感性宿主抗原提呈细胞(APC),并被来自供体的APC取代。虽然GvHD的引发阶段需要宿主APC,然而供体APC在疾病诱导中起到较小的作用,但可能参与永久性组织损伤。为了描述与病理相关的GM-CSF应答细胞类型是供体还是宿主来源,发明人使用了缺乏 β 亚单位的GM-CSFR的Csf2rb^{-/-}老鼠作为HCT的供体或宿主。受体区室中的GM-CSFR缺乏并不影响GvHD的存活(图9A)。相反,来自Csf2rb^{-/-}老鼠的BM的移植导致死亡率显著延迟(图9B),表型复制了Csf2^{-/-}脾细胞的移植(图2A)。发明人使用了无监督的非线性降维(t-SNE)来鉴定和可视化供体移植植物中的GM-CSF应答细胞。通过这种方法,发明人发现单核细胞和嗜中性粒细胞对GM-CSF特别敏感,它们通过对磷酸化的STAT-5(GM-CSF受体复合物下游的转录因子)的单细胞分析来评估。将Csf2rb^{-/-}老鼠用作

GM-CSF无应答细胞的来源(图9C,9D)。已经证实对GM-CSF应答的细胞仅限于骨髓区室,发明人对allo-HCT后5天在发炎的靶器官中发现的骨髓细胞亚群进行了全面表征。 $Csf2^{-/-}$ 脾细胞的移植导致若干骨髓亚群(包括树突细胞(DC)、嗜中性粒细胞、单核细胞和单核细胞衍生的细胞(MDC))的频率降低(图9E,9F)。抗GM-CSF治疗后在靶器官中也发现嗜中性粒细胞和单核细胞/MDC减少,而这些骨髓亚群的全身数量保持不变。发明人观察到,在没有GM-CSF的情况下,供体单核细胞/MDC产生较少的IL-1 β (图9G)。重要的是,IL-1 β 是一种GM-CSF引发的致病性程序的标志性细胞因子,并被证明在GvHD发展中发挥关键作用。考虑到ROS在接受同种异体 $Csf2^{-/-}$ T细胞的小鼠的组织切片中水平较低以及它们所报道的在驱动组织损害中的作用,发明人还研究了allo-HCT后它们在供体骨髓细胞中的表达。发明人发现, $Csf2^{-/-}$ 脾细胞的移植导致单核细胞/MDC和嗜中性粒细胞亚群两者的ROS产生减少(图9H)。这些发现共同表明,GM-CSF许可的供体来源的骨髓细胞对于GvHD病理至关重要。

[0165] 实施例4

[0166] 在没有GM-CSF的情况下保留了有效的GvL

[0167] 导致GvHD中组织损害和GvL中肿瘤消除的免疫应答被广泛认为是通过相同的机制介导的。由于供体T细胞来源的GM-CSF对于致死性GvHD是必不可少的,发明人研究了它在MHC-不匹配HCT模型中是否也介导了GvL。为了测试这一点,发明人向致死性照射的BALB/c受体中静脉注射共表达GFP和荧光素酶的A20 B细胞淋巴瘤细胞(BALB/c来源)(A20-GFP-Luc),与单独WT B6 TCD-BM细胞或与纯化的B6 WT或 $Csf2^{-/-}$ 脾T细胞一起。通过生物发光成像(BLI)监测肿瘤生长。当A20细胞与TCD-BM单独注入时,所有受体在35天内都死于生长的肿瘤(图4A-4C),这与T细胞在GvL效应中的关键作用相一致。因此,尽管仅接受 $Csf2^{-/-}$ T细胞的小鼠显示出存活率的显著改善(图4C),但在BM移植中添加WT或 $Csf2^{-/-}$ T细胞导致肿瘤生长的有效控制(图4A-4C)。接受TCD-BM加WT T细胞的携带淋巴瘤小鼠主要死于严重的GVHD,而接受TCD-BM加 $Csf2^{-/-}$ T细胞的小鼠则表现出未减弱的GvL效应,但同时受到保护免于GvHD(图4C,4D)。在使用单髓细胞系WEHI-3的另一种GvL模型中,也观察到了接受 $Csf2^{-/-}$ T细胞的小鼠存活率的这种改善。同样,当发明人增加了接种的A20淋巴瘤细胞的数量时, $Csf2^{-/-}$ T细胞甚至比WT T细胞更有效地执行GvL,导致总存活率显著增加。一致地,从未经免疫的(naïve)或接受allo-HCT的小鼠中分离的 $Csf2^{-/-}$ 和WT T细胞同样能离体杀死A20淋巴瘤和WEHI-3细胞,在脾脏和LN中同样地扩增,并显示出相似的活化(CD44^{high})、增殖性(Ki67+)和产生粒酶B细胞的频率。为了测试这些发现到临床环境的可翻译性,发明人使用了针对GM-CSF的中和mAb。引人注目的是,接受TCD-BM加T细胞的抗GM-CSF治疗的白血病小鼠显示出有效的GvL效应,并且比同种型治疗的对照小鼠具有显著更好的存活率(图4E-4H)。更好的存活率与降低的GvHD发生率相关(图4H)。值得注意的是,GM-CSF的中和对未接受HCT的小鼠的肿瘤生长没有任何影响。

[0168] 发明人比较了不同组(未接受HCT的携带淋巴瘤的小鼠,其达到戒断(withdrawal)标准并需要安乐死)之间的死亡原因(肿瘤或GvHD)。接受TCD-BM加WT T细胞的携带淋巴瘤的小鼠表现出延迟的肿瘤进展,但死于严重的GVHD,而接受TCD-BM加 $Csf2^{-/-}$ T细胞的小鼠表现出强烈的GvL效应,并受到保护免于GvHD(图4d)。与这些数据一致, $Csf2^{-/-}$ 和WT T细胞具有同等的离体杀死A20淋巴瘤细胞的能力(图7A,7B)。为了测试这些发现到临床环境的可翻译性,发明人使用了针对GM-CSF的中和mAb。引人注目的是,接受TCD-BM加T细胞的抗GM-CSF

治疗的白血病小鼠显示了有效的GvL效应,并且比同种型治疗的对照小鼠具有显著更好的存活率(图4E-4H)。更好的存活率与降低的GvHD发生率相关(图4H)。值得注意的是,GM-CSF的中和对未接受HCT的小鼠的肿瘤生长没有任何影响。

[0169] 值得注意的是,与WT供体相比,接受来自Csfrb2^{-/-}供体的allo-HCT的小鼠显示了存活率的显著改善(图8A和8B),表明GM-CSF受体的中和在减轻GvHD方面是有效的。

[0170] 因此,在没有GM-CSF的情况下,供体T细胞是小鼠中治疗性GvL应答的有效介体,而不会诱导致死性GvHD,即使在MHC不匹配的allo-HCT的高度免疫原性背景下。

[0171] 实施例5:

[0172] GM-CSF在人GvHD活检中升高

[0173] 发明人然后提问是否有证据表明GM-CSF在人类HCT接受者的GvHD中起平行作用。发明人在一系列不同条件下,对HCT后具有不同等级临床记录的GvHD的患者的胃肠道活检中的GM-CSF基因表达和蛋白质丰度进行了评估(表1-3)。在转录水平上,发明人在IV级患者的胃肠活检中检测到GM-CSF的表达显著高于I级GvHD(图5A)。此外,在来自IV级GvHD患者的样品中,发明人观察到间质区室中的GM-CSF的强免疫反应性;而发明人没有在无GvHD的患者的活检中检测到GM-CSF(图5b)。总之,这些结果表明GM-CSF与人类患者中allo-HCT后严重GvHD的存在之间有相关性。

[0174] 讨论:

[0175] 尽管有大量文献讨论了不同的T_H细胞亚群及它们的标志性细胞因子对GvHD的潜在贡献,但对炎症和随后的组织破坏的内在机制尚未完全清楚。另外,T_H细胞谱系定型的可塑性以及移植的极化T细胞的体外操作也限制了这些结果的解释。在此,我们揭示了GM-CSF在驱动小鼠致死性GvHD中起着前所未有的作用,并且在患有严重GvHD的人类allo-HCT患者中类似地升高。此外,GM-CSF似乎对于治疗性GvL效应是可有可无的,因此可能代表了GvHD预防和治疗中有前景的新型治疗靶点。我们的发现还排除了T细胞来源的IL-17A在急性GvHD中的作用,但证明了IFN γ 的保护效应。

[0176] GM-CSF与多种病理性炎症性疾病有关,并且对骨髓细胞具有有效的促炎效应。在此,发明人使用两种不同的急性GvHD鼠模型来表明,供体T细胞来源的GM-CSF直接介导严重的GvHD,这与大量的骨髓细胞浸润和ROS生产机制的组分的组织染色增加有关,其通常由吞噬细胞用于宿主防御病原体。相同的机制在GvHD的免疫病理学中明显是有害的,在GvHD中,组织损害和白细胞浸润是形影相随的。在本文接受同种异体反应性Csfr2^{-/-}T细胞的动物中观察到的GvHD易感器官中由骨髓驱动的氧化应激的减少支持了这一观点。GM-CSF在慢性肠炎中的关键作用以及在GvHD患者的胃肠活检中发现的大量GM-CSF表明,调节该特定器官中这种细胞因子的量可能对GvHD的预防和/或治疗高度有益。

[0177] 发明人还发现在小鼠的GvHD期间GM-CSF和IFN γ 的潜在相互调节的证据。先前已证明由活化的供体T细胞产生的IFN γ 同时促进和保护免受GvHD;在此发现,与接受WT脾脏的小鼠相比,接受缺乏IFN γ 的脾细胞进行部分MHC不匹配的HCT的小鼠对致死性GvHD的敏感性更高。有趣的是,这些小鼠展现了升高的血清GM-CSF水平,而接受缺乏GM-CSF的脾细胞的小鼠展现了升高的血清IFN γ 。先前已经报道了IFN γ 在效应T_H细胞中负调节GM-CSF的能力;然而,GM-CSF不会直接影响不表达受体复合物的T细胞,因此GM-CSF影响IFN产生的机制需要进一步研究。

[0178] 一个长期以来的假设是供体T细胞驱动的GvHD和治疗性GvL效应是通过相同的机制介导的:本文提供的数据对这种观点进行了挑战。在allo-HCT之前用阻断GM-CSF的抗体治疗小鼠可显著保护其免于致死性急性GvHD的发展;而用抗GM-CSF治疗的携带肿瘤的小鼠受益于肿瘤生长的有效控制和免受GvHD的保护。因此,GM-CSF不能控制T细胞介导的对恶性淋巴造血细胞的杀伤;而发明人提出,不希望受理论的束缚,在GvHD中,GM-CSF充当病原性T细胞和骨髓细胞之间的通讯管道,使后者引起组织破坏。尽管GvL可能依赖于T细胞的直接细胞毒性,但GM-CSF驱动的骨髓细胞应答可能与GvHD病理更为相关,因此代表了将GvL效应与GvHD分离的潜在机制。

[0179] GM-CSF在自身免疫性疾病和炎性疾病中的病理作用已导致开发针对人类疾病中GM-CSF途径的单克隆抗体。考虑到本文所示的中和GM-CSF对实验性GvHD的有益作用,很明显,在allo-HCT患者中阻断GM-CSF将改善临床结果。在严重GvHD患者的受影响组织中观察到的这种细胞因子水平的明显增加进一步支持了这一观点。但是,由于GM-CSF对于表面活性物质的体内平衡和肺部宿主防御至关重要,因此在临床环境中阻断GM-CSF时密切监视肺部疾病参数将很重要。在小鼠中有证据表明GM-CSF对IL-23介导的免疫应答起关键作用,而抗IL-23p19疗法可改善同基因GvHD相关的结肠炎。因此,直接阻断GM-CSF可能为任何针对IL-23的临床试验提供有价值的补充。缺失GM-CSF可以在不损害GvL应答的情况下终止GvHD的发展的这一事实有助于在临床试验中allo-HCT后测试这种用于预防和治疗GvHD的治疗策略。此外,在具有最严重表现的GvHD的患者样本中GM-CSF升高意味着该治疗策略对结果最差和死亡风险最高的患者群体中具有特别的前景。

[0180] 表1.GvHD患者组I的临床病理特征

[0181]

患者编号	性别	年龄	疾病	供体类型	移植类型	调理 (Conditioning)	免疫抑制	GvHD等级
1	男	44	CVID	MRD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath	3
2	男	57	sAML	MMURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath/MMF	4
3	女	21	T-ALL	MURD	PBSC	TBI/VP16	CyA/Campath	4
4	男	69	sAML	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/Campath	4
5	男	6	MDS	MURD	BM	TT/FLU/ATG	CyA/MTX	3

[0182] CVID:常见变异型免疫缺陷病;sAML:继发性急性骨髓性白血病;T-ALL:T细胞-急性淋巴细胞白血病;MDS:骨髓增生异常综合征;MRD:匹配亲缘供体(matched related donor);MMURD:不匹配非亲缘供体(mismatched unrelated donor);MURD:匹配非亲缘供体(matched unrelated donor);PBSC:外周血干细胞;BM:骨髓;FLU:氟达拉滨;BCNU:双氯乙基亚硝基脲;MEL:美法仑(melphalane);TBI:全身照射;VP16:依托泊苷;TT:噻替派;ATG:抗胸腺细胞球蛋白;CyA:环孢霉素A;MMF:霉酚酸酯;MTX:甲氨蝶呤。

[0183] 表2.对照受试者的特征

[0184]

患者编号	性别	年龄	活检
------	----	----	----

1	男	59	无病理发现
2	男	60	无病理发现
3	男	46	无病理发现

[0185] 表3.GvHD患者组II的临床病理特征

患者编号	性别	年龄	疾病	供体类型	移植类型	调理	免疫抑制	GvHD 等级
1	男	70	AML	MMURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, Campath	4
2	男	45	AML	MRD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, MTX	4
3	男	51	套细胞淋巴瘤	MMURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, Campath	4
4	男	29	Morbus Hodgkin	单倍体相合同胞	PBSC	FLU/ME L/TREOS	MMF/环磷酰胺/依维莫司	4
5	男	43	B-ALL	MURD	PBSC	TBI/VP-16	CyA, MTX, ATG	4
6	男	54	CVID	MRD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, Campath	3
7	女	60	MDS-RAEB II	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, Campath	3
8	女	61	AML	MMURD	PBSC	FLU/TT	CyA, Campath	3
9	女	59	T-NHL	MMURD	PBSC	FLU/TT	CyA, Campath	3
10	男	76	急性红白血病	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA/ATG/MMF	3
11	女	47	AML	MURD	PBSC	FLU/BU/TT	CyA/MMF/ATG	3
12	男	52	AML	MURD	PBSC	BU/CY	CyA, Campath	1
13	男	76	MDS-RAEB	MURD	PBSC	FLU/BCNU/MEL	CyA, Campath	1
14	女	58	AML	MMURD	PBSC	FLU/TT	CyA/MMF/ATG	1
15	女	48	AML	MMURD	PBSC	BU/CY	CyA/MTX/MMF/ATG	1
16	女	71	sAML/MPN	MMURD	PBSC	FLU/TT/MEL	CyA/MMF/ATG	1
17	女	59	MM	MRD	PBSC	FLU/BU/TT	CyA/MMF	1

[0187] AML:急性骨髓性白血病;B-ALL:B细胞-急性淋巴细胞白血病;CVID:常见变异型免疫缺陷病,MDS:骨髓增生异常综合征;RAEB:未成熟细胞过多的难治性贫血;T-NHL:T细胞-非霍奇金淋巴瘤;sAML:继发性急性骨髓性白血病;MPN:骨髓增生性肿瘤;MM:多发性骨髓

瘤;MMURD:不匹配非亲缘供体;MRD:匹配亲缘供体;MURD:匹配非亲缘供体;PBSC:外周血干细胞;FLU:氟达拉滨;BCNU:双氯乙基亚硝基脲;MEL:美法仑;TREOS:曲奥舒凡(treosulphan);TBI:全身照射;VP16:依托泊苷;TT:噻替派;BU:白消安;CY:环磷酰胺;CyA:环孢霉素A;MTX:甲氨蝶呤;MMF:霉酚酸酯;ATG:抗胸腺细胞球蛋白。

[0188] 表4.allo-HCT小鼠的GvHD评分系统

[0189]

GvHD 标准	0 级	1 级	2 级	3 级
体重减轻	< 10%	10-20%	20 -25%	> 25%
体态	正常	只在休息时注意到耸肩 (hunching)	在运动时也中度耸肩	严重耸肩妨碍运动
活动	正常	轻度至中度减少	减少	严重减少
皮毛质感	正常	轻度至中度起皱 (ruffling)	严重起皱/修饰 (grooming) 不良	脱皮毛
皮肤完整性	正常	皮肤和/或生殖器水肿的斑片状脱屑	中度脱屑和皮肤炎症	弥漫性溃疡性皮肤病损和严重炎症

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 苏黎世大学
- [0003] <120> GM-CSF 或 GM-CSF 受体的配体用于在已接受 A11o-HCT 的患者中治疗恶性血液病
- [0004] <130> uz349wo
- [0005] <160> 4
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 23
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <220>
- [0012] <223> PCR primer
- [0013] <400> 1
- [0014] cactgctgct gagatgaatg aaa 23
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 20
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> Artificial Sequence
- [0019] <220>
- [0020] <223> PCR primer
- [0021] <400> 2
- [0022] gtctgtaggc aggtcggctc 20
- [0023] <210> 3
- [0024] <211> 22
- [0025] <212> DNA
- [0026] <213> Artificial Sequence
- [0027] <220>
- [0028] <223> PCR primer
- [0029] <400> 3
- [0030] gaaggtgaag gtcggagtca ac 22
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 22
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> Artificial Sequence
- [0035] <220>
- [0036] <223> PCR primer
- [0037] <400> 4

[0038] tgattttgga gggatctcgc tc 22

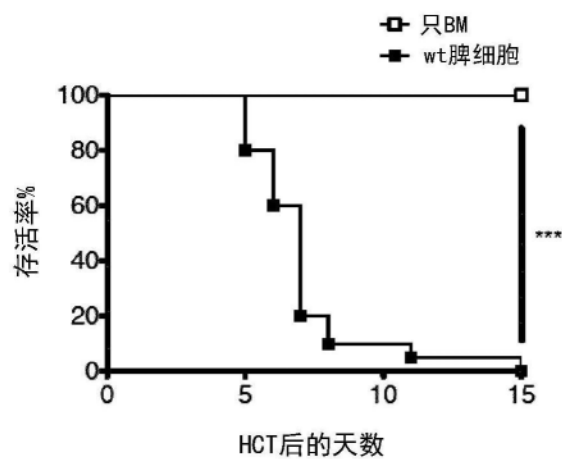


图1A

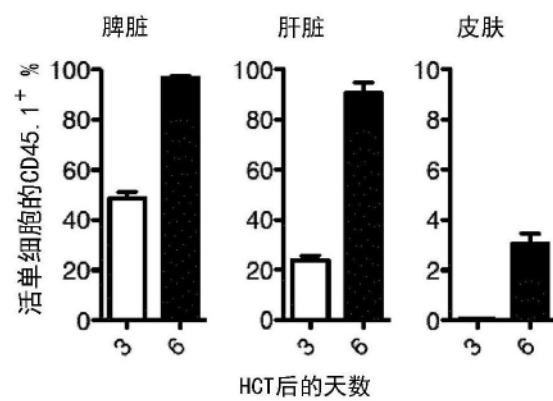


图1B

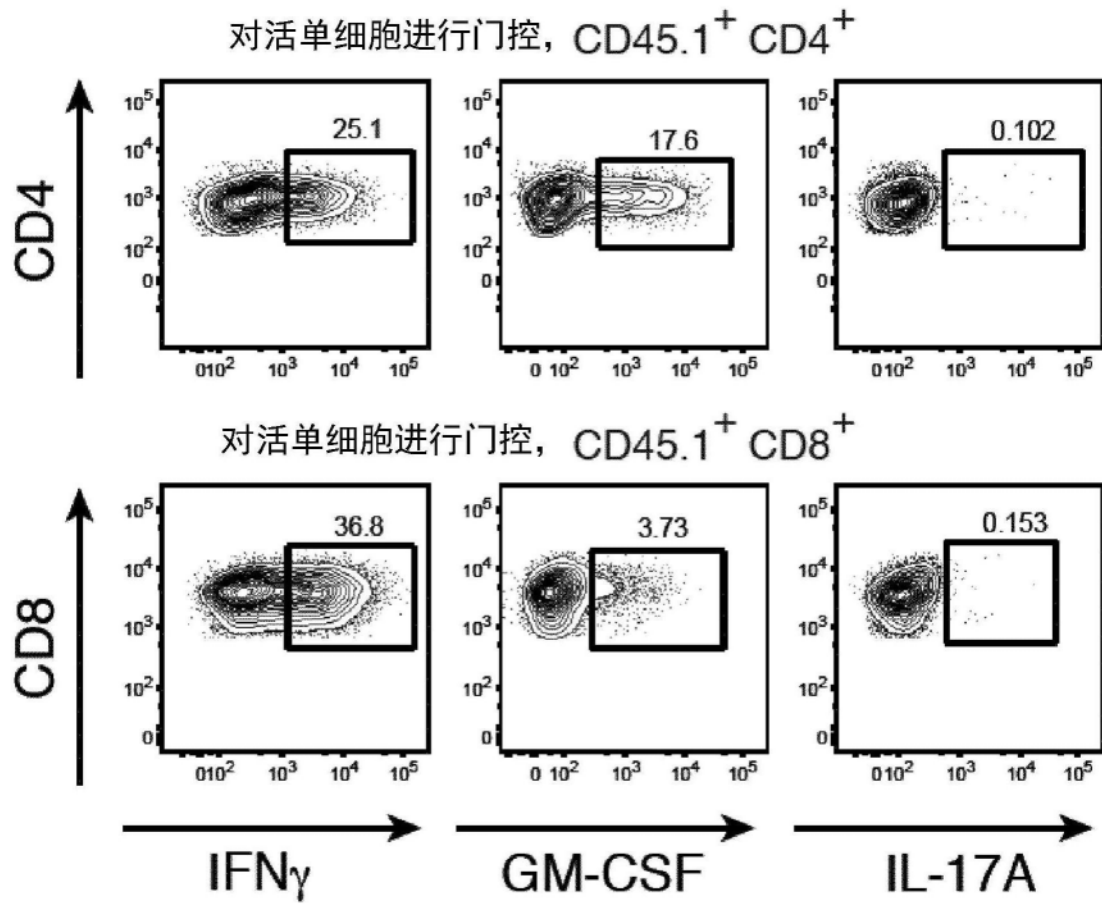


图1C

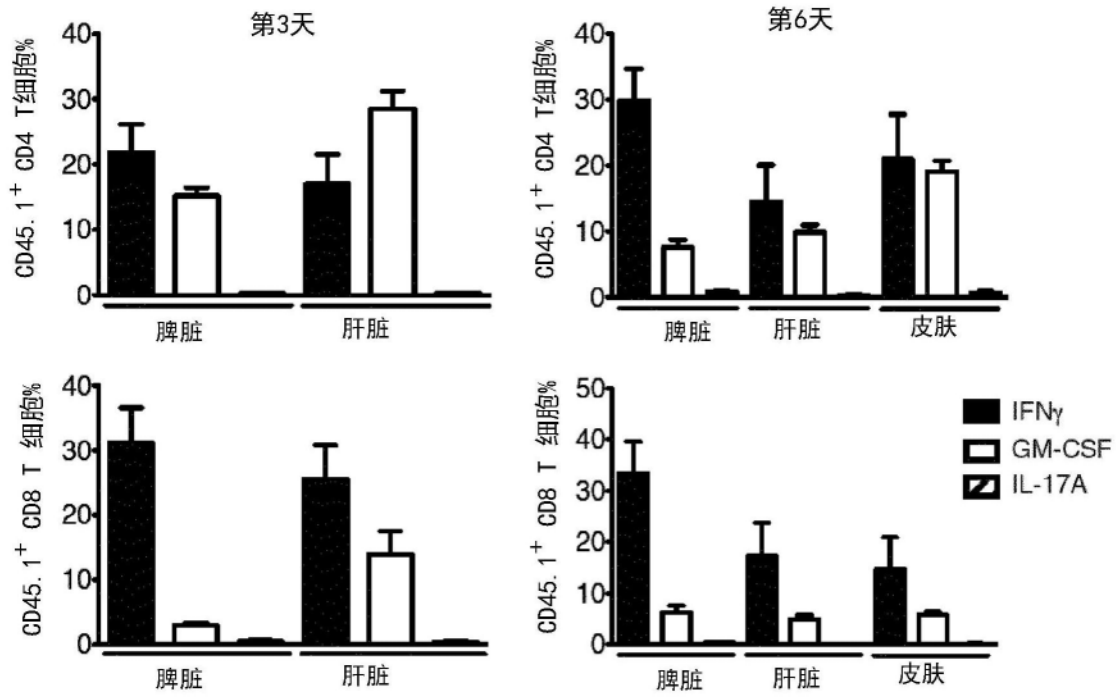


图1D

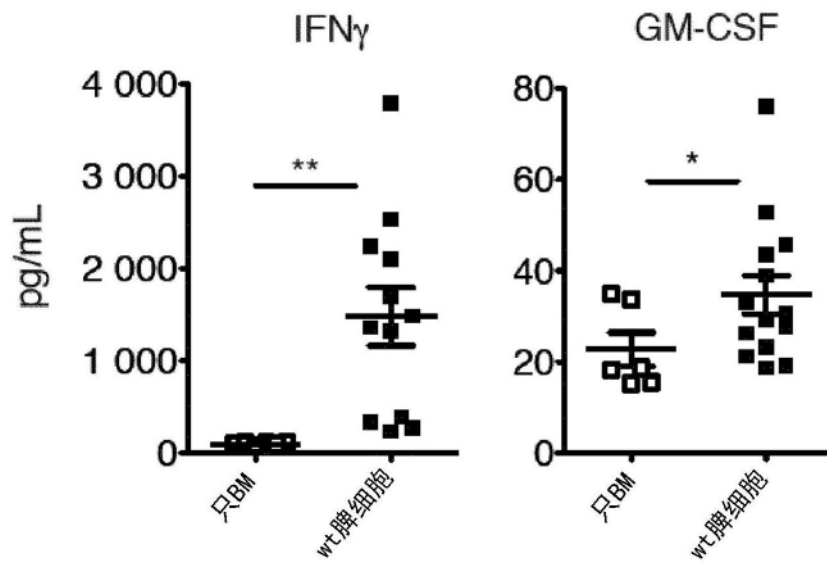


图1E

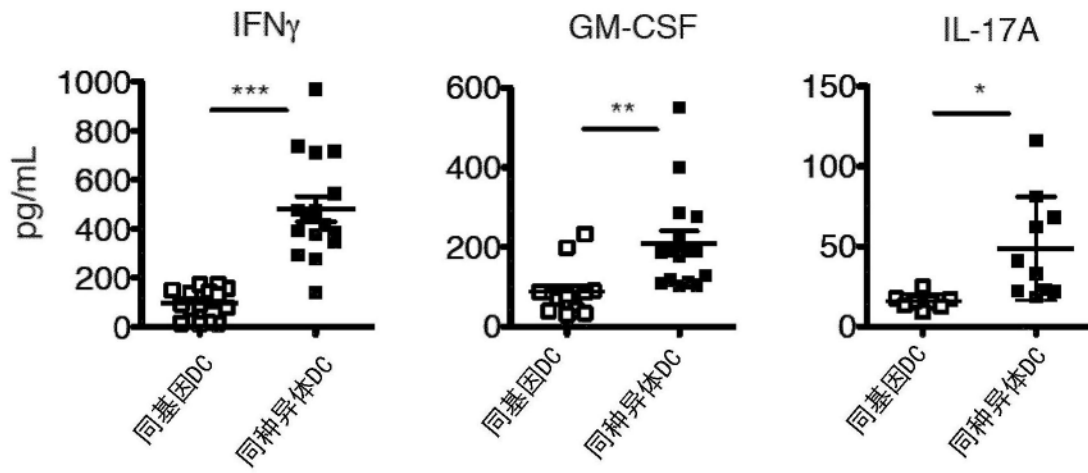


图1F

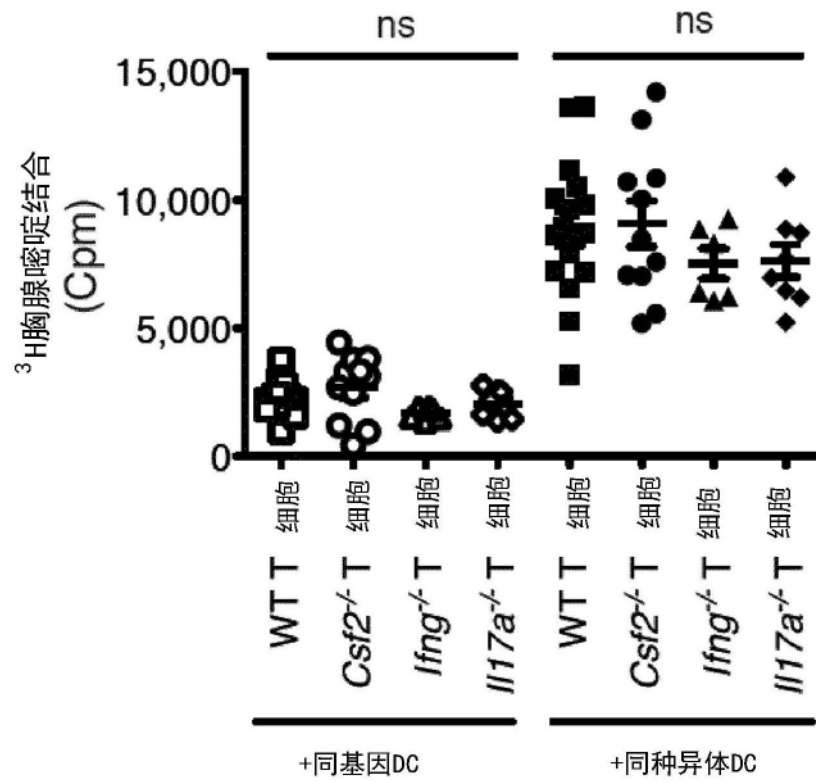


图1G

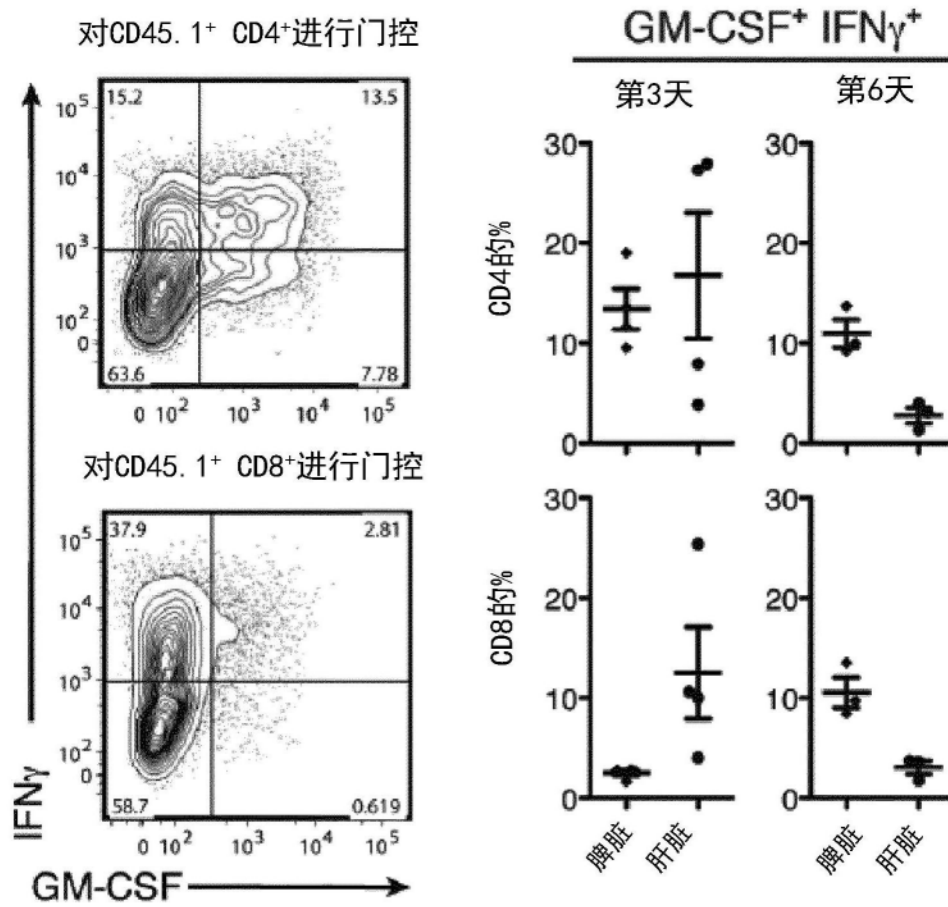


图1H

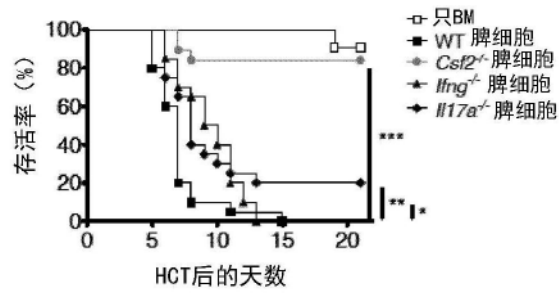


图2A

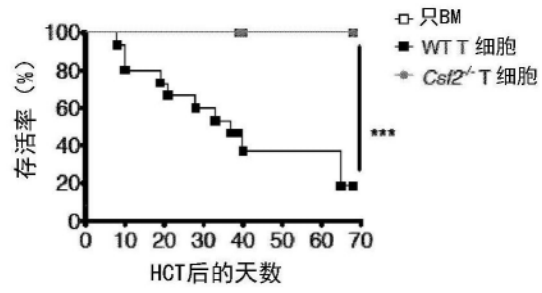


图2B

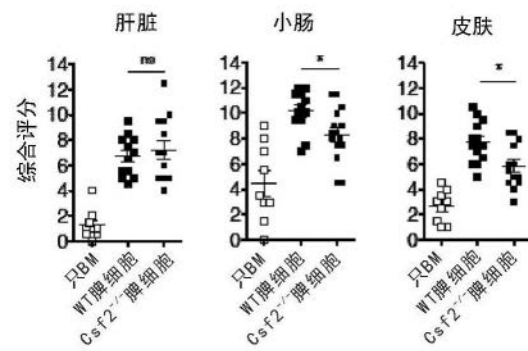


图2C

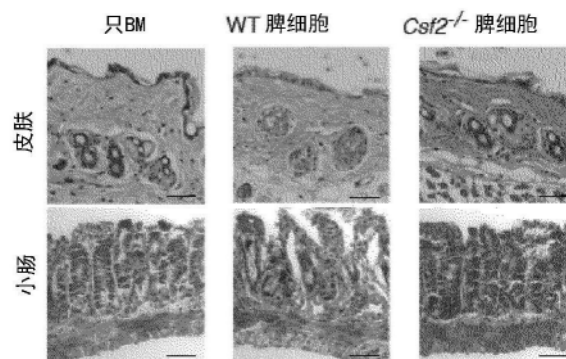


图2D

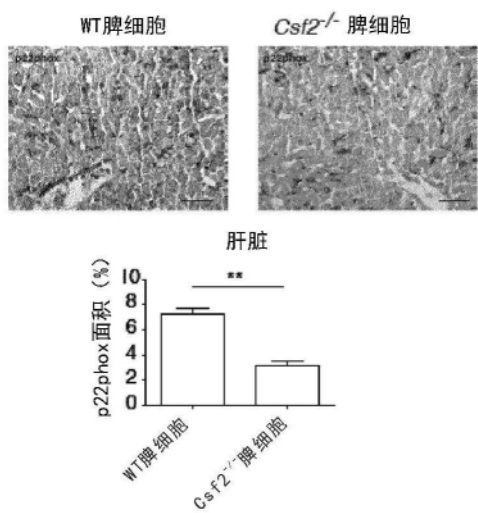


图2E

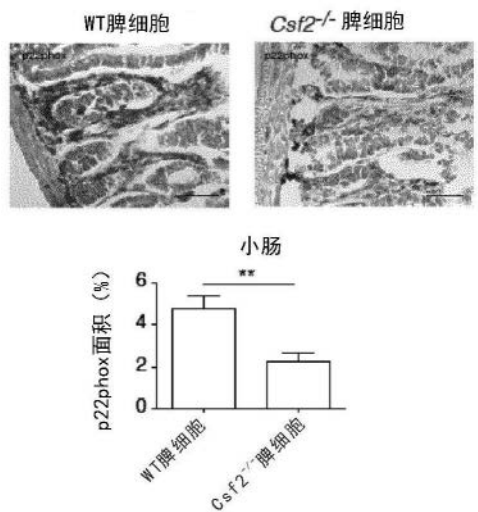


图2F

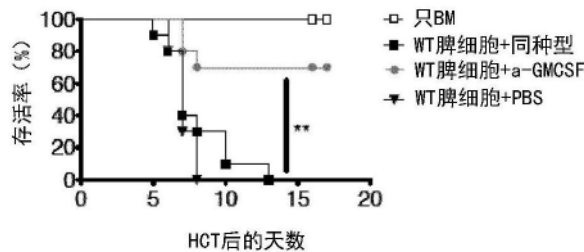


图2G

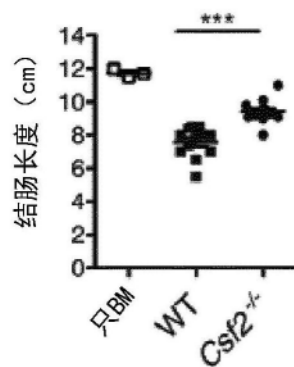


图2H

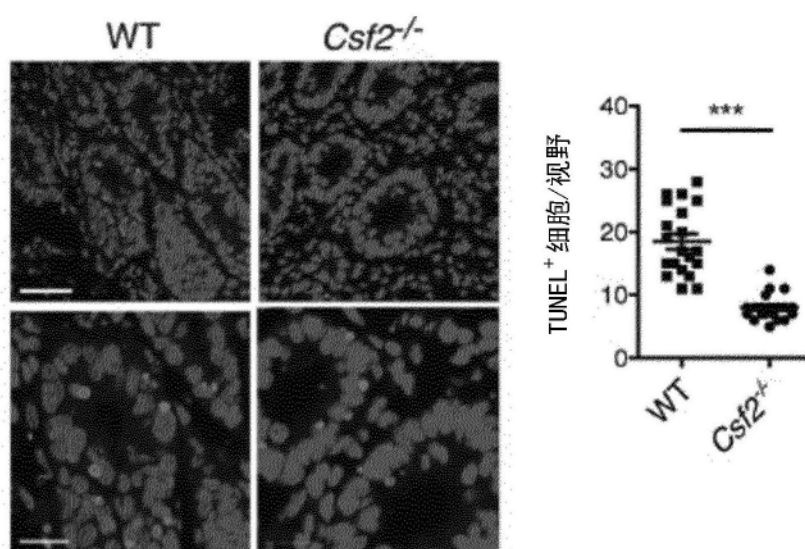


图2I

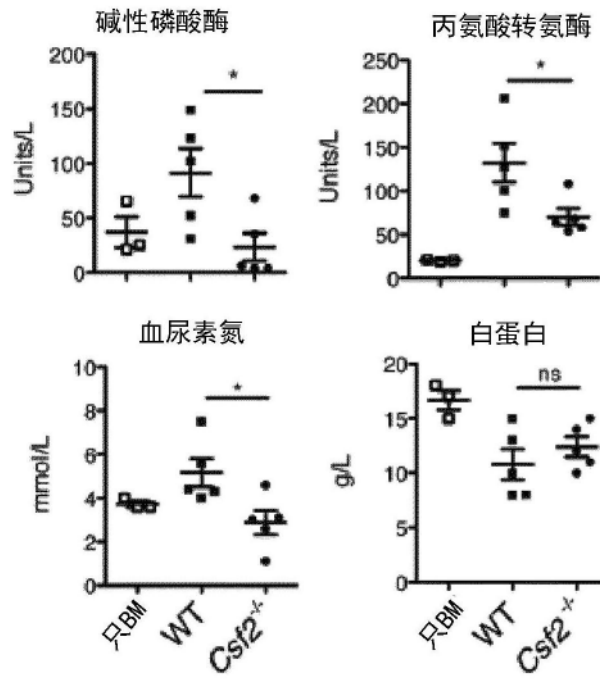


图2J

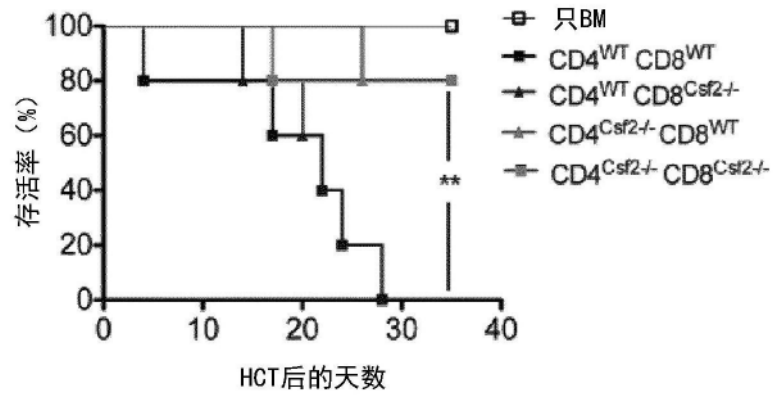


图2K

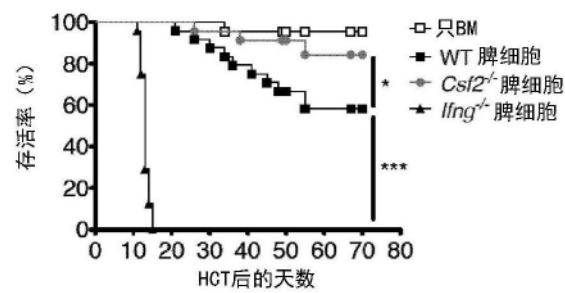


图3A

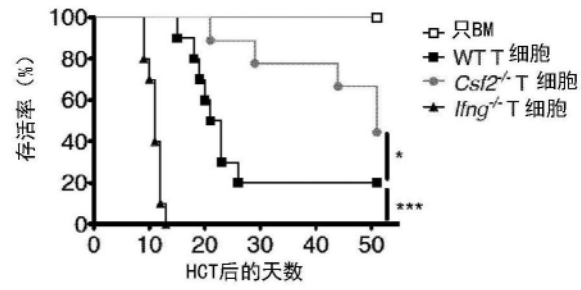


图3B

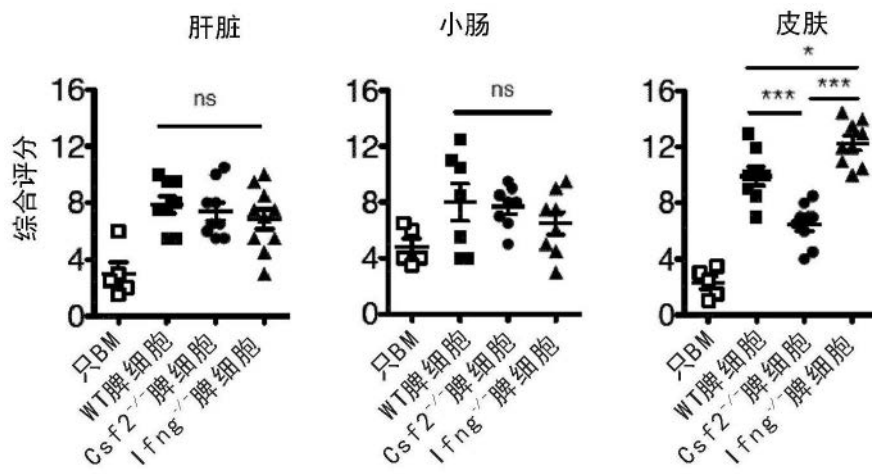


图3C

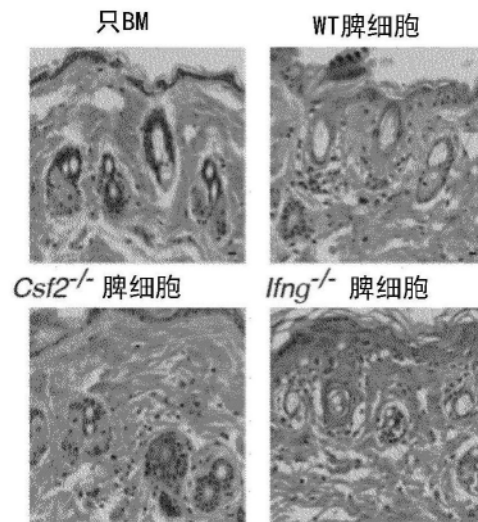


图3D

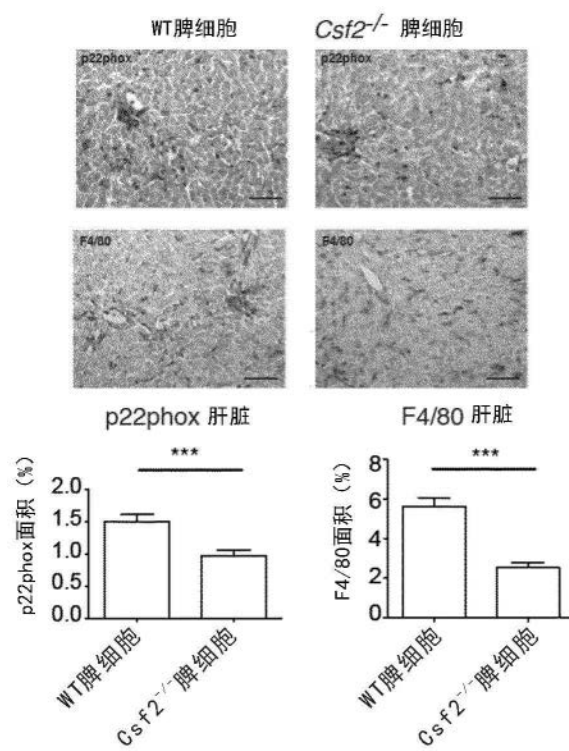


图3E

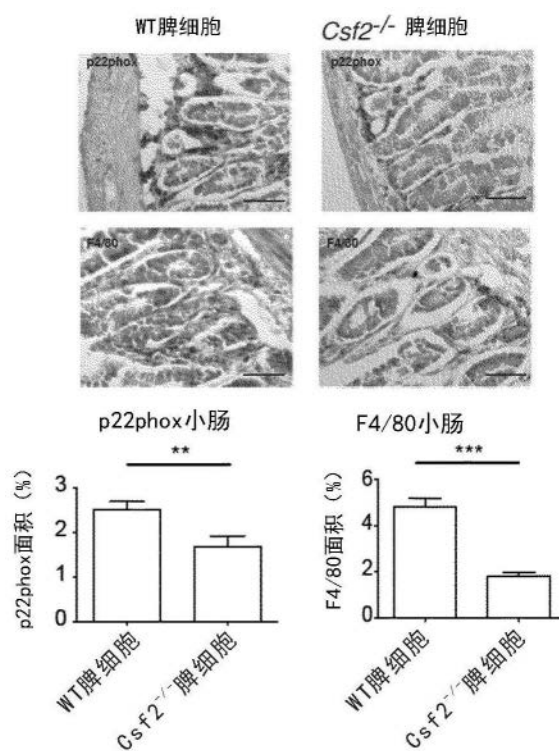


图3F

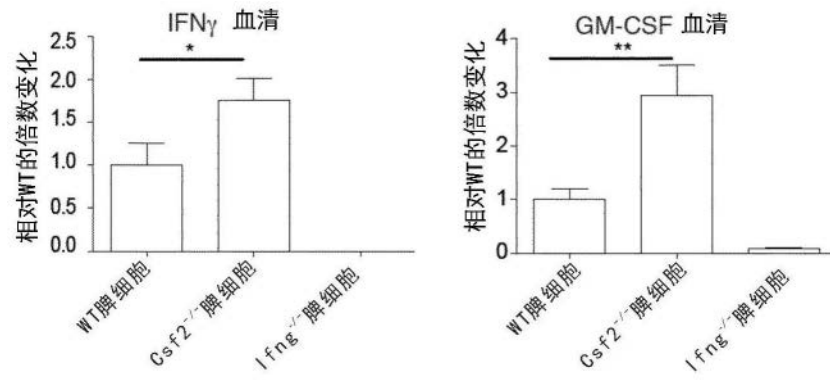


图3G

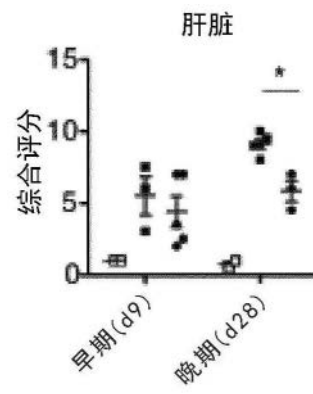


图3H

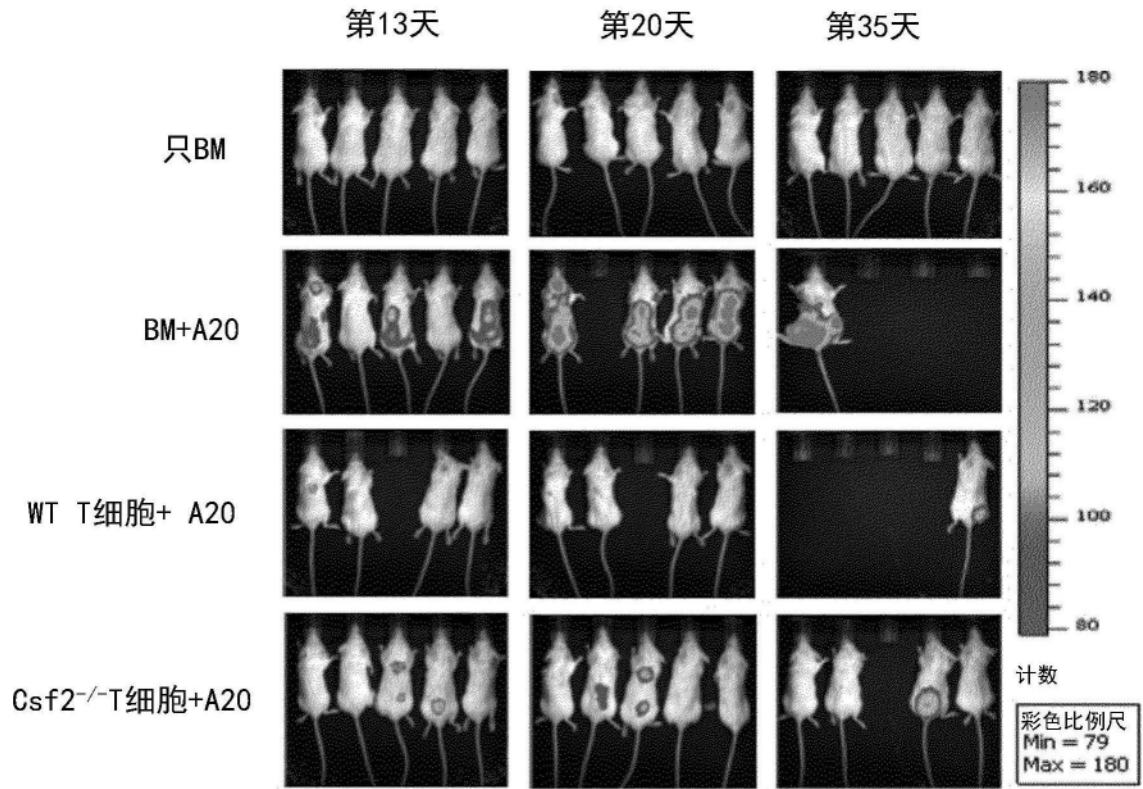


图4A

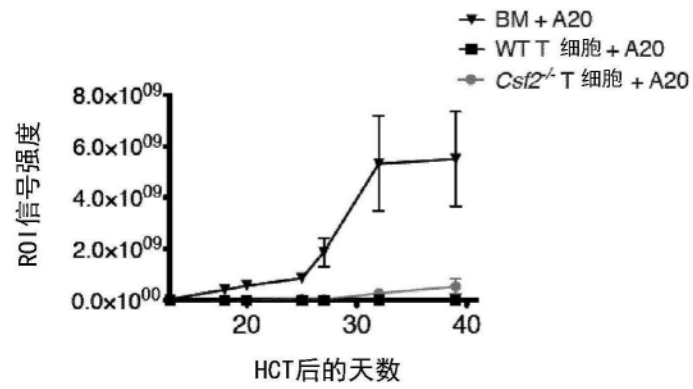


图4B

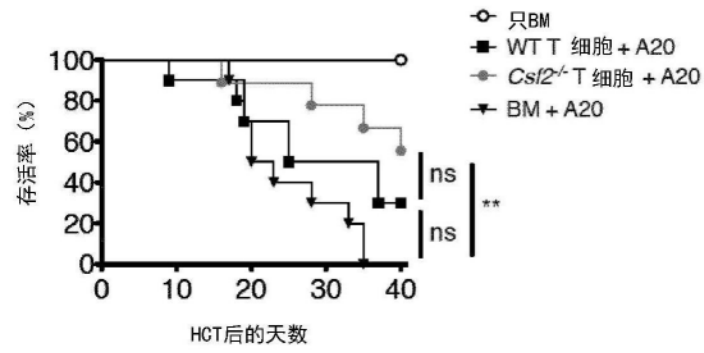


图4C

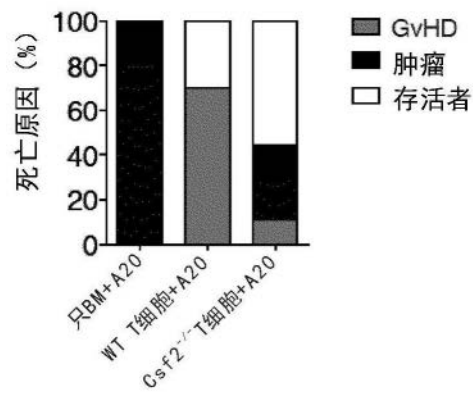


图4D

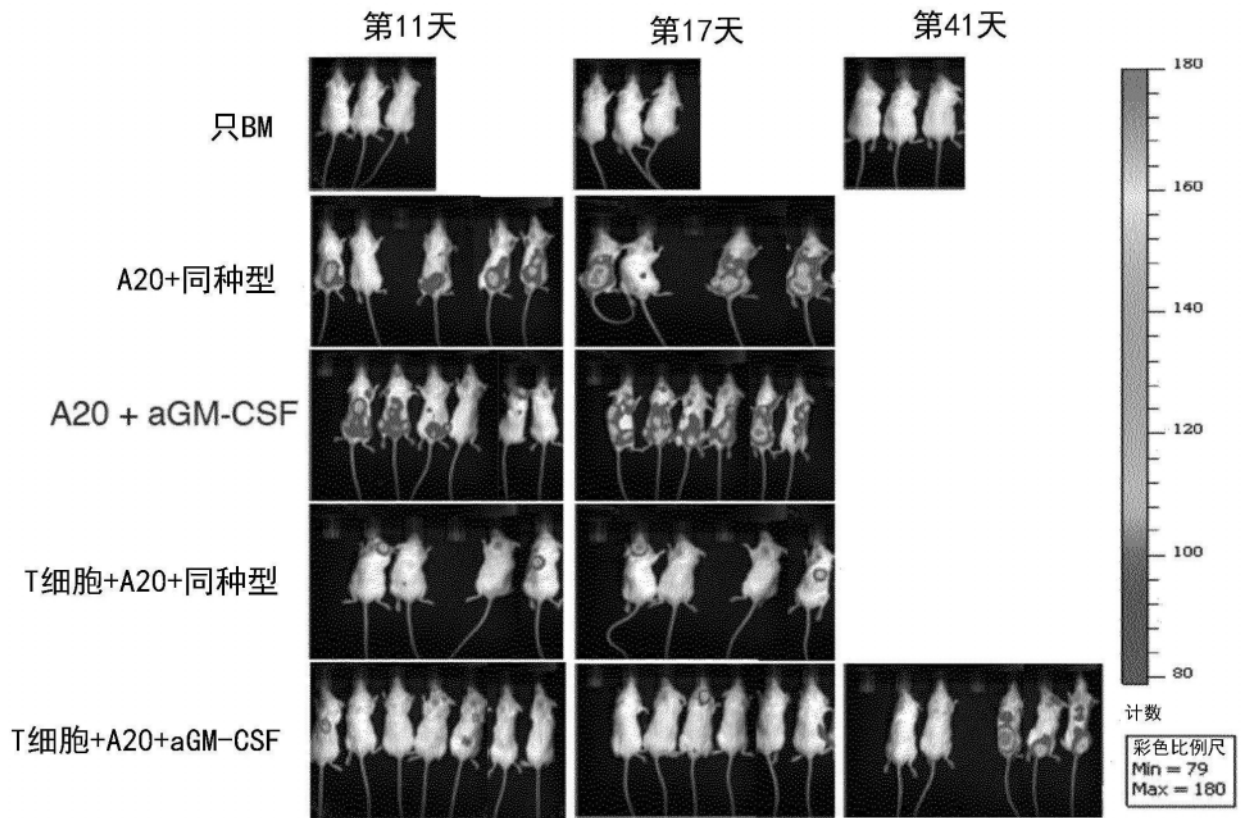


图4E

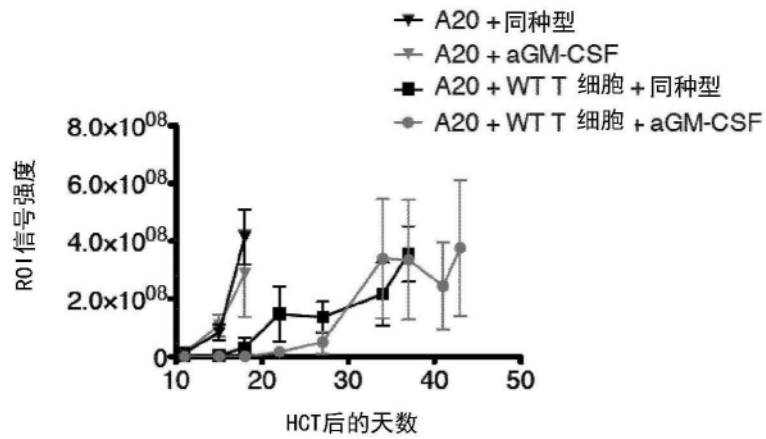


图4F

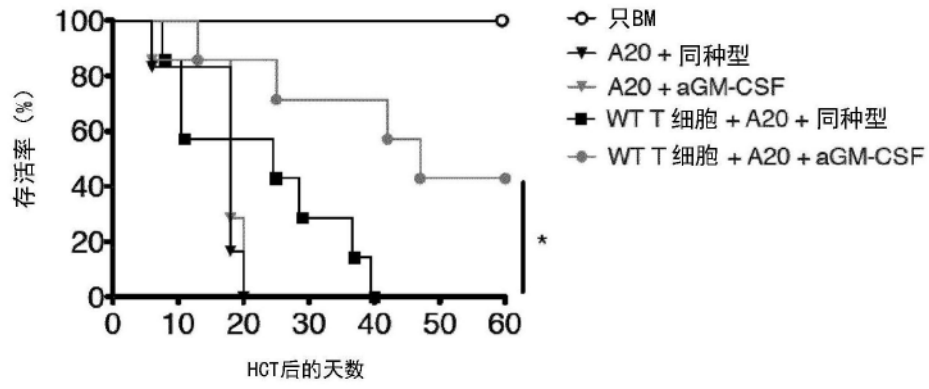


图4G

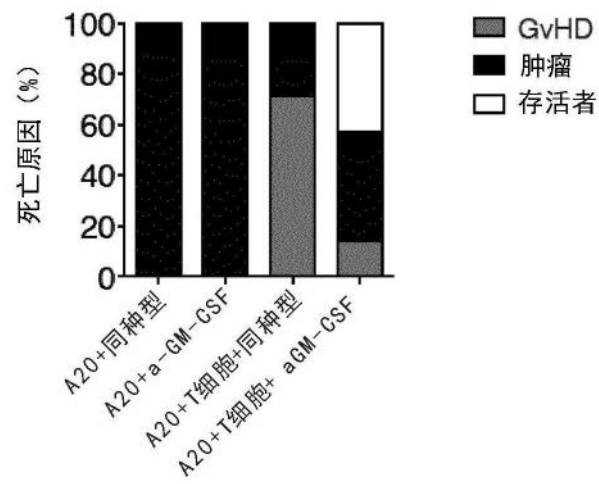


图4H

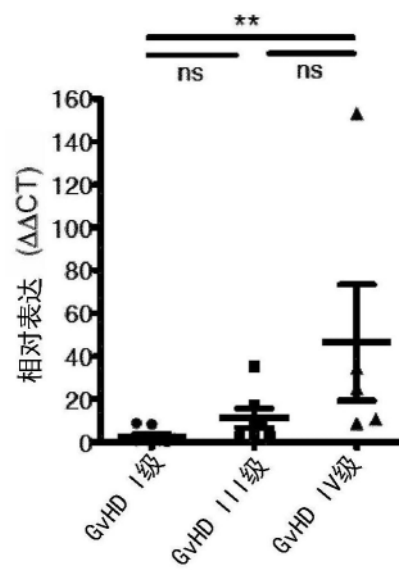


图5A

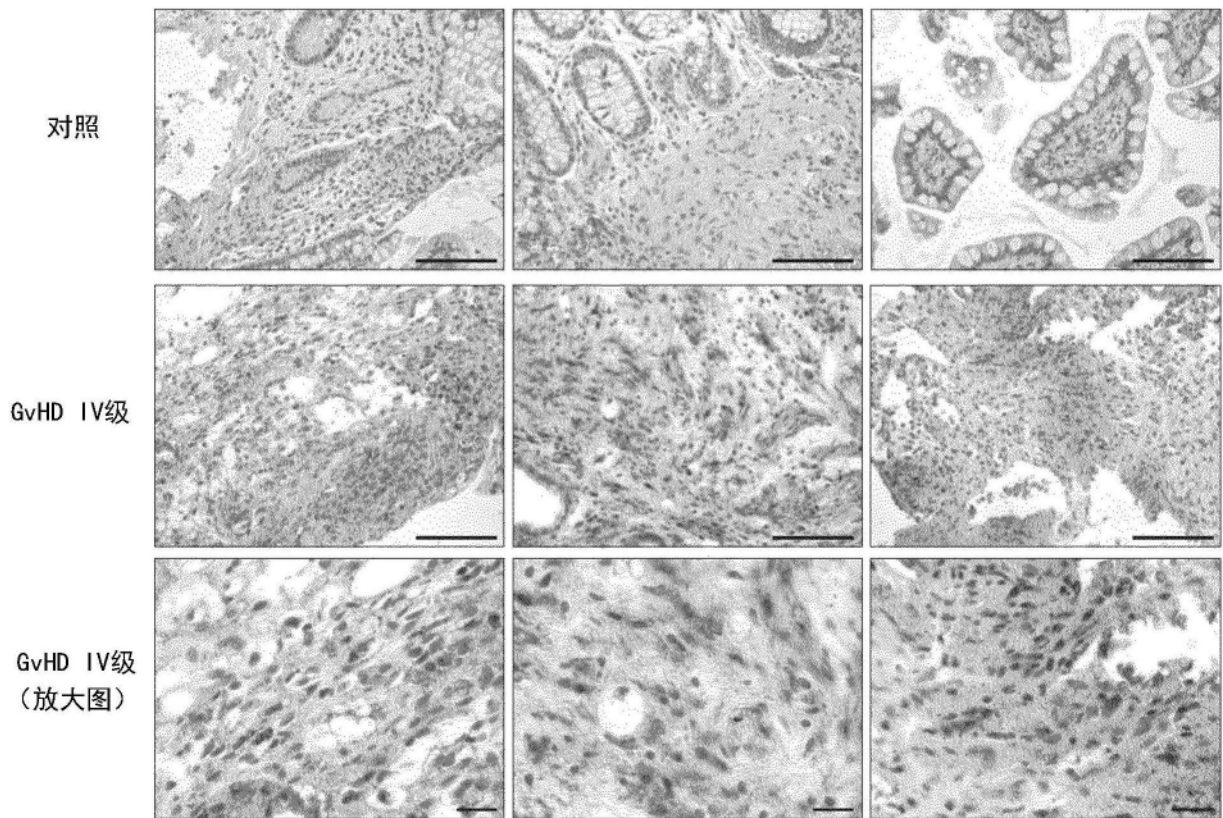


图5B

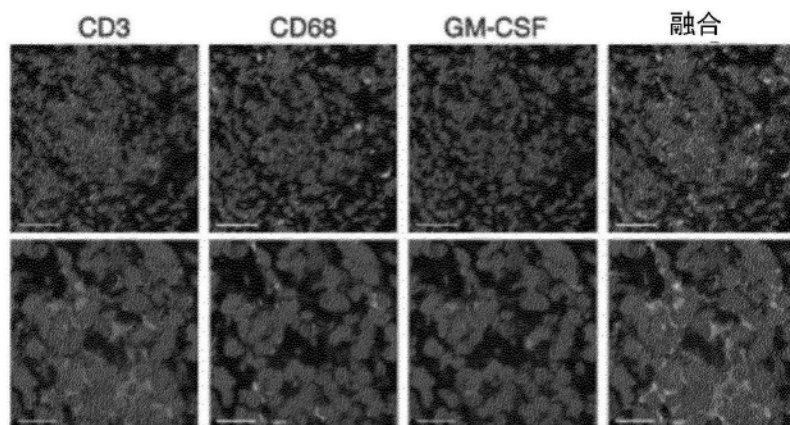
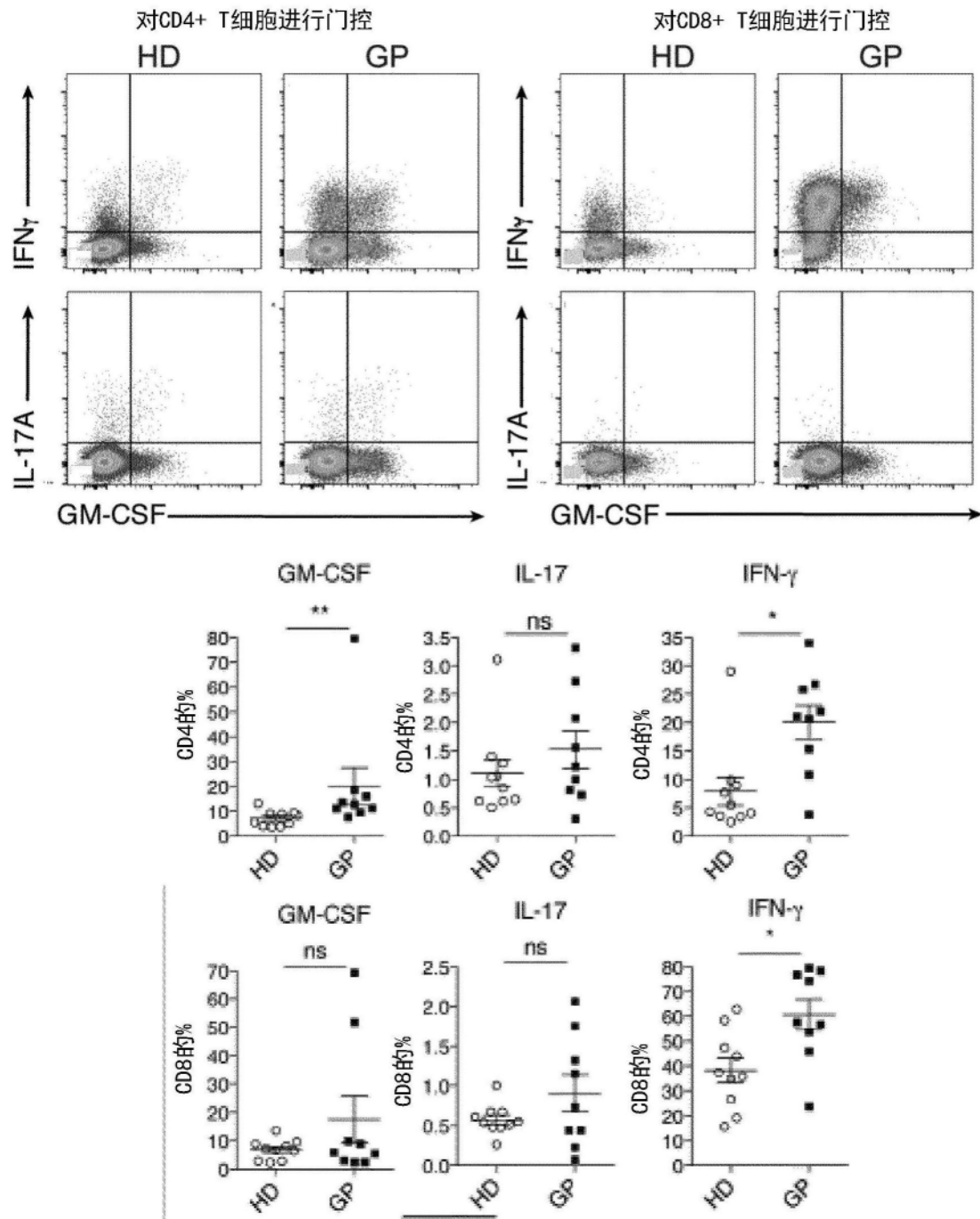


图5C



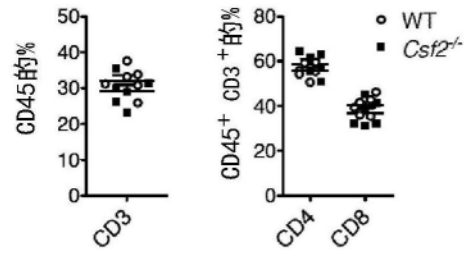


图6A

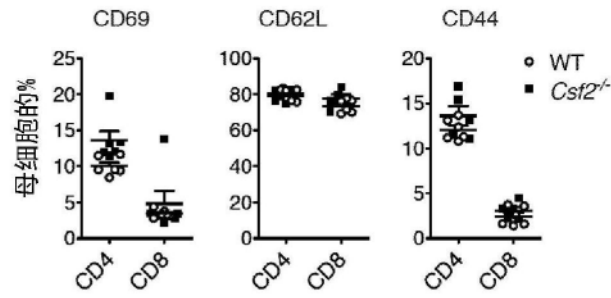


图6B

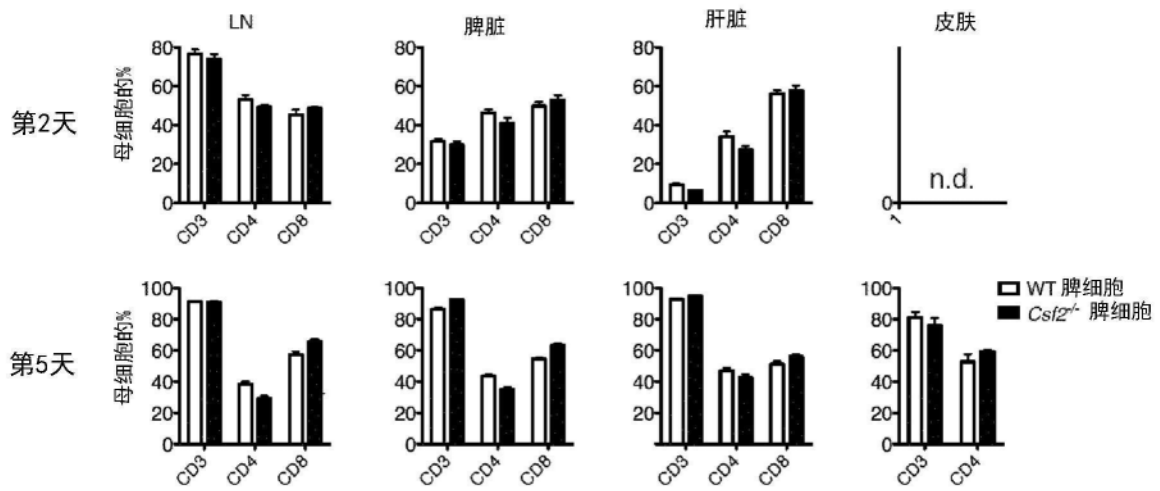


图6C

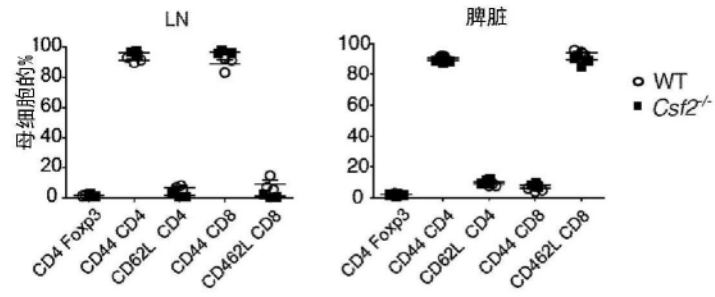


图6D

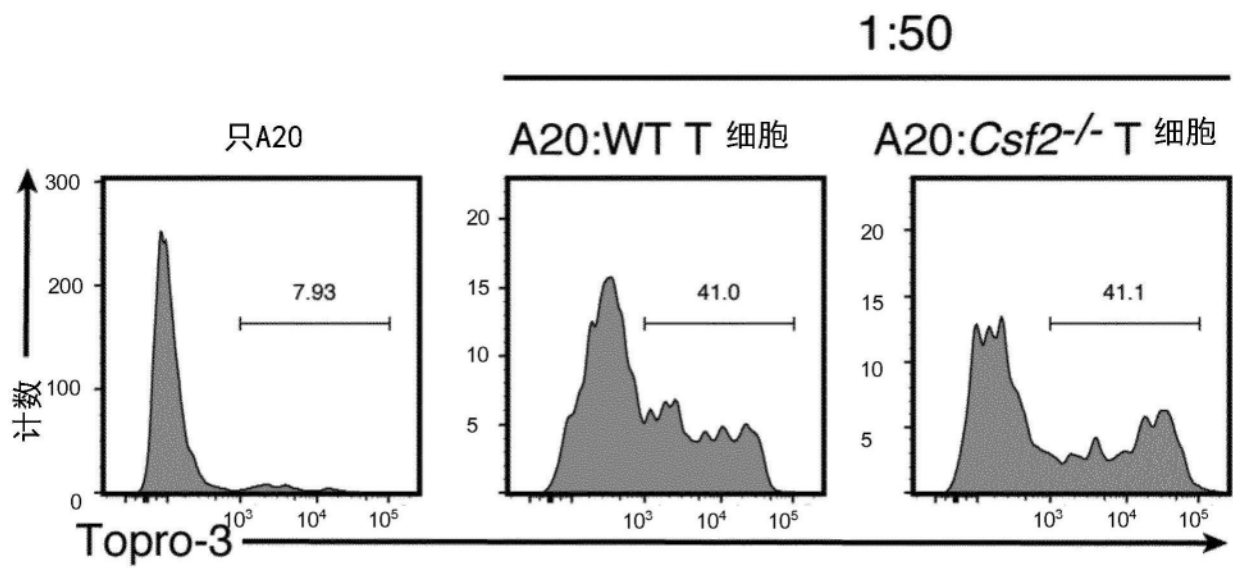


图7A

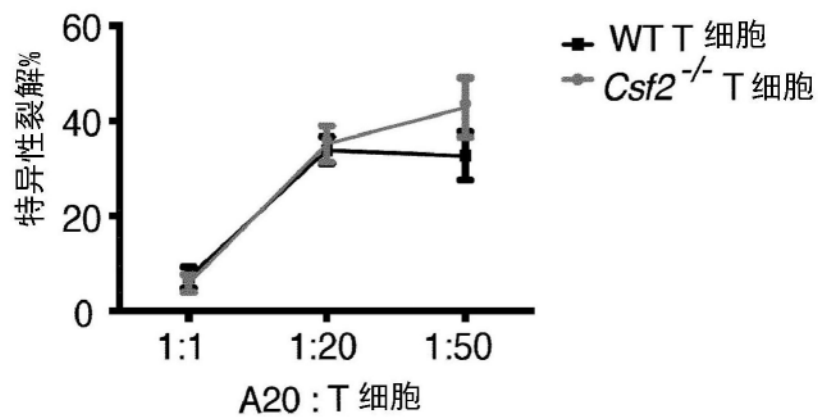


图7B

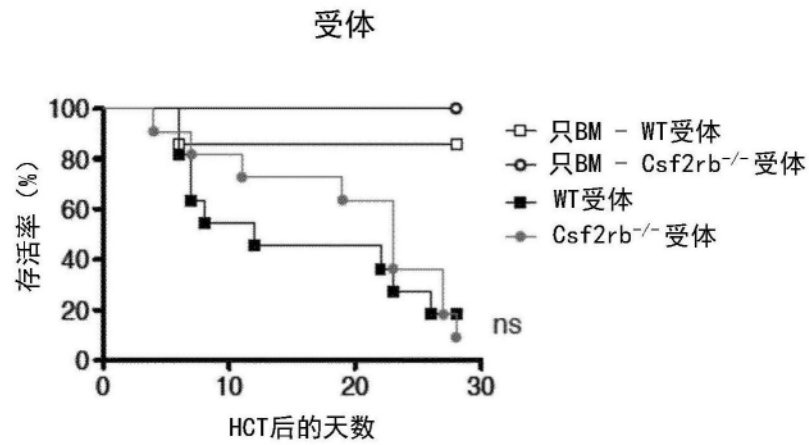


图8A

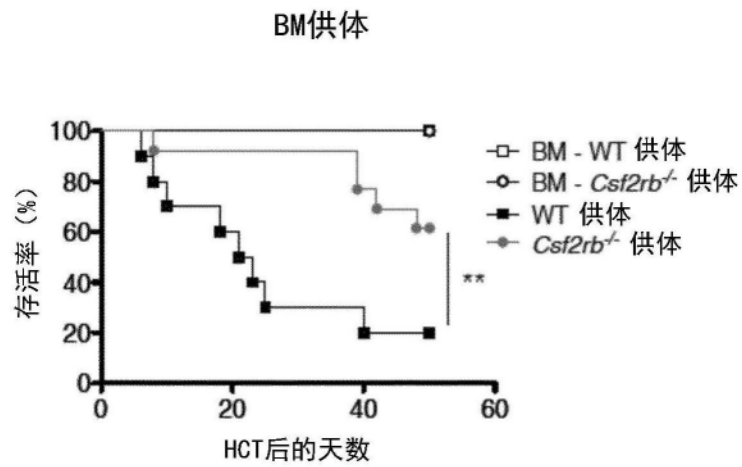


图8B

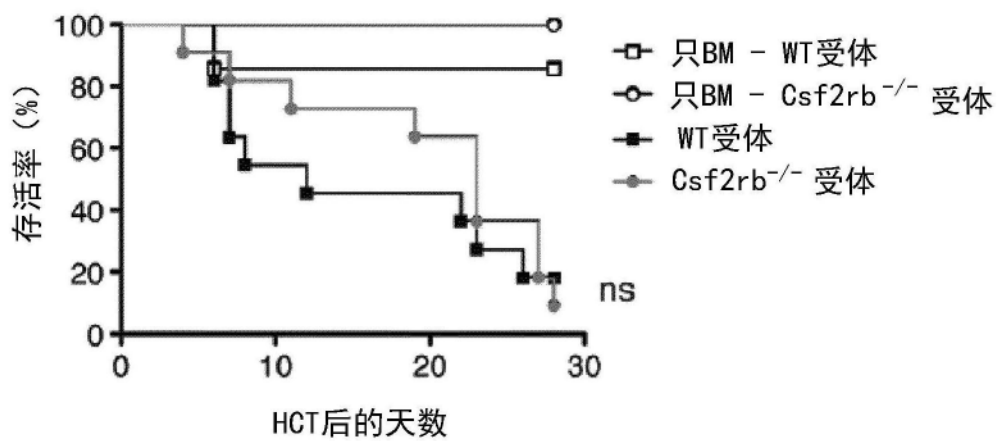


图9A

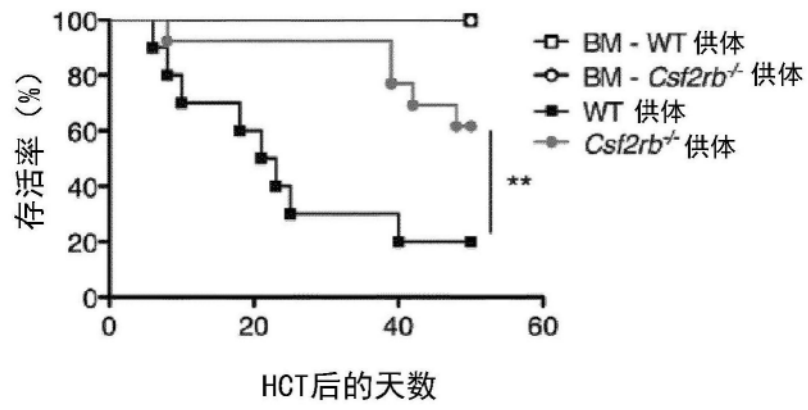


图9B

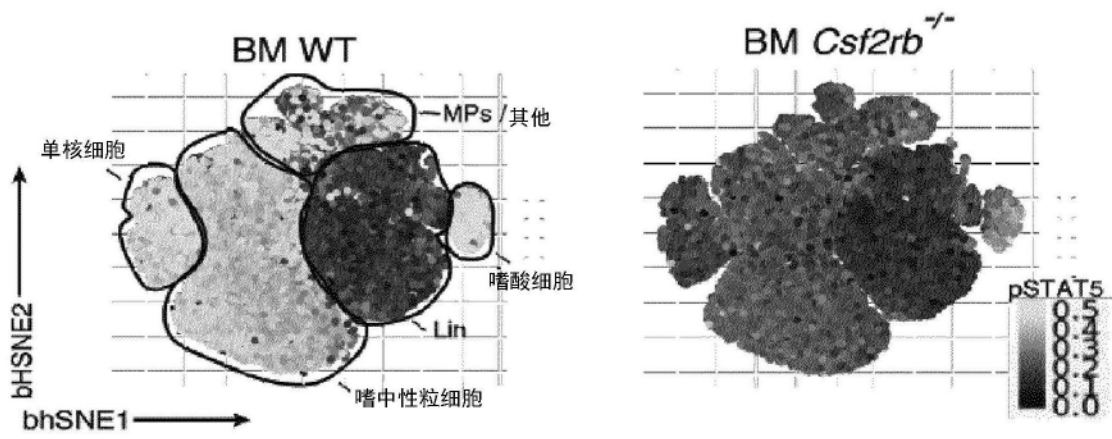


图9C

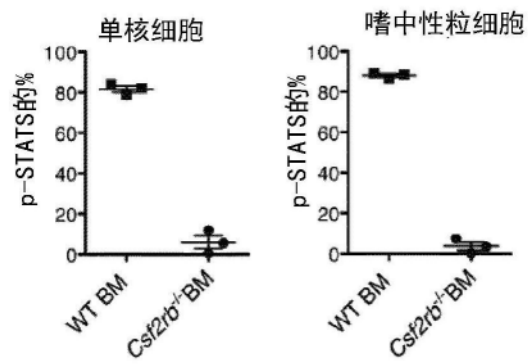


图9D

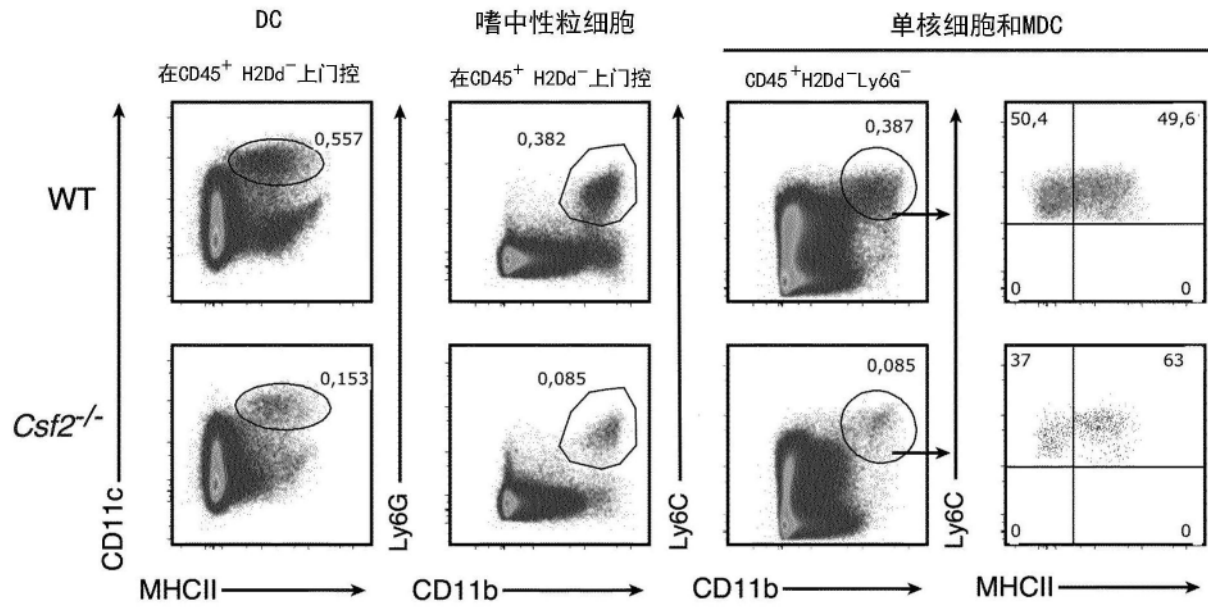


图9E

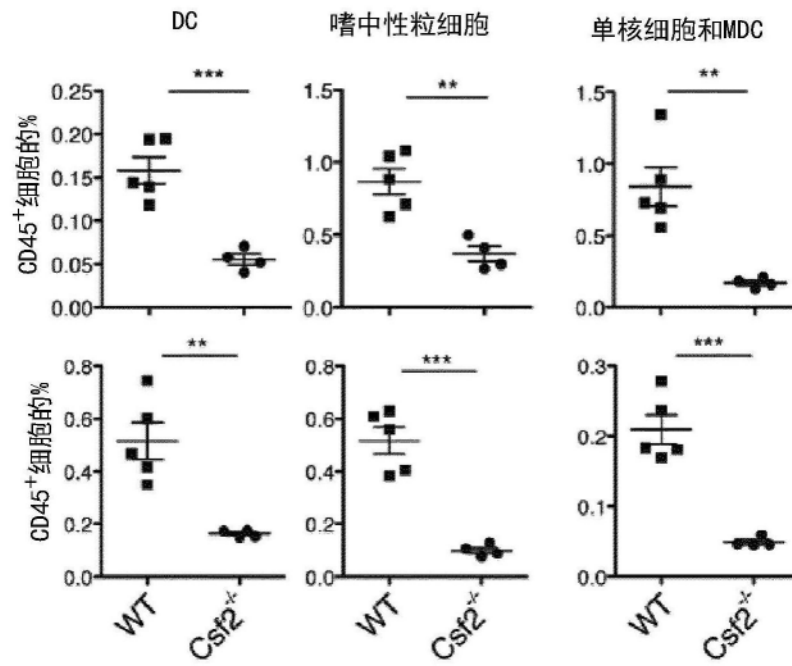


图9F

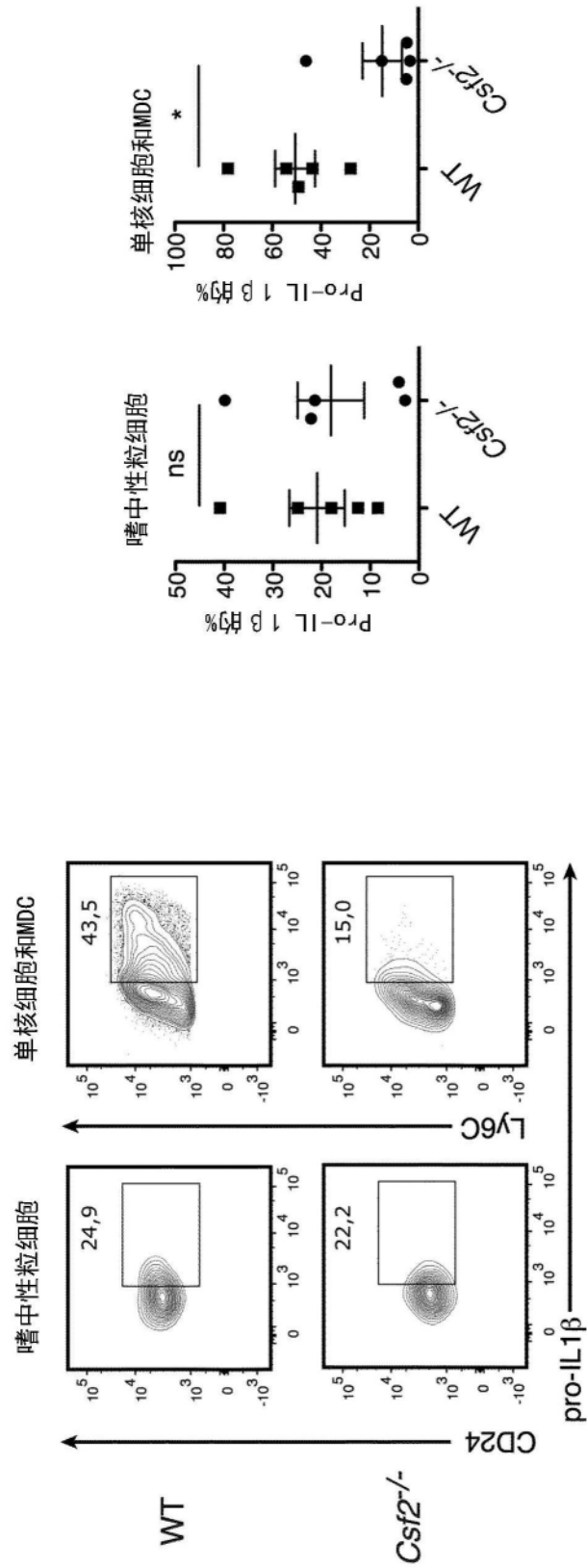


图9G

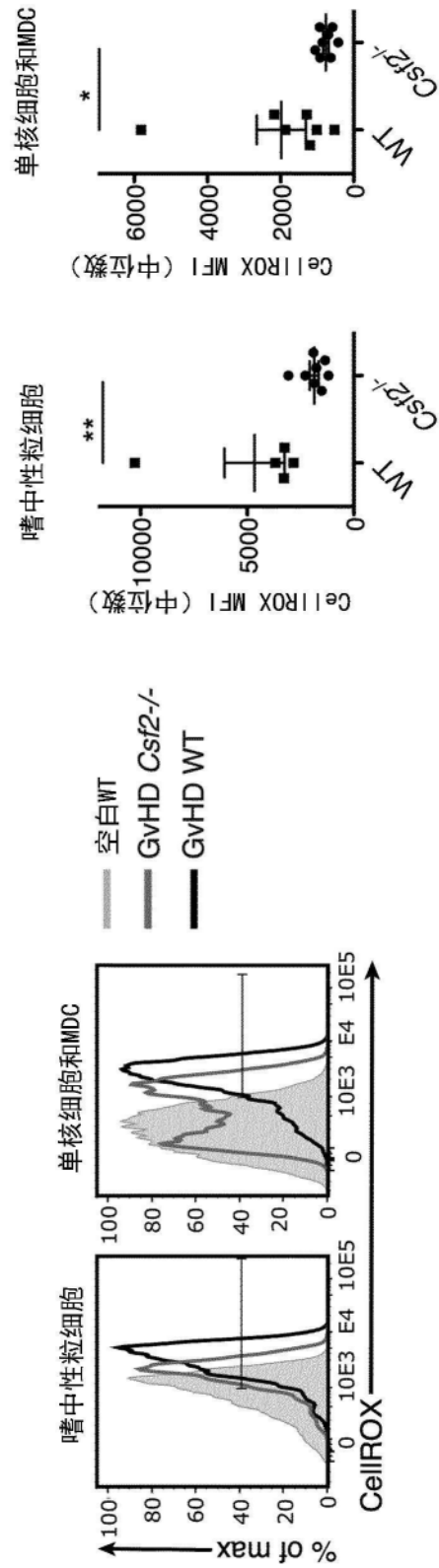


图9H