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

(21) PI 0920546-2 A2

(22) Data do Depósito: 08/10/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 02/06/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA IDENTIFICAR, SELECIONAR E INFORMAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA, USOS DE UM AGENTE TERAPÊUTICO, DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA A CD52, OU DE UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO DITO ANTICORPO E UM ANTAGONISTA DE IL-21, BEM COMO KITS PARA DETECTAR O NÍVEL DE IL-21 SÉRICO EM UM PACIENTE, PARA TRATAR ESCLEROSE MÚLTIPLA E PARA IDENTIFICAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 07/11/2008 US 61/198,631; 08/10/2008 US 61/195,658; 24/10/2008 US 61/197,187.

(71) Depositante(es): CAMBRIDGE ENTERPRISE.

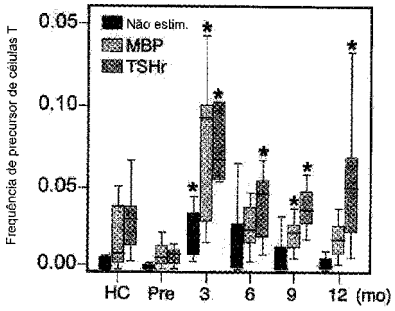
(72) Inventor(es): ALASDAIR J. COLES; JOANNE L. JONES; ALASTAIR COMPSTON.

(86) Pedido PCT: PCT IB2009007327 de 08/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/041149 de 15/04/2010

(85) Data da Fase Nacional: 08/04/2011

(57) Resumo: MÉTODOS PARA IDENTIFICAR, SELECIONAR E INFORMAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA, USOS DE UM AGENTE TERAPÊUTICO, DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA A CD52, OU DE UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO DITO ANTICORPO E UM ANTAGONISTA DE IL-21, BEM COMO KITS PARA DETECTAR O NÍVEL DE IL-21 SÉRICO EM UM PACIENTE, PARA TRATAR ESCLEROSE MÚLTIPLA E PARA IDENTIFICAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA A presente invenção refere-se a métodos para diagnosticar pacientes com esclerose múltipla (MS), incluindo métodos para identificar pacientes com esclerose múltipla que estão em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos causada, por exemplo, por tratamento com um anticorpo anti-CD52. Estão também englobados métodos para selecionar regimes de tratamento para pacientes com MS, e reagentes úteis para os métodos acima.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA IDENTIFICAR, SELECIONAR E INFORMAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA, USOS DE UM AGENTE TERAPÊUTICO, DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA A CD52, OU DE UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO DITO ANTICORPO E UM ANTAGONISTA DE IL-21, BEM COMO KITS PARA DETECTAR O NÍVEL DE IL-21 SÉRICO EM UM PACIENTE, PARA TRATAR ESCLEROSE MÚLTIPLA E PARA IDENTIFICAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA".**

O presente relatório descritivo inclui o arquivo "sequencetxt" concorrentemente depositado, que foi criado em 8 de outubro de 2009, com tamanho de 8.856 bytes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Esclerose múltipla ("MS)" é um distúrbio autoimune inflamatório do sistema nervoso central (Compston e Coles, Lancet **372**, 1502-17 (2008)). Com prevalência de cerca de um em 1.000, MS é a causa mais comum de incapacidade neurológica em adultos jovens (Polman e Uitdehaag, BWilX, 490-4 (2000)). MS envolve o comprometimento do sistema imunológico, lesão inflamatória aguda de axônios e glia, recuperação de função e reparo estrutural, gliose pós-inflamatória, e neurodegeneração (vide, por exemplo, Composton e Coles, 2008). Esses processos sequenciais fundamentam o curso clínico caracterizado por episódios com recuperação, episódios que deixam déficits persistentes, e progressão secundária. *Id.*

A meta do tratamento de MS é reduzir a frequência e gravidade de recaídas, impedir que incapacidade surja com a progressão da doença, e promover reparo tecidual (Compston e Coles, 2008). A abordagem primária para o tratamento de MS é modulação ou supressão do sistema imunológico. Correntemente, fármacos disponíveis para MS incluem interferon beta-1a (por exemplo, AVONEX e REBIF), interferon beta-1b (por exemplo, BETASERON), acetato de glatirâmero (por exemplo, COPAXONE), mitoxantrona (por exemplo, NOVANTRONE), e natalizumab (por exemplo, TYSABRI). Outro fármaco novo promissor para MS é alentuzumab (CAMPATH-1H).

Alentuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado direciona-

Segue-se folha 1a/39

do contra CD52, uma proteína largamente distribuída sobre a superfície dos linfócitos e monócitos, mas com função desconhecida. Alentuzumab tem sido usado para o tratamento de leucemia linfocítica crônica de células B. Um pulso único de tratamento leva à linfopenia rápida, profunda, e prolongada. Os números de células se recuperam, mas em taxas variáveis; células T

Segue-se folha 2/39

CD4+ são de recuperação particularmente lenta, permanecendo esgotadas por pelo menos cinco anos (Coles et al., *Journal of Neurology* **253**, 98-108 (2006)). Ensaio de fase 2 (grupo de estudo CAMMS-223; Coles et al., *N. Engl. J. Med.* **359,** 1786-1801 (2008)) mostrou que alentuzumab é altamente eficaz no tratamento de esclerose múltipla reincidente-remissiva. Esse fármaco reduz o risco de atividade doentia e acúmulo da incapacidade por mais que 70% em comparação com interferon-beta em paciente com esclerose múltipla reincidente-remissiva precoce. O principal efeito adverso é a autoimunidade, que surge quando do assentamento da linfopenia de células T meses a anos depois da dosagem. Cerca de 20%-30% dos pacientes desenvolvem autoimunidade da tireoide, principalmente a doença de Graves (Coles et al., Lancet **354**, 1691-1695 (1999)), e 3% têm trombocitopenia imune (ITP) (Coles et al., 2008). Casos únicos de doenças de Goodpasture, neutropenia autoimune (Coles et al., *Journal of Neurology* **253**, 98-108 (2006)) foram também observados. Além disso, mais de 5,5% de pacientes desenvolvem autoanticorpos não-tireoide constantes sem doença clínica (Coles et al., 2006). A sincronização e espectro da autoimunidade depois do alentuzumab são similares àquelas vistas em outros exemplos de "autoimunidade de reconstituição" em outros contextos clínicos; por exemplo, doença de tireoide autoimune e citopenias autoimunes também predominam meses a anos após transplantes de células-tronco hematopoiéticas ou tratamento anti-retroviral de HIV (Chen et al., Medicine (Baltimore) **84**, 98-106 (2005); Daikeler e Tyndall, *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **20**, 349-360 (2007); Jubault et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4254-4257 (2000); Ting, Ziegler, e Vowels, *Bone Marrow Transplant.* **21**, 841-843 (1998); Zandman-Goddard and Shoenfeld, *Autoimmun. Rev.* **1**, 329-337 (2002)).

Embora a autoimunidade que surge no contexto de linfopenia seja bem reconhecida em modelos de animais, ela é raramente encontrada e, logo, difícil de se estudar em seres humanos. A maioria dos pacientes linfopênicos não desenvolve autoimunidade, sugerindo que fatores adicionais estão envolvidos (Krupica et al., *Clin Immunol* **120**, 121-128 (2006)). Permanecem indefinidos que fatores adicionais são estes. A depleção de células T

reguladoras foi considerada como um fator, como visto nos modelos de murino para colite e gastrite (Alderuccio et al., *J Exp. Med* **178**, 419-426 (1993); McHugh et al., *J Immunol* **168**, 5979-5983 (2002); Powrie et al., *Int. Immunol* **5,** 1461-1471 (1993); Sakaguchi et al., *J Immunol* **155**, 1151-1164 (1995)). Contudo, foi observado que células T reguladoras aumentam depois de alentuzumab em pacientes humanos e, depois disso, retornam para níveis normais (Cox et al., *Eur J Immunol* **35,** 3332-3342 (2005)). Essa observação foi replicada (Bloom et al., *Am J Transplant.* **8**, 793-802 (2008)) e está se igualando com outros modelos linfopênicos experimentais (de Kleer, I. et al., *Blood* **107**, 1696-1702 (2006); Zhang, H. et al, *Nat Med* **11,** 1238-1243 (2005)).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foram inventados métodos novos e úteis e composições para aperfeiçoar a administração de risco no tratamento da MS. Os métodos e composições reduzem os efeitos colaterais do tratamento de MS tal como autoimunidade secundária, e ajudam os profissionais de saúde e pacientes na seleção de regimes para o tratamento de MS e monitoramento pós-tratamento. Os métodos e as composições desta invenção estão baseados na constatação de que pacientes com esclerose múltipla (MS), IL-21 elevada, detectável mesmo antes da terapia de depleção de linfócitos, tal como terapia com alentuzumab, se correlaciona com risco aumentado de desenvolver autoimunidade secundária depois da terapia. Foi descoberto ainda que o nível de IL-21 no indivíduo pode ser geneticamente determinado: genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) de A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978 estão associados à Il-21 elevada.

Por conseguinte, a presente invenção proporciona métodos para identificar um paciente com MS que tem interleucina-21 elevada (IL-21) em comparação com a IL-21 em um paciente sem doença autoimune. Em algumas modalidades, os métodos compreendem a etapa de medir a IL-21 em uma amostra de sangue proveniente de um paciente com MS, identificando, assim, um paciente com MS que tem IL-21 elevada em comparação com o dito paciente. Alternativamente, os métodos compreendem a etapa de geno-

tipar o paciente para detectar a presença ou ausência no paciente de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) associados à IL-21 elevada, tais como aqueles selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um ou mais dos ditos genótipos está associada à IL-21 elevada.

A invenção compreende ainda métodos para identificar um paciente com MS que corre risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos. Em algumas modalidades, os métodos compreendem a etapa de averiguar (por exemplo, por medição) o nível de interleucina-21 (IL-21) em uma amostra de sangue do paciente com MS, em que o nível de IL-21 elevado comparado ao de um paciente sem doença autoimune indica que o paciente está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem IL-21 elevada. Alternativamente, os métodos compreendem a etapa de averiguar (por exemplo, por genotipagem) a presença ou ausência no paciente de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) associados à IL-21 elevada tais como aqueles selecionados grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um ou mais (por exemplo, dois ou três) dos ditos genótipos está associada a um risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem o dito um o mais genótipos. Esses métodos compreendem opcionalmente a etapa de informar ao paciente e/ou seu serviço da saúde sobre o dito risco aumentado, e/ou a etapa de registrar o risco aumentado.

A invenção proporciona ainda métodos para selecionar ou identificar um paciente com MS que necessita de monitoramento intensificado para desenvolvimento de uma doença autoimune secundária depois da terapia de depleção de linfócitos. Esses métodos podem compreender a etapa de medir IL-21 em uma amostra de sangue do paciente com MS, em que a IL-21 elevada no paciente comparada a um paciente sem doença autoimune

indica que o paciente está em necessidade de monitoramento intensificado de desenvolvimento de uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem IL-21 elevada. Alternativamente, os métodos podem compreender a etapa de genotipar o paciente para detectar a presença ou ausência de um ou mais genótipos de SNPs associados à IL-21 elevada, tais como aquelas selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um ou mais dos ditos SNPs indica que o paciente está em necessidade de monitoramento intensificado de desenvolvimento de uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem o dito um ou mais genótipos. Esses métodos compreendem, opcionalmente, a etapa de informar ao paciente e/ou o seu serviço de saúde sobre a necessidade de monitoramento intensificado, e/ou a etapa de registrar tal necessidade.

A invenção proporciona ainda métodos para informar sobre um tratamento do paciente com MS, que compreende medir a IL-21 em amostra de sangue do dito paciente ou genotipar o paciente quanto à presença ou ausência dos três fenótipos de SNP mencionados acima, e selecionar um regime de tratamento apropriado para a medição de IL-21 ou de genótipo.

A invenção proporciona métodos para tratar MS em um paciente conhecido como estando em necessidade destes, que compreendem as etapas de (a) obter ou averiguar informações sobre (i) IL-21 em uma amostra de sangue do paciente (por exemplo, medindo-se a IL-21 na amostra); ou (ii) a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) associados à IL-21 elevada, tais como aqueles selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978 (por exemplo, por genotipagem do paciente); (b) administrar um agente terapêutico para esclerose múltipla ao dito paciente, e (c) opcionalmente, monitorar o paciente quanto ao desenvolvimento de uma doença autoimune secundária. Em algumas modalidades, os métodos de tratamento são usados em pacientes que têm níveis de IL-21 normais e/ou não têm qualquer um dos três genótipos de SNP de

IL-21. Também englobados pela presente invenção estão os anticorpos anti-CD52 (por exemplo, alentuzumab ou um agentes biologicamente similar), ou porções de ligação de antígeno destes, que são usados nesses métodos de tratamento, e usos destes anticorpos ou porções de ligação de antígeno na fabricação de um medicamento para uso nesses métodos de tratamento. Regimes terapêuticos usando esses métodos de tratamento estão ainda englobados pela invenção.

A invenção proporciona métodos para reduzir a ocorrência ou gravidade de uma doença autoimune secundária em um paciente com esclerose múltipla que foi ou será tratado com terapia de depleção de linfócitos, em que a doença autoimune secundária ocorre após tratamento com a terapia de depleção de linfócitos, que compreende a etapa de administrar um antagonista de IL-21, por exemplo, antes, durante ou subsequente ao tratamento com a terapia de depleção de linfócitos. Também englobados pela invenção estão os antagonistas de IL-21 para uso nesses métodos (por exemplo, um anticorpo anti-IL-21 ou anticorpo de receptor anti-IL-21, ou uma porção de ligação de antígenos destes; ou um receptor de IL-21 solúvel), e usos destes antagonistas de IL-21 na fabricação de um medicamento para uso nos métodos.

A invenção proporciona métodos para avaliar a responsividade das células T ao tratamento com uma terapia de depleção de linfócitos em um paciente de esclerose múltipla, que compreende medir a caspase-3 em células T obtidas do dito paciente depois da dita terapia, em que um aumento da caspase-3 nas células T em comparação com as células T provenientes de um paciente com MS, que não está recebendo tal terapia, é indicativo da responsividade das células T à dita terapia. A medição pode implicar na determinação da quantidade ou concentração da caspase-3 ou ácido nucleico que codifica a caspase-3.

A invenção proporciona métodos para informar um paciente com MS sobre o risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, que compreendem as etapas de obter e verificar informação sobre a interleucina-21 (IL-21) em uma amostra de

sangue do paciente com MS, em que a IL-21 elevada em comparação com um paciente sem doença autoimune secundária em comparação indica que o paciente está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem IL-21 elevada; e informar ao paciente do risco aumentado ou falta dele. Alternativamente, os métodos compreendem ou verificam informação sobre a presença ou ausência de um mais dos genótipos de IL-21 mencionados acima, em vez de informação sobre o nível de IL-21 no sangue. Por conseguinte, a invenção proporciona ainda métodos para informar um paciente com MS de tal necessidade, ou falta de necessidade, para monitoramento intensificado para desenvolvimento de uma doença autoimune secundária seguindo-se a terapia de depressão de linfócitos com base no nível de IL-21 do paciente ou a presença ou ausência dos genótipos de IL-21, descritos acima.

A invenção proporciona métodos para informar sobre regime para monitorar um paciente com MS seguinte à terapia de depleção de linfócitos, que compreendem as etapas de obter ou verificar informação sobre (i) IL-21 em uma amostra de sangue do paciente; ou (ii) a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) associados à IL-21 elevada, tais como aqueles selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978; e selecionar um regime de monitoramento apropriado para o paciente com base na informação. Um regime de monitoramento apropriado pode incluir, por exemplo, medir autoanticorpos no paciente.

A presente invenção proporciona vantagens na administração de risco no tratamento de MS. Por exemplo, a invenção proporciona métodos para distribuir fármaco para depleção de linfócitos a um paciente para o tratamento de esclerose múltipla, que compreende as etapas de aconselhar o paciente sobre o risco aumentado de desenvolver uma doença secundária imune seguinte ao tratamento com o fármaco, em que o risco aumentado está associado à (i) IL-21 elevada; ou (ii) a presença de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) associados à IL-21 elevada, tais como aqueles selecionados do grupo que consiste em: A/A em

SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978; e proporcionar o fármaco ao paciente depois do dito aconselhamento,

A invenção proporciona ainda métodos para identificar o indivíduo que é provável de ter interleucina-21 (IL-21) elevada em comparação com um paciente sem nenhuma condição inflamatória conhecida, que compreende a etapa de genotipar o indivíduo para detectar a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) associados à IL-21 elevada, tais como aqueles selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um ou mais dos ditos genótipos está associada à IL-21 elevada.

No contexto desta invenção, a depleção de linfócitos pode ser induzida por tratamento que alveja CD52, por exemplo, um tratamento com um anticorpo anti-CD52 (por exemplo, um anticorpo monoclonal) ou uma porção de ligação de antígeno deste. O anticorpo anti-CD52 pode ser um alentuzumab ou um agente biologicamente similar, tal como um anticorpo, que compete para ligar-se ao CD52 com alentuzumab.

Nos métodos desta invenção, a medição de IL-21 pode implicar na medição (por exemplo, detectar/quantificar) a quantidade ou concentração de IL-21 ou ácido nucleico que codifica IL-21 em uma amostra, ou a quantidade ou concentração de mRNA que codifica IL-21 nas células produtoras de IL-21 (por exemplo, células Th17) na amostra. Em algumas modalidades, a medição é da IL-21 intracelular, usando-se, por exemplo, coloração com citocina e citometria de fluxo. Em algumas modalidades, a medição é de IL-21 sérica, usando-se, por exemplo, um ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). Também englobados pela invenção estão kits ELISA para detectar níveis de IL-21 em um paciente humano, que compreende um anticorpo anti-IL-21, ou um porção de ligação de antígeno deste, ou um receptor de IL-21 solúvel. Os kits podem incluir ainda instruções para ensinar o usuário a coletar amostra de sangue de um paciente humano.

Nos métodos desta invenção, a informação sobre IL-21 (incluindo medição ou genotipagem) pode ser obtida antes, durante ou subsequente

à terapia de MS. Os métodos desta invenção podem ser usados no contexto de qualquer forma de MS, incluindo, mas sem limitação, esclerose múltipla reincidente-remitente, esclerose múltipla progressiva primária, e esclerose múltipla progressiva secundária.

A invenção proporciona também kits para tratar esclerose múltipla, que compreende um agente terapêutico de depleção de linfócitos (por exemplo, um anticorpo anti-CD52 tal como alentuzumab); e instrução escrita para informar ao paciente ou o serviço de saúde sobre o potencial a risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte ao tratamento com o dito agente, em que o risco aumentado é indicado por ou associado à (i) IL-21 elevada, ou (ii) à presença de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) associados à IL-21 elevada, tais como aqueles selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978.

A invenção proporciona ainda kits para identificar um paciente com MS que está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, que compreendem um anticorpo anti-interleucina-21 (IL-21) e um ou mais reagentes para detectar a ligação do anticorpo à IL-21 em uma amostra de sangue do paciente com MS. A invenção proporciona também kits para identificação de um paciente com MS que está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, que compreendem um ou mais reagentes adequados para identificar o genótipo de um ou mais polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: SNP rs13151961, SNP rs6822844, e SNP rs6840978, em uma amostra obtida de um indivíduo.

Outras características da invenção tornar-se-ão aparentes a partir das seguintes figuras e descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1A é um gráfico que mostra a frequência do precursor (PF) de células T de controles saudáveis (HC), pacientes não tratados (Pré) e em intervalos de 3 meses pós-alentuzumab, não estimulado (Unstim), ou

seguinte à cultura com proteína básica de mielina (MPB) ou receptor de hormônio estimulador da tireoide (TSHr). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 1B é um gráfico que mostra o índice proliferativo de células T de controles saudáveis (HC), pacientes não tratados (Pré) e em intervalos de 3 meses pós-alentuzumab, não estimulado (Unstim), ou seguinte à cultura com proteína básica de mielina (MPB) ou receptor de hormônio estimulador da tireoide (TSHe). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 1C é um gráfico que mostra o número total de células T viáveis após 10 dias em cultura de controles saudáveis (HC), pacientes não tratados (Pré) e em intervalos de 3 meses pós-alentuzumab, não estimulado (Unstim), ou seguinte à cultura com proteína básica de mielina (MPB) ou receptor de hormônio estimulador da tireoide (TSHr). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 1D é um gráfico que mostra a percentagem de células T sofrendo apoptose em resposta a não estímulo ou seguinte à cultura com MPH ou TSHr em cultura de controle saudáveis (HC), pacientes não tratados (Pré) e em intervalos de 3 meses pós-alentuzumab. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 1E ilustra plotagens e gráfico que mostram a apoptose de células T de controles saudáveis e pacientes antes e depois do alentuzumab em intervalos de três meses (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 1F mostra plotagens e gráfico que mostram a apoptose de células T mediadas por Fas de controles saudáveis e pacientes antes e depois do alentuzumab em intervalos de três meses (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 1G é um gráfico que mostra a apoptose de células T CD4+ e CD8+ de controles saudáveis, pacientes de pré-tratamento e em 9 meses de pós-alentuzumab (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 1H é um gráfico que mostra a apoptose de células T CD4+ e CD8+ mediadas por Fas de controles saudáveis, pacientes de pré-tratamento e em 9 meses de pós-alentuzumab. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

As figuras 2A-2C são gráficos que mostram a expressão de caspase-3 por mRNA com relação à expressão de beta-actina por mRNA em (A) células T CD3+, (B) monócitos CD14+, e (C) células B CD19+, respectivamente, seja imediatamente *ex-vivo* ou seguinte à estimulação com MPB ou policlonal (anticorpos anti-CD3/28). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 3 ilustra plotagens e gráfico que mostram que a autoimunidade depois de alentuzumab está associada à excessiva apoptose das células T. O percentual de apoptose de células T que é passiva (Um), mediada por Fas, ou em resposta à MBP ou ao estímulo de TSHr naqueles sem autoimunidade (Ge et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3041-3046 (2004)) ou aqueles com autoimunidade secundária (Ge et al., 2004) é mostrado em plotagens separadas. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

As figuras 4A e 4B são plotagens e gráficos que mostram que rhIL-21 induz a apoptose de células T *in vitro*. Elas mostram que (A) as células T CD4+ e (B) células T CD8+, respectivamente, não estimuladas ou estimuladas policlonalmente (anti-CD3/CD28), apoptose em resposta à rhIL-21 em resposta ao modo dependente de dose. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

As figuras 5A-5D são gráficos que mostram que rhIL-21 induz a proliferação de células T *in vitro*. A figura 5A é um gráfico que mostra o índice proliferativo de células T CD4+ e CD8+ não estimuladas em resposta à rhIL-21. A figura 5B é um gráfico que mostra o índice proliferativo de células T CD4+ e CD8+ (anti-CD3/CD28) estimuladas policlonalmente em resposta à rhIL-21. A figura 5C é um gráfico que mostra a frequência do precursor das células T CD4+ e CD8+, não estimuladas, em resposta à rhIL-21. A figura 5D é um gráfico que mostra a frequência de precursor das células T CD4+ e CD8+, estimuladas policlonalmente em resposta à rhIL-21. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

A figura 5E ilustra plotagens que mostram o número de células T CD4+ ou CD8+ (anti-CD3/CD28) não estimuladas ou policlonalmente estimuladas em diferentes canais na ausência ou em resposta à rhIL-21.

A figura 6A é um gráfico que mostra a IL-21 sérica antes ou após tratamento com alentuzumab em 15 pacientes com, e 15 pacientes sem, autoimunidade secundária. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

A figura 6B é um gráfico que mostra níveis de IL-21 sérica (pg/mL) de pré-tratamento nos pacientes não-autoimunes (aqueles que não tinham autoimunidade pós-alentuzumab) e os pacientes autoimunes (aqueles que tinham autoimunidade pós-alentuzumab).

DESCRIÇÃO DETALHADA

Esta invenção se baseia na constatação de que a ocorrência de autoimunidade secundária em um paciente com MS seguinte à terapia de depleção de linfócitos (por exemplo, depois do tratamento com alentuzumab) está associada à IL-21 elevada no paciente. Constatou-se que IL-21 fica elevada em comparação com o normal (vide discussões abaixo) mesmo antes da terapia em pacientes com MS, que mais tarde desenvolveram autoimunidade secundária pós-terapia. Descobriu-se também que após a terapia de depleção de linfócitos, a IL-21 aumenta ainda mais dramaticamente naqueles mesmos pacientes, em comparação com pacientes com MS sem sinais de autoimunidade secundária, cuja IL-21 é elevada em um grau muito menor. Assim, os níveis de IL-21 prognosticam a ocorrência da autoimunidade secundária depois da terapia de depleção de linfócitos em um paciente com MS. Verificamos ainda que genótipos de polimorfismo de nucleotídeos simples (SNP) de A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978 estão associados à IL-21 elevada em um indivíduo; assim, efetuar a genotipagem de um paciente com MS quanto à presença ou ausência desses genótipos de SNP específicos também auxilia a predizer o risco de desenvolver autoimunidade secundária no paciente seguinte à depleção de linfócitos.

Inicialmente, descreveu-se o tratamento com alentuzumab (CAMPATH-1h) em complicações com autoimunidade em 1999 (Coles et al., 1999), e continuou-se a observar essa complicação de, o que é cada vez mais reconhecido como, uma terapia altamente eficaz para esclerose múltipla reincidente-remitente precoce (Coles et al., *J Neurology* **253**, 98-108

(2006); Coles et al., 1999 e 2008). Os estudos descritos abaixo envolveram uma série de coortes de pacientes disponíveis e focou em entender esse "modelo" sem precedentes da autoimunidade humana que ocorre em um subconjunto de pacientes com MS tratados com alentuzumab.

O estado imunológico é radicalmente alterado seguinte à exposição ao alentuzumab. Células T que se regeneram no ambiente linfopênico gerado por alentuzumab são altamente proliferativos e levados para autorreatividade. Contudo, as células são altamente instáveis e de vida curta. Embora seu destino não tenha sido previamente e diretamente abordado (King et al., Cell 117, 265-277 (2004)), mostramos que estas células estão morrendo rapidamente por apoptose. Níveis altos e constantes de apoptose de células T podem explicar porque uma dose única de alentuzumab induz linfopenia de células T que dura vários anos, muito embora a meia-vida de alentuzumab circulante seja de somente seis dias e os precursores hematológicos não fiquem esgotados (Gilleece et al., *Blood* **82**, 807-812 (1993)).

Contra esses fundamentos, foi mostrado que pacientes com autoimunidade secundária têm taxas mais altas de apoptose de células T, porém nenhuma linfopenia de células maior, que aqueles sem autoimunidade, sugerindo ciclo aumentado neste grupo. Essas perturbações de ciclo de células T estão associadas à expressão de IL-21 sérica significantemente maior, que verificou-se ser geneticamente determinada em pelo menos alguns casos. Além disso, a suscetibilidade à autoimunidade associada à linfopenia se manifesta antes da depleção de linfócitos, com níveis de IL-21 no pré-tratamento prognosticando com precisão (valor previsível positivo de mais que 70%, por exemplo, 83%, e valor previsível negativo de mais que 62%, por exemplo, 72%) o desenvolvimento de autoimunidade de meses para anos depois da exposição ao alentuzumab. Sem querer estar ligado a qualquer teoria, acredita-se que por acionamento dos ciclos de expansão das células T e morte ao excesso, IL-21 aumenta as oportunidades estocásticas para que as células T encontrem o auto-antígeno e rompam a tolerância, promovendo, assim, a autoimunidade.

Em suma, os achados proporcionam a primeira exploração da

autoimunidade no homem induzida por linfopenia, e proporcionam uma estrutura conceitual para entendimento da autoimunidade associada à linfopenia que vai além do contexto estreito do tratamento de esclerose múltipla com alentuzumab. O conceito é que em primeiro lugar a depleção terapêutica de linfócitos e em segundo lugar a superprodução geneticamente limitada de Il-21 leva a um estado de excesso de ciclo de células T e sobrevivência reduzida, que promove a autoimunidade nos humanos. Esses achados proporcionam fundamentos para a presente invenção.

Essa invenção proporciona métodos para lidar com pacientes com MS quando em consideração está a terapia de depleção de linfócitos, tal como terapia de alentuzumab. Por exemplo, a invenção proporciona métodos para identificar um paciente com MS que tem IL-21 elevada em comparação com o normal (ou seja, níveis de IL-21 em paciente(s) de controle conforme descrição abaixo), e método para identificar um paciente com MS que está em risco aumentado de desenvolver autoimunidade secundária seguinte à depleção de linfócitos. Esses métodos compreendem a etapa de medir a IL-21 (por exemplo, níveis de proteína intracelular ou extracelular, níveis de transcrição de mRNA, ou níveis de atividade da IL-21; vide discussões abaixo) em uma amostra de sangue do paciente, e comparar o valor de IL-21 com o valor normal de IL-21. Alternativamente, em vez de ou além do teste de sangue, pode-se genotipar o paciente quanto à presença ou ausência de um ou mais genótipos de SNP de A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um, dois ou todos os três desses genótipos está associada à IL-21 elevada. Conforme discussão acima, a IL-21 elevada está associada ao risco aumentado de desenvolver autoimunidade secundária no paciente com MS seguinte à depleção de linfócitos, quando em comparação com pacientes com MS que não têm IL-21 elevada.

A identificação de um paciente pelos métodos da invenção pode ser seguida por várias outras etapas contempladas pela invenção. Por exemplo, o paciente pode ser informado sobre o risco aumentado de desenvolver autoimunidade secundária seguinte à terapia de depleção de linfóci-

tos, ou falta de tal risco, com base em seu nível de IL-21 ou genótipo. Assim, a invenção permitirá aconselhamento individualizado dos riscos da terapia antes do comprometimento com a terapia. O serviço de saúde pode considerar as opções terapêuticas em vista do risco de autoimunidade secundária e proporcionar uma recomendação, incluindo, por exemplo, administrar um antagonista de IL-21 antes, durante ou depois de terapia de depleção de linfócitos, ou selecionar um regime de tratamento que não envolva depleção de linfócitos.

O serviço de saúde pode também considerar o risco de planos para lidar com um paciente que eleja se submeter à terapia de depleção de linfócitos. Por exemplo, o serviço de saúde pode informar ao paciente sobre a necessidade de monitoramento intensificado do desenvolvimento de autoimunidade secundária depois da terapia de depleção de linfócitos em vista de seu risco aumentado de desenvolver autoimunidade secundária. O serviço de saúde pode também recomendar um regime de monitoramento seguinte à terapia de depleção de linfócitos, Um regime de monitoramento apropriado para pacientes em risco pode incluir, sem limitação, monitoramento mais frequente da autoimunidade secundária após terapia de depleção de linfócitos em um intervalo de, por exemplo, uma semana, duas semanas, um mês, dois meses, três meses, seis meses, ou um ano. Pode haver necessidade de o monitoramento ser continuado por um período de tempo prolongado, por exemplo, mais que um ano, dois anos, três anos, quatro anos, cinco anos, ou mais, porque alguns pacientes podem não se apresentar com autoimunidade secundária até bem depois de um ano seguinte à terapia de depleção de linfócitos. O monitoramento intensificado pode também implicar, por exemplo, em exame médico mais meticuloso (por exemplo, mais testes de sangue) por um especialista para quaisquer sinais de autoimunidade secundária. Além disso, farmacêuticos ou a equipe clínica que distribui o fármaco para depleção de linfócitos para um paciente, para o tratamento de MS, podem ser solicitado a aconselhar o paciente sobre o risco aumentado de desenvolver autoimunidade secundária seguinte ao uso do fármaco, no caso de o paciente ter um nível elevado de IL-21 e/ou de ter os genótipos de

IL-21 particulares descritos aqui que foram associados à IL-21 sérica elevada. Os farmacêuticos ou equipe clínica podem também ser solicitados a obter o consentimento informado do paciente antes de distribuir o fármaco ao paciente.

Pacientes com Esclerose Múltipla

Os métodos e composições desta invenção podem ser usados no contexto de qualquer forma de MS, por exemplo, MS reincidente-remitente, MS progressiva primária, e MS progressiva secundária. Os pacientes com MS no contexto desta invenção são aqueles que foram diagnosticados como tendo uma forma de MS por, por exemplo, o histórico de sintomas e exame neurológico com a ajuda de testes tais como imageamento por ressonância magnética (MRI), punção lombar, testes potenciais evocados, e análise laboratorial de amostras do sangue.

A esclerose múltipla ("MS"), também conhecida como esclerose disseminada, é uma condição autoimune na qual o sistema imunológico ataca o sistema nervoso central, levando à desmielinização (Compston e Coles, 2008). MS destrói a camada gordurosa chamada de bainha de mielina que envolve e isola eletricamente as fibras nervosas. Quase qualquer sintoma neurológico pode parecer com a doença, e frequentemente progride para a incapacidade física e cognitiva (Compston e Coles, 2008). MS se apresenta sob várias formas. Sintomas novos podem ocorrer em ataques separados (formas reincidentes), ou lentamente se acumulam com o passar do tempo (formas progressivas) (Lublin et al., *Neurology* **46** (4), 907-11 (1996)). Entre os ataques, os sintomas podem sumir por completo (remissão), mas problemas neurológicos permanentes ocorrem com frequência, especialmente na medida em que a doença aumenta (Lublin et al., 1996). Vários subtipos ou padrões de progressão foram descritos, e eles são importantes para o prognóstico bem como para as decisões terapêuticas, Em 1996, a Sociedade Para Esclerose Múltipla Norte-Americana (United States National Multiple Sclerosis Society) padronizou definições para quatro subtipos: reincidente-remitente, progressiva secundária, progressiva primária, e reincidente progressiva (Lublin et al., 1996).

O subtipo reincidente-remitente é caracterizado por ataques agudos, denominados exacerbações ou reincidências, seguindo-se períodos, de meses a anos, de relativa calmaria (remissão) sem sinais da atividade da doença. Isso descreve o curso inicial de maioria dos indivíduos com MS (Lublin et al., 1996).

MS progressiva secundária começa com um curso reincidente-remitente, mas subsequentemente evolui para o declínio neurológico progressivo entre ataques agudos sem quaisquer períodos definidos de remissão, muito embora reincidências ocasionais e pequenas remissões possam ocorrer (Lublin et al, 1996).

O subtipo progressivo primário é caracterizado por uma progressão gradual, mas constante, da incapacidade sem remissão óbvia depois de os sintomas de MS iniciais aparecerem (Miller et al., *Lancet Neurol* **6** (10), 903-12 (2007)). Esse é caracterizado por progressão da incapacidade a partir do início, sem ou somente com remissões e melhoras ocasionais e pequenas (Lublin et al., 1996). A idade do início do subtipo progressivo primário é usualmente mais tarde que outros subtipos (Miller et al., 2007)).

MS reincidente progressiva é caracterizada por um declínio neurológico constante com ataques agudos que podem ou não ser seguidos por alguma recuperação. Esse é o menos comum de todos os subtipos descritos acima (Lublin et al., 1996).

Casos com comportamento fora do padrão foram descritos também, algumas vezes referidos como formas nas linhas fronteiriças da MS (Fontaine, *Rev. Neurol.* (Paris) **157** (8-9 Pt 2): 929-34 (2001)). Essas formas incluem doenças de Devic, esclerose concêntrica de Balo, esclerose difusa de Schilder, e esclerose múltipla de Marburg (Capello et al., *Neurol. Sci.* **25 Suppl 4:** S361-3 (2004); Hainfellner et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **55** (12): 1194-6 (1992)).

Depleção de Linfócitos em Pacientes com Esclerose Múltipla

Como usada aqui, a expressão "depleção de linfócitos" é um tipo de imunossupressão por redução dos linfócitos circulantes, por exemplo, células T e/ou células B, resultando em linfopenia. Depleção de linfócitos pro-

longada é vista quando, por exemplo, transplante da medula óssea autóloga (BMT) ou irradiação linfoide total é usado para tratar esclerose múltipla. Vide por exemplo, Cox et al., *Eur. J. Immunol.* **35**, 3332-3342 (2005). Por exemplo, depleção de linfócitos pode ser obtida pelo uso combinado de timoglobulina, ciclofosfamida e irradiação total do corpo. A depleção de linfócitos em pacientes com MS pode ser também obtida por meio de vários tratamentos com fármacos. Por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-CD52 humanizado, CAMPATH-1H (alentuzumab), tem sido usado na terapia de depleção de linfócitos para tratar pacientes com MS. A linfopenia induzida com CAMPATH-1H mostrou ser eficaz na redução da inflamação do sistema nervoso central, tanto clinicamente como radiologicamente (Coles et al., *Ann. Neurol.* **46,** 296- 304 (1999); Coles et al., 2008).

Outros agentes podem ser usados também na terapia de depleção de linfócitos para tratar pacientes com MS. Esses agentes podem ser aqueles que causam a morte de células linfocíticas ou inibem as funções dos linfócitos. Estes incluem, sem limitação, (1) agentes que alvejam células contendo CD-52, tais como agentes biologicamente similares ao alentuzumab, isto é, outros anticorpos anti-CD52 (por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, ou humanos) que se ligam aos mesmos ou a um epítopo diferente como alentuzumab ou competem com o alentuzumab pela ligação com CD52, e polipeptídeos CD52 solúveis que competem com CD52 da superfície celular por ligação com ligante(s) de CD52; (2) biomoléculas, tais como peptídeos, proteínas e anticorpos (por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados ou humanos), que alvejam moléculas da superfície celular nos linfócitos, tais como anticorpos anti-CD4, anticorpos anti-CD20 (por exemplo, rituximabe), anticorpos anti-TCR, e anticorpos anti-integrina (por exemplo, natalizumab); (3) citotoxinas (por exemplo, agentes indutores da apoptose, ciclofosamida, agentes alquilantes, e intecaladores de DNA) distribuídos especificamente e não especificamente aos linfócitos; e (4) porções de ligação de antígeno dos anticorpos mencionados acima. Os anticorpos podem incluir, sem limitação, anticorpos monoclonais, anticorpos bifuncionais, anticorpos oligoclonais, e anticorpos policlonais.

A expressão "porção de ligação de antígeno", como usada aqui, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligarem especificamente ao mesmo antígeno que o antígeno inteiro do qual a porção é derivada. Exemplos de "porção de ligação de antígeno" incluem, sem limitação, um fragmento Fab, um fragmento F(ab')2, um fragmento Fd, um fragmento Fv, um fragmento dAb, uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada, scFV e um diacorpo. Os anticorpos e as porções de ligação de antígeno destes úteis nesta invenção podem ser feitos por quaisquer métodos bem conhecidos da técnica.

Quaisquer das terapias de depleção de linfócitos podem causar linfopenia, e, em alguns pacientes, a linfopenia leva à autoimunidade secundária.

Autoimunidade Secundária em Pacientes com MS

Autoimunidade é referida aqui como "autoimunidade secundária" quando ela aparece subsequente ao início de uma primeira doença (primária), por exemplo, uma doença autoimune primária. A autoimunidade secundária surge, algumas vezes, em pacientes com MS que está com ou que teve linfopenia seguinte à terapia de depleção de linfócitos. Em alguns indivíduos, a autoimunidade secundária surge logo depois da terapia de depleção de linfócitos (por exemplo, tratamento com alentuzumab). Em outros indivíduos, a autoimunidade secundária pode não surgir até meses ou anos após a terapia de depleção de linfócitos; em alguns daqueles indivíduos, quando eles desenvolvem imunidade secundária, pode ter ocorrido recuperação de linfócitos substancial (contagem de linfócitos total) de modo que eles podem não ser mais linfopênicos.

A autoimunidade secundária que surge em pacientes com MS linfopênicos pode ser de qualquer tipo de condição autoimune diferente de MS, incluindo, sem limitação, autoimunidade da tireoide (por exemplo, doença de Grave), trombocitopenia imune (ITP), doença de Goodpasture, neutropenia autoimune, anemia hemolítica autoimune, e linfopenia autoimune. Técnicas para diagnosticar e monitorar essas doenças autoimunes são bem conhecidas daqueles versados na técnica, incluindo a avaliação de sintomas

e exame médico, tal como análise clínica. A invenção contempla o uso de quaisquer métodos conhecidos. Por exemplo, níveis de autoanticorpo no fluido corporal do paciente (por exemplo, sangue) podem ser determinados como meios de detectar sinais de autoimunidade. Especificamente, anticorpos antinucleares, anticorpos antimusculatura lisa, e anticorpos antimitocondriais podem ser medidos. No caso de anticorpos antinucleares serem detectados, ensaios adicionais podem ser realizados para medir anticorpos anti-DNA de fita dupla, anticorpos antirribonucleoproteína, e anticorpos anti-La. Anticorpos anti-tireoide peroxidase (TPO) e anti-receptor de hormônio estimulador da tireoide (TSH) podem ser medidos para detectar doenças da tireoide autoimunes; se os anticorpos anti-TPO ou anti-receptor de TSH são detectados, pode se avaliar se a função da tireoide esta afetada medindo-se níveis de T3 livre, T4 livre e de TSH. Anticorpos antiplaquetas podem ser medidos para detecção de trombocitopenia autoimune; e uma medição de níveis de plaquetas no sangue pode servir para determinar se a presença de anticorpos anti-plaquetas está causando redução no número de plaquetas.

Medição de IL-21

Nos métodos desta invenção, IL-21 pode ser medida por várias técnicas. A IL-21 é um membro da família de citocina relacionada à gama-c, e tem atividade potente na promoção da proliferação de células T e B e citotoxicidade de células assassinas naturais (NK). IL-21 é principalmente expressa nas células CD4+ ativadas (por exemplo, células Th17) e é importante em imunorrespostas do tipo I de auxiliador T (Th1) (Weiss et al., *Expert Opin Biol. Ther.* **7**, 1705-1721 (2007); Sivakumar et al., *Immunology* **111**, 177-182 (2004)). O gene de IL-21 humano codifica um precursor de polipeptídeo de 162 resíduos de aminoácidos e uma proteína madura inteiramente processada de 133 resíduos de aminoácidos (cerca de 15 kD); o gene está localizado no cromossomo humano 4q1-27 (Sivakumar et al., 2004). O receptor para IL-21 (IL-21R) foi encontrados nas células B periféricas restantes, células mononucleares sanguíneas periféricas, ativadas, e no centro germinal de linfonodos humanos (Marleau et al., J. *Leukocyte Biol.* **78**, 575-

584 (2005)).

Métodos para medição de IL-21 são bem conhecidos daqueles versados na técnica. De acordo com algumas modalidades da presente invenção, uma amostra de fluido corporal (por exemplo, sangue, soro, plasma, urina, saliva ou fluido cerebroespinhal) é obtida de um paciente e o nível de IL-21 na amostra é medido por qualquer ensaio adequado para detecção de proteína, incluindo, mas sem limitação, imunoensaios tais como ensaios imunossorventes de enzima ligada (ELISA). Kits de ELISA comerciais para medição de IL-21 estão disponíveis da, por exemplo, KOMABIOTECH (Seoul, Korea), Bender MedSystems (Burlingame, CA), e eBioscience (San Diego, CA).

Alternativamente, os níveis de transcrição nas células produtoras de IL-21 (por exemplo, células Th17) obtidas do paciente podem ser medidos por análise Northern blot e reação em cadeia de polimerase quantitativa (Q-PCR). Métodos para isolar células Th17 são bem conhecidas da técnica, e o isolamento pode ser feito usando-se kits comercialmente disponíveis, por exemplo, kits das Miltenyi Biotec (Auburn, CA), eBioscience (San Diego, CA). Em algumas modalidades, os níveis de IL-21 são medidos por coloração com citocina e citometria de fluxo em que um anticorpo anti-IL-21 ligado a uma fração detectável é usada para detectar o nível intracelular de IL-21 em células produtoras de IL-21 do paciente. A IL-21 pode ser também medida em termos de atividade em um ensaio biológico, por exemplo, medição de respostas proliferativas das células T a uma combinação de IL-21 e IL-15, usando-se, por exemplo, CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) (Zeng et al., *Curr. Protoc. Immunol.* **78**:6.30.1-6.30.8 (2007)). Outro método de medição de IL-21 se baseia na fosforilação de tirosina induzida por IL-21 de Stat3 em células T CD8(+) usando análise com base em citometria de fluxo (Zeng et al., 2007). Aqueles versados na técnica apreciarão prontamente outros meios adequados para medir IL-21.

Nos métodos desta invenção, o valor de referência (ou índice) para determinar se um paciente tem IL-21 elevada (anormalmente alta) é o valor de IL-21 de um paciente de controle, ou o valor medido de IL-21 de um

grupo de pacientes de controle, obtido usando-se o mesmo ensaio que é conduzido ao mesmo e em tempo diferente. O paciente de controle é um paciente normal ou saudável, que, neste contexto, é um indivíduo sem qualquer condição inflamatória conhecida em curso, inclusive sem doença autoimune (sem quaisquer sintomas detectáveis de uma doença autoimune). Em algumas modalidades, os pacientes de controle não são linfopênicos. Um aumento do nível de IL-21 de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, dez vezes, vinte vezes, trinta vezes, quarenta vezes, cinquenta vezes, cem vezes ou mais pode ser considerada um aumento significante. Certas análises estatísticas podem ser aplicadas para determinar se o nível de IL-21 em uma amostra de teste é significantemente diferente do nível de controle. Tais análises estatísticas são bem conhecidas daqueles versados na técnica e podem incluir sem limitação, testes paramétricos (por exemplo, teste t de Student de duas caudas) ou testes não paramétricos (por exemplo, teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Detecção de Genótipos de SNP de IL-21

Em algumas modalidades desta invenção, genotipagem é usada para predizer se um paciente está inclinado a ter (ou seja, corre o risco de ter ou é provável de ter) IL-21 elevada e, logo, em risco de desenvolver autoimunidade secundária enquanto está com linfopenia. "Genotipagem" se refere ao processo de determinar o genótipo de um indivíduo pelo uso de ensaios biológicos. Métodos de genotipagem são bem conhecidos daqueles versados na técnica, e incluem, sem limitação, PCR, sequenciamento de DNA, sondas oligo específicas de alelo (ASO), e hibridização para microarrays ou contas de DNA. A genotipagem pode ser parcial, ou seja, somente uma pequena fração de um genótipo do indivíduo é determinada.

No contexto desta invenção, somente certos SNPs precisam ser detectados. Um SNP é uma variação na sequência de DNA que ocorre quando um nucleotídeo simples - A, T, C, ou G - em uma porção correspondente do genoma difere entre os membros de uma espécie ou entre cromossomos emparelhados em um indivíduo. SNPs humanos conhecidos são de-

signados com números de identificação de referência SNP (refSNP ou rs) no arquivo de domínio público Single Nucleotide Polymorfism Database (dbSNP) que se encontra no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Os presentes inventores descobriram que os menores genótipos de SNP de rs13151961 A/A, rs6822844 G/G e rs6840978 C/C estão associados a níveis significativamente mais altos de IL-21 sérica em comparação com indivíduos que não possuem estes genótipos. Pacientes com MS tendo um ou mais desses fenótipos de SNP possuem, assim, suscetibilidade aumentada para desenvolver autoimunidade secundária depois de depleção de linfócitos, em comparação com pacientes com MS que não possuem estes genótipos.

Tempo ideal para Obter Informação sobre IL-21

A obtenção de informação sobre IL-21 (níveis de IL-21 ou genótipos de SNP relacionados à IL-21) de um paciente com MS é útil na seleção de regimes tratamento e de monitoração pós-tratamento, para o paciente. Quando a informação é obtida antes da terapia de MS, o paciente pode ser informado do risco relativo de desenvolver autoimunidade secundária seguinte à terapia de depleção de linfócitos, e decisões sobre tratamento podem ser tomadas. O paciente pode também ser informado da necessidade de monitoramento intensificado no pós-tratamento, por exemplo, exame mais frequente e mais completo por um especialista, se ele é classificado como "de risco". Assim, a informação sobre IL-21 aperfeiçoa a administração do risco (por clínicos, farmacêuticos e pacientes) no tratamento de MS.

A obtenção de informação sobre IL-21, durante ou depois do tratamento de MS será também de ajuda na monitoração da autoimunidade secundária e tratamento. Conforme mostrado acima e ainda descrito abaixo, constatamos que seguinte à terapia de depleção de linfócitos, pacientes com MS que continuam a desenvolver autoimunidade secundária têm um aumento muito maior de sua IL-21 sérica, em comparação com pacientes com MS, que não desenvolvem autoimunidade secundária. O último grupo de pacientes com MS produzem somente um pouco mais de IL-21 seguinte à deple-

ção de linfócitos. Assim, por medição da produção de IL-21 depois do tratamento de depleção de linfócitos, pode-se também prever o risco de autoimunidade secundária, que pode não ocorrer até meses ou anos depois do tratamento.

Tratamento de Autoimunidade Secundária

Uma doença de autoimunidade secundária que surge em pacientes com MS pode ser tratada com base no tipo da doença. Em algumas modalidades da presente invenção, a autoimunidade secundária pode ser tratada usando-se uma dose eficaz de um antagonista de IL-21. Um antagonista de IL-21 pode ser um agente terapêutico que inibe a atividade de IL-21, por exemplo, um agente que inibe a interação entre IL-21 e IL-21R. "Uma dose eficaz" se refere à quantidade de um agente inibidor suficiente para inibir a atividade da IL-21 em um paciente de modo que os sintomas da doença autoimune secundária são aliviados ou prevenidos. Antagonistas de IL-21 podem ser, por exemplo, anticorpos monoclonais quiméricos, humanizados ou humanos para IL-21 ou IL-21R, ou proteínas IL-21R solúveis. Vide, também, por exemplo, a Patente US 7.410.780 e a Publicação de Pedido de Patente US 2008024109, em que os ensinamentos, na íntegra, são aqui incorporados a título de referência. Composições farmacêuticas contendo um antagonista de IL-21 podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos da técnica. As composições farmacêuticas contendo antagonistas de IL-21 podem ser administradas a um paciente usando-se um método conhecido da técnica, por exemplo, intravenosamente, intramuscularmente, ou subcutaneamente.

Kits para Tratamento e Teste de Pacientes de MS

A presente invenção proporciona kits para o tratamento de esclerose múltipla. Um kit desta invenção pode conter, entre outros, fármaco de depleção de linfócitos (por exemplo, alentuzumab), e uma instrução escrita para informar ao paciente ou serviço de saúde sobre as contraindicações do fármaco, por exemplo, o potencial para risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte ao tratamento com o fármaco. O risco aumentado pode estar associado a ou indicado por (i) IL-21 elevada

ou (ii) a presença de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961. G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978.

Em outras modalidades, a invenção proporciona kits para detectar IL-21 sérica em um paciente com MS, e/ou para identificar pacientes com MS com risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos. Tais kits podem compreender um anticorpo anti-IL-21, ou uma porção de ligação de antígeno deste, ou um receptor de IL-21 solúvel, e opcionalmente instruções para ensinar o usuário a tirar amostra de sangue de paciente, e, opcionalmente, um ou mais agentes para detecção da ligação do anticorpo, porção, ou receptor de IL-21 solúvel para IL-21 na amostrada de sangue do paciente com MS. Tais kits terão sidos validados ou aprovados por uma autoridade reguladora para fazer o diagnóstico médico dos pacientes, tais como pacientes com MS.

Em ainda outras modalidades, a invenção proporciona kits para identificar um paciente com MS que está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à detecção de linfócitos. Os kits podem compreender um ou mais reagentes adequados para identificar a presença ou ausência de um ou mais genótipos de SNP selecionados do grupo que consiste em: SNP rs13151961, SNP rs6822844, e SNP rs6840978, em uma amostra obtida de um paciente com MS, e instruções ensinando o usuário a coletar amostra do paciente com MS.

Avaliação da Responsividade de Células T ao Tratamento de MS

Esta invenção proporciona métodos para avaliar a responsividade de células T ao tratamento com terapia de depleção de linfócitos em um paciente com MS. Os métodos compreendem medir caspase-3 em células T obtidas do paciente após o tratamento. Aumento de caspase-3 (por exemplo, a proteína caspase-3, transcrição de RNA, e/ou níveis de atividade) nas células T em comparação com as células T de um paciente com MS que não está recebendo o tratamento indica que as células T no paciente tratado responderam ao tratamento. Esses métodos são baseados em nossa descoberta de que as células T de pessoas com MS não tratada são resistentes

à apoptose, e que esta resistência está associada a subexpressão da caspase-3. Porém, depois da depleção de linfócitos, a expressão de caspase-3 é significantemente aumentada nas células T, alcançando níveis vistos em pessoas saudáveis.

Técnicas de medição de caspase-3 em células T são bem conhecidas da técnica. Por exemplo, extratos célulares de células T podem ser obtidos por técnicas bem conhecidas da tecnologia, e níveis da proteína caspase-3 podem ser medidos, por exemplo, por ELISA. Kits de ELISA comerciais para medição da caspase-3 humana estão disponíveis de, por exemplo, Bender MedSystems (Burlingame, CA), EMD Chemicals, INC. (San Diego, CA), e R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Alternativamente, níveis de transcrição de caspase-3 podem ser medidos em células T, por exemplo, por análise de Northern blot ou PCR quantitativa. Caspase-3 pode ser também medida em termos de atividade em ensaio biológico, por exemplo, por medição de sua atividade de protease. Kits comerciais para medir a atividade de caspase-3 são disponíveis de, por exemplo, Roche Applied Science (Indianapolis, IN) e Invitrogen (Carlsbad, CA).

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aquele versado na técnica ao qual esta invenção pertence. Métodos e materiais exemplares são descritos aqui, embora os métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser também usados na prática ou teste da presente invenção. Todas as publicações e outras referências mencionadas aqui são incorporadas a título de referência, na íntegra. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as definições, controlará. Embora vários documentos sejam citados aqui, essa citação não constitui admissão de que qualquer desses documentos forma parte do conhecimento geral comum da técnica. Por todo este relatório descritivo e modalidades, a palavra "compreendem", ou variações tais como "compreende" ou "compreendendo" serão entendidos por implicar na inclusão de um número inteiro estabelecido ou grupo de números inteiros, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números intei-

ros. Os materiais, métodos e exemplos são tão somente ilustrativos e não têm por objetivo serem limitativos.

Os seguintes exemplos são para ilustrar os métodos e materiais da presente invenção. Modificações e adaptações adequadas das condições descritas e parâmetros normalmente encontrados na técnica que são óbvias para aqueles versados na técnica estão dentro do espírito e escopo da presente invenção.

EXEMPLOS

Nos seguintes exemplos, todos os pacientes tiveram esclerose múltipla reincidente-remetente e foram participantes em um de dois experimentos clínicos: CAMMS-223 e CAMMS-224 (REC02/315 e 03/078) nos quais alentuzumab foi administrado por infusão intravenosa de 12-24 mg/dia, por cinco dias, seguido por re-tratamento em 12 meses. Pacientes e controles consentiram com a venissecção para fins de pesquisa (LREC 02/263) e todos estavam livres de exposição a outros agentes modificadores de doença, inclusive esteroides, por pelo menos um mês no momento da amostragem de sangue.

Os dados de proliferação de linfócitos e apoptose foram gerados por um estudo cruzado de células frescas *ex vivo* de 65 pacientes e 21 controles saudáveis (7 homens, com idade média de 34 anos). Essas hipóteses formuladas sobre ciclo das células T na patogênese de autoimunidade secundária, que foram testadas em amostras disponíveis em nove meses depois do tratamento com alentuzumab, que foi escolhido como o ponto de tempo mais cedo no qual a apoptose de células T poderia ser robustamente analisada. Das 29 amostras disponíveis nesse ponto de tempo, 10 satisfizeram nossa definição de estudo de autoimunidade (1 homem, idade média de 36 anos) em comparação com 10 sem autoimunidade (3 homens, idade média de 38 anos). Autoimunidade foi definida como desenvolvimento de uma nova doença autoimune (com ou sem autoanticorpos), ou títulos significantes persistentes de autoanticorpos (presentes em pelo menos duas ocasiões pelo menos três meses separadamente) sem doença clínica. "Sem autoimunidade" foi definida como a ausência de uma doença autoimune e autoanti-

corpos por pelo menos 18 meses pós-alentuzumab neste estudo. Dos dez pacientes com autoimunidade, três tinham somente autoanticorpos (anticorpos antinucleares). A seguir, IL-21 sérica foi medida serialmente em: 15 pacientes selecionados aleatoriamente com autoimunidade - cinco destes haviam sido estudados como acima (três homens, idade média de 34 anos; doze com autoimunidade da tireoide, um com doença de Goodpasture, um com ITP, e um somente com anticorpos antinucleares), e quinze pacientes selecionados aleatoriamente sem autoimunidade - seis dos quais haviam sido estudados acima, (cinco homens, idade média de 31 anos) e dezenove controles saudáveis (sete homens, idade média de 33 anos).

Setenta e três pacientes foram estudados por análise genética. Desses, 23 satisfizeram a definição de "não imunidade" e 27 tinham autoimunidade secundária depois alentuzumab (seis somente com autoanticorpos: quatro com anticorpos antinucleares e dois com anticorpos antimusculatura lisa; dezoito com autoimunidade da tireoide, dois com ITP e um com doença de Goodpasture). Os 23 pacientes remanescentes não puderam ser categorizados com base na produção transitória de autoanticorpos e/ou tempo insuficiente deste o tratamento com alentuzumab.

Em todas as análises estatísticas descritas nos exemplos, os dados foram analisados usando-se SPSS 12.0.1 para Windows. Seguindo avaliação para normalidade, testes paramétricos (testes t de Student) ou não paramétricos (Wilcoxon-Mann-Whitney) foram realizados. Valores P são estabelecidos em todo o texto, em que o valor de $p<0,05$ foi considerado como estatisticamente significante, modificado por correção de Bonferroni, onde indicado.

Exemplo 1: Alentuzumab induz linfopenia das células T

Uma dose unida de alentuzumab resultou na depleção de linfócitos T CD4+ e CD8+ para 5,6% e 6,8%, respectivamente, dos valores da linha de base no mês 1, e 30,3% e 40,8%, respectivamente, no mês 12 (dados não mostrados).

Exemplo 2: Células T de pacientes com esclerose múltipla não tratada são resistentes à morte celular

Para vários ensaios realizados neste Exemplo, diferentes amostras transversais e longitudinais foram usadas conforme a disponibilidade. Como introdução para medir o ciclo de células linfocíticas após alentuzumab, foi examinada a resposta proliferativa das células T, não estimuladas ou em cultura com proteína básica de mielina (MBP) ou o receptor de hormônio estimulador de tireoide (TSHr), entre pacientes não tratados com esclerose múltipla e controles normais (figuras 1A e 1B).

A. Culturas de células mononucleares periféricas

Células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) foram isoladas de sangue heparinizado por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech). PBMCs integrais foram imediatamente suspensas em meio de cultura (RPMI) contendo 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e 10% de soro fetal de bezerro (Sigma S5394) e ajustado para uma concentração de 10^6/mL de células viáveis (determinadas por exclusão com azul de trypan). Para induzir morte celular passiva, PBMCs foram incubadas por 72 horas em meios sozinhos sem fatores de crescimento adicionais. Apoptose mediada por Fas foi induzida cultivando-se PBMCs por 48 horas com anti-CD28 solúvel (1 μg/mL: doado gentilmente por M. Frewin, University of Oxford) em placas pré-revestidas com mAb anti-CD3 (1 μg/mL - BD Pharmingen), seguido por 18 horas de incubação com Fas anti-humano ativador (clone CH11, 1 μg/mL - Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

B. Detecção de apoptose

Células T apoptóticas foram detectadas por coloração de células com: anticorpos monoclonais anti-humanos de camundongo conjugados com aloficocianina contra CD3 (Serotec MCA463APC), CD4 (Serotec MCA1267APC) e CD8 (Serotec MCA1226APC), anexina-V conjugada com FITC e Iodeto de Propídio (BD Pharmingen). Fluorescência foi detectada por citometria de fluxo (FACSCALIBUR: Becton Dickinson, Mountain View, CA). Com base em difusão de avanço e lateral, um *gate* de linfócitos amplo foi tirado para incluir linfócitos vivos e apoptóticos (tendo FSc reduzido e SSc aumentado). Pelo menos 15.000 eventos dentro do *gate* foram coletados e

analisados usando-se o software WinMDI 2.8. Células apoptóticas precoces foram definidas como anexina V^+PI^-, e células apoptóticas tardias e necróticas como anexina V^+PI^+ (Aubry et al., *Cytometry* **37**, 197-204 (1999)). A morte das células apoptóticas foi definida como morte de células total (anexina V^+PI^- mais anexina V^+PI^+) bloqueadas por inibição de pan-caspase com Q-VD-OPh (RnD Systems OPH001).

C. Ensaios de Proliferação

PBMCs foram carregadas com o corante de rastreamento de divisão celular CFSE (éster succunimidílico de diacetato de carboxifluoresceína) (Lyons et al. *Methods Cell Biol.* **63**, 375-398 (2001)) e cultivadas com 50 μg/mL de proteína básica de mielina (MBP: RDI- TRK8M79/LYO) ou 1 μg/mL de domínio extracelular de receptor de hormônio estimulador da tireoide ligado a uma proteína de ligação de matriz (TSHr: gentilmente doada por M. Ludgate, Cardiff University). Depois de 10 dias, coloração com CFSE nas células, identificadas por marcadores de superfícies específicos (CD4, CD8), foi analisada por citometria de fluxo. A frequência de precursor (definida com a proporção de linfócitos que deixaram a população parente se submeter a duas divisões celulares) e índice de proliferação (definido como a soma das células em todas as gerações dividida pelo número computado de células parentes) foram calculados usando-se Modfit LT 3.0 (Software Verity). O número absoluto de células sobreviventes foi medido por comparação com um número fixo de contas inertes (BD CALIBRATE, BD Biosciences), incluídas nas culturas.

D. Resultados

Na houve diferença na resposta proliferativa de células T, não estimuladas ou em cultura com proteína básica de mielina (MBP) ou no receptor de hormônio estimulador da tireoide (TSHr), entre pacientes não tratados com esclerose múltipla e controles normais (figuras 1A e 1B). Inversamente, a sobrevivência das células T provenientes de pacientes não tratados com esclerose múltipla ≥4 vezes maior que aquelas dos controles ($p<0,005$; figura 1C), sugerindo que morte reduzida das células T é uma característica da esclerose múltipla não tratada. Isso foi confirmado demons-

trando-se que as células T de pacientes não tratados são resistentes tanto à apoptose passiva como aquela mediada por Fas em comparação com controles saudáveis (passiva: 0,3% versus 6,7%, p=0,0016; e mediada por Fas: 2,9% versus 15,5%, p+ 0,0018; figuras 1E e 1F).

Exemplo 3: Células T que se regeneram após alentuzumab são altamente proliferativas, enviesadas na direção da auto-reativada e suscetíveis de apoptose

Usando-se os ensaios descritos no Exemplo 2, Verificou-se seguinte ao alentuzumab, a proporção de células T responsiva a autoantígeno (sequência de precursor) e o grau de proliferação (índice proliferativo) foram significantemente aumentados em comparação com os pacientes não tratados e os controles saudáveis. Por exemplo, no mês 3, a proliferação de células não estimuladas foi de >6,5 vezes dos pacientes não tratados e a proliferação em resposta à estimulação de MPB e TSHr foi aumentada de 900% e 700%, respectivamente (todos com p<0,01: figuras 1A e 1B). A apoptose celular foi também significantemente aumentada pós-alentuzumab. Em resposta à estimulação antigênica, a proporção de células T passando por apoptose em seis meses foi 10 vezes maior que na linha de base (figura 1D; p<0,001 para todos os antígenos) resultando em poucas células viáveis no final da cultura (figura 1C). Apoptose passiva e apoptose mediada por Fas foram também aumentadas após alentuzumab, com taxas pelo menos o dobro das observadas no grupo de controle saudável (passiva: 24,5%, 22,2% e 17,9% em 6, 9 e 12 meses, respectivamente, em comparação com 0s 6,7% nos controles, todos com p<0,001; mediada com Fas 37,8%, 35,8% e 29,9% em 6, 9 e 12 meses, respectivamente, em comparação com 15,5% nos controles, todos com p<0,001; figuras 1E e 1F). A apoptose de linfócitos aumentada após alentuzumab foi vista em ambos as subpolulações de CD4+ e CD8+ (figuras 1G e 1H) e persistiu por pelo menos 18 meses após o tratamento com alentuzumab (dados não mostrados).

Exemplo 4: Células T de pacientes não tratados com esclerose múltipla subexpressam caspase-3

A. Análise de mRNA

PBMCs, imediatamente *ex-vivo* ou depois de cultura com MBP ou estimulação policlonal, foram positivamente separadas, usando-se 20 μg/mL de contas magnéticas (Miltenyi Biotec; Microcontas de CD19, Microcontas de CD3, Microcontas de CD13) por $1x10^7$ células carregadas em uma coluna de MACS® LS. As células retidas magneticamente foram eluídas, lavadas e armazenadas em RNA*later*™ a -70°C (pureza das células consistentemente em 95-98%, dados não mostrados).

A expressão de Fas, FasL, Bcl-2, Bcl-Xl, Bad, Bax, Bid, Bim, Survivin, c-FLIP, and Caspase 3, 8 e 9 foi determinada por RT-PCR semi-quantitativa. mRNA foi extraído das células armazenadas em RNA*later*™ usando-se o Mini-Kit RNEASY (QIAgen) e submetido à transcrição reversa para cDNA usando o Kit de PCT-RT de Primeira Fita PRO-STAR (Stratagene). Os iniciadores de PCR e sondas foram desenhados usando-se o PRIMER EXPRESS ((PE Biosystems, Foster City, CA, US), e adquiridos do Oswel DNA service. Informação sobre a sequência de mRNA foi obtida do GenBank. PCR em tempo real quantitativa foi realizada em um Sistema de Detecção de Sequência ABI Prism 7900HT (Perkin Elmer) usando-se PCR Mastermix contendo ROX (Eurogentec RT-QP2X-03). Sequências de iniciadores e de sonda eram: Bcl-2 para: 5'-CCT GTG GAT GAC TGA GTA CCT GAA-3' (SEQ ID NO:1), Rev 5'-CAC CTA CCC AGC CTC CGT TA-3' (SEQ ID NO:2), sonda marcada com JOE 5'-CGG CAC CTG CAC ACC TGG ATC-3' (SEQ ID NO:3); Bcl-Xl For 5'-TTC AGT CGG AAA TGA CCA GAC A-3' (SEQ ID NO:4), Rev 5'- GAG GAT GTG GTG GAG CAG AGA-3' (SEQ ID NO:5), sonda marcada com FAM 5'-TGA CCA TCC ACT CTA CCC TCC CAC CC-3' (SEQ ID NO: 6); Fas para 5'- AAA AGC ATT TTG AGC AGG AGA GTA TT-3' (SEQ ID NO:7), Rev 5'- GGC CAT TAA GAT GAG CAC CAA-3' (SEQ ID NO:8), sonda marcada com JOE 5'- CTA GAG CTC TGC CAC CTC TCC ATT -3' (SEQ ID NO:9); FasL para 5'- AAG AAA GTG GCC CAT TTA ACA G-3' (SEQ ID NO: 10), Rev 5'- AGA AAG CAG GAC AAT TCC ATA GGT-3' (SEQ ID NO: 11), sonda marcada com FAM 5'- CAA CTC AAG GTC CAT GCC TCT GG-3' (SEQ ID NO:12); Survivin para 5'- CTG CCT GGC AGC CCT TT- 3' (SEQ ID NO: 13), Rev 5'- CTC CAA GAA GGG

CCA GTT CTT - 3' (SEQ ID NO: 14), sonda marcada com FAM 5'- TCA AGG ACC ACC GCA TCT CTA CAT T-3' (SEQ ID NO: 15); c-FLIP For 5'- GTG GAG ACC CAC CTG CTC -3' (SEQ ID NO:16), Rev 5'- GGA CAC ATC AGA TTT ATC CAA ATC C -3' (SEQ ID NO:17), sonda marcada com FAM 5'- CTG CCA TCA GCA CTC TAT AGT CCG AAA CAA -3' (SEQ ID NO: 18); Caspase-8 para 5'- AGG AGG AGA TGG AAA GGG AAC TT -3' (SEQ ID NO: 19), Rev 5'- ACC TCA ATT CTG ATC TGC TCA CTT CT -3' (SEQ ID NO:20), sonda marcada com JOE 5'- CTC CCT ACA GGG TCA TGC TCT ATC AGA TTT CAG -3' (SEQ ID NO:21); Caspase-3 para 5'- AAG ATC ATA CAT GGA AGC GAA TCA -3' (SEQ ID NO:22), Rev 5'- CGA GAT GTC ATT CCA GTG CTT TTA -3' (SEQ ID NO:23), sonda marcada com FAM 5'- CTG GAA TAT CCC TGG ACA ACA GTT ATA AA -3' (SEQ ID NO:24); Caspase-9 para 5'- TGC GAA CTA ACA GGC AAG CA -3' (SEQ ID NO:25), Rev 5'- GAA CCT CTG GTT TGC GAA TCT C -3' (SEQ ID NO:26), sonda marcada com FAM 5'- CAA AGT TGT CGA AGC CAA CCC TAG AAA ACC TTA -3' (SEQ ID NO:27); Bad para 5' CAG TGA CCT TCG CTC CAC ATC 3' (SEQ ID NO:28), Rev 5' - ACG GAT CCT CTT TTT GCA TAG -3' (SEQ ID NO:29), sonda marcada com JOE 5'- ACT CCA CCC GTT CCC ACT GCC C-3' (SEQ ID NO:30); Bax para 5'-TTT CTG ACG GCA ACT TCA ACT -3' (SEQ ID NO:31), Rev 5'-GGT GCA CAG GGC CTT GAG-3' (SEQ ID NO:32), sonda marcada com JOE 5'-TGT CGC CCT TTT CTA CTT TGC CAG CA-3' (SEQ ID NO:33); Bid para 5'- GCT GTA TAG CTG CTT CCA GTG TAG -3' (SEQ ID NO:34), Rev 5'-GCT ATC TTC CAG CCT GTC TTC TCT -3' (SEQ ID NO:35), sonda marcada com JOE 5'- AGC CCT GGC ATG TCA ACA GCG TTC -3' (SEQ ID NO:36) e Bim para 5'- ACC ACA AGG ATT TCT CAT GAT ACC -3' (SEQ ID NO:37), Rev 5'- CCA TAT GAC AAA ATG CTC AAG GAA - 3' (SEQ ID NO:38), sonda marcada com FAM 5'- TAG CCA CAG CCA CCT CTC TCC CT-3' (SEQ ID NO:39).

B. Resultados

A expressão de mRNA em células T de caspase-3, a caspase efetora comum a ambas as vias apoptóticas, de pacientes com esclerose múltipla não tratada, foi reduzida em comparação com os controles; isto foi

significante para PBMCs não estimuladas ou estimuladas com MBP (de 78% e 87%, respectivamente, ambas com $p<0,05$ após correção para comparações múltiplas), mas não para culturas estimuladas policlonais (figura 2A). Tendência similar foi vista nas células CD4+ (mas não nas células CD19+) embora esta diferença não tenha sobrevivido à correção para comparações múltiplas (figura 2B). Depois do alentuzumab, a expressão de caspase-3 foi significantemente aumentada nas células T e monócitos, alcançando níveis vistos em controles saudáveis ($p<0,05$; figuras 2A e 2B). A expressão de todos os outros agentes testados (listados nos métodos) ficou inalterada depois do alentuzumab.

Assim, os estudos mostram que as células T de pessoas com esclerose múltipla não tratada são resistentes à apoptose, e esta resistência está associada à subexpressão da caspase-3. Consistente com a posição da caspase efetora no ponto de convergência das vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, demonstrou-se que a resistência das células T tanto à apoptose mediada por Fas quanto à apoptose passiva em nossos pacientes. Subexpressão de caspase-3 foi descrita em algumas doenças autoimunes, incluindo diabetes tipo I (Vendrame et al., *Eur J Endocrinol* **152**, 119-125 (2005)),, tireoide de Hashimoto e síndrome-2 poliendócrina autoimune (Vendrame et al., *J Clin Endocrinol Metabjc* (2006)). Isso é, contudo, uma nova constatação na esclerose múltipla.

Exemplo 5: Autoimunidade secundária após alentuzumab está associada à apoptose excessiva das células T

Tendo demonstrado a proliferação aumentada dos linfócitos e a apoptose como uma resposta genérica ao tratamento, testou-se a relação entre a apoptose das células T e o desenvolvimento da autoimunidade após alentuzumab, definida como o desenvolvimento de uma nova doença autoimune e/ou autoanticorpos persistentes acima da faixa normal, após alentuzumab, mantidos por pelo menos 3 meses. Usando essa definição, as células T derivadas de pacientes com autoimunidade (n = 10) mostraram níveis significantes mais altos da morte celular apoptótica em todas as condições de cultura, em 9 meses pós-tratamento, quando em comparação com as cé-

lulas T de pacientes não autoimunes (n=10) estudados no mesmo tempo (4,7% não estimuladas vs. 14,4%, mediada com Faz 18,2% vs. 32,1%, MBP 7,6% vs. 17,6%, e TSHr 9,5% vs. 25,5%, p< 0,01para todas as comparações; figura 3). Se uma definição mais estrita de autoimunidade foi aplicada, que é o desenvolvimento de uma doença autoimune, excluindo a produção de anticorpo nanopatogênico, a diferença permaneceu, apesar de reduzir o número no grupo autoimune para 7 (não estimuladas, 4,7% vs. 15,4%; mediadas com Faz, 18,2% vs. 31,7%; MPB, 7,6% vs. 20,2%; TSHr, 9,5% vs. 13,4%; p<0,02 em todas as comparações).

Não houve diferença na taxa de reconstituição das células T entre os dois grupos (por exemplo, em 6 meses, as contagens de CD4 são 0,15 x 10^9/L vs. 0.19 x 10^9/L; e as contagens de CD8 o,11 x 10^9/L vs. 0,11 x 10^9/L naqueles com ou sem autoimunidade, respectivamente), sugerindo ciclo de células T aumentado no grupo autoimune (dados não mostrados).

Exemplo 6: IL-21 induz a proliferação e apoptose das células T

A. Ensaios com IL-21 e reforço

IL-21 sérica foi medida usando-se o kit EBIOSCIENCE (88-7216-86) de acordo com as instruções. As placas foram lidas usando-se uma leitora de microplacas (modelo 680, BioRad) em 450 nm. PBMCs não estimuladas e estimuladas policlonalmente (1 μg/mL de anti-CD3 ligado à placa e 1 μg/mL de anti-CD28 solúvel) foram reforçadas com 5 pg/mL e 20 pg/mL de rhIL-21 (EBIOSCIENCE 14-8219). Apoptose e proliferação de $CD4^+$ e $CD8^+$ foram avaliadas conforme descrição acima.

B. Resultados

Foi testado o efeito de IL-21 exógena na apoptose e na proliferação das células T humanas *in vitro*. O reforço das PBMCs provenientes dos controles saudáveis com rhIL-21 levou a um aumento da morte apoptótica das células $CD4^+$ (figura 4A) e CD8+ (figura 4B), não estimuladas e policlonalmente estimuladas (p<0,05 em todas as condições). Reforço das células estimuladas com rhIL-21 levou a um aumento pequeno embora significante da proliferação de ambas as células CD4+ e D8+ com um aumento tanto do índice proliferativo (CD4+ e CD8+: 1,07 vs. 1,25, p=0,017; e 1,09

vs. 1,32, p+0,017, respectivamente; figura 5A) e frequência de precursor (CD+ 0,007 vs. 0,014, p=0,016; CD+ 0,007 vs. 0,015, p+0,026; figura 5C). IL-21 não afetaram a proporção de células CD4+ ou CD8+ que proliferam em resposta à estimulação policlonal (figura 5D), sugerindo que elas foram estimuladas ao máximo. Contudo, a IL-21 não levou a um aumento significante do grau de proliferação das células CD8+ (índice proliferativo 11,59 vs. 19,39, p=0,012; figura 5B).

Exemplo 7: IL-21 prevê o desenvolvimento da autoimunidade secundária após alentuzumab

Em todos os pontos de tempo no Exemplo 6, a concentração da IL-21 sérica foi significantemente maior que nos pacientes que desenvolveram autoimunidade secundária em comparação com o grupo não autoimune (para todas as comparações p<0,05; figura 6A). Foram examinadas todas as amostras de soro de pré-tratamento de 84 pacientes que continuaram a receber subsequentemente alentuzumab. Depois de pelo menos dois anos de acompanhamento com esses pacientes, os mesmos foram categorizados como sendo do grupo "autoimune" (n=35: 32 pacientes com doenças da tireoide, um com IPT, um com doença de Goodpasture, e um com Alopecia) ou grupo "não imune" (n=49: pacientes sem autoanticorpos ou somente com autoanticorpos transitórios (não sustentados por mais de seis meses)). Esses soros de pré-tratamento tinham uma concentração média estatisticamente maior de IL-21 que os controles; contudo, isso foi inteiramente explicado pelos altos níveis de IL-21 naqueles pacientes que continuaram a desenvolver autoimunidade secundária. Houve uma diferença altamente significante nos níveis médios de IL-21 de pré-tratamento entre aqueles que continuaram a desenvolver autoimunidade (464 pg/mL) e aqueles que não continuaram (229 pg/mL; p=0,0002) (figura 6B).

A associação entre linfopenia induzida e autoimunidade foi observada em modelos animais. Sob condições linfopênicas, as células T remanescentes sofrem expansão compensatória expansiva para reconstituir o sistema imunológico. Esse processo denominado proliferação homeostática se baseia na estimulação através do complexo de TCR-autopeptídeo-MHC

(Ge et al., *P.N.A.S.* **101,** 3041-3046 (2004); Ge et al., *P.N.A.S.* **98**, 1728-1733 (2001); Kassiotis et al., *J Exp. Med.* **197**, 1007-1016 (2003)) e os resultados em uma população desviada em relação ao reconhecimento aumentado do auto-antígeno, como visto nessos estudos. Além disso, células T se expandindo rapidamente adquirem o fenótipo e características funcionais de células de memória, incluindo: dependência reduzida a coestimulação, a capacidade de responder a doses de antígeno mais baixas que as células *naïve*, e a secreção rápida de citocinas inflamatórias na re-estimulação, assim promovendo ainda o colapso da auto-tolerância (Cho et al., *J Exp. Med.* **192**, 549- 556 (2000); Goldrath et al. *J Exp . Med.* **192**, 557-564 (2000); Murali-Krishna et al., *J Immunol* **165**, 1733-1737 (2000); Wu et al., *Nat Med.* **10**, 87-92 (2004)). Ainda, apesar dessas alterações, a autoimunidade não é uma consequência inevitável da linfopenia. Certamente, tal como com esses pacientes, a maior parte dos pacientes linfopênicos não desenvolveu autoimunidade, sugerindo que "co-fatores" adicionais são requeridos.

Foi demonstrado aqui, pela primeira vez no homem, que a superprodução de IL-21 é o "segundo tento" requerido no desenvolvimento da autoimunidade secundária seguinte, de outro modo, ao tratamento da esclerose múltipla com um agente de depleção de linfócito tal como alentuzumab. Os estudos mostram que a autoimunidade surge nos pacientes esgotados de linfócitos, com apoptose maior de células T e ciclo celular acionado por níveis mais altos de IL-21 influenciados geneticamente, os quais são detectáveis mesmo antes do tratamento. Mesmo antes do tratamento, os pacientes que continuaram a desenvolver a autoimunidade secundária tinham mais que 2 vezes níveis maiores de IL21 sérica que o grupo não imune, sugerindo que a IL-21 sérica pode servir como um biomarcador para o risco de desenvolver autoimunidade meses a anos após o tratamento com alentuzumab. Sem desejar estar ligado à qualquer teoria, acreditamos que, por ciclos de acionamento da expansão e morte das células T ao excesso, IL-21 aumenta a probabilidade de gerar células T autorreativas, e, logo, para autoimunidade. Assim, o ciclo de células T induzido por citocina é um princípio geral de autoimunidade associada à linfopenia.

Exemplo 8: o genótipo de IL-21 influencia a expressão de IL-21 e se associa à autoimunidade

A. Genotipagem de IL-21

No total, quatros SNPs, rs 13151961, rs6822844, rs4833837 e rs6840978, que ficam em uma região de desequilíbrio de ligação forte contendo quatro genes, KIAAI 109- ADAD1-IL2-IL21, no cromossomo 4q27 foram testados. Todos os quatro SNPs estavam disponíveis como produtos de Ensaios-Em-Demanda (AOD) de Applied Biosystems. A genotipagem de SNP foi realizada usando-se a metodologia de TaqMan da Applied Biosystems de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante. A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada em máquinas para PCR 9700 Viper de 384 poços da Applied Biosystems, depois do que os genótipos foram passados em um 7900 High Throughput Sequence Detection System (SDS) usando o software SDS Versão 2.1, Cada indivíduo foi genotipado em duplicata. Todos os indivíduos foram adicionalmente genotipados quanto a fatores genéticos associados à esclerose múltipla: HLA-DRBI *1501, rs2104286 (IL2RA) e rs6897932 (IL7R).

B. Resultados

Para determinar se há uma associação entre a variação genética e a produção de IL-21, foram genotipados 73 pacientes, nos quais a concentração de IL-21 sérica pré-alentuzumab havia sido determinada, para quatro polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) que ficam entre um bloco de desequilíbrio de ligação (LD) no cromossomo 4q27 que codifica o gene *IL-21*. A frequência do menor alelo para todos os quatro SNPs estava de acordo com os dados publicados: rs13151961G (14,5%), rs6822844T (14,6%), rs4833837G (38,0%) e rs6840978T (18.1%) (Glas et al, *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 1737-1744 (2009)). Verificou-se que o genótipo em 3 dos 4 SNPs (rsl3151961 A/A, rs6822844 G/G e rs6840978 C/C) estava associado com níveis significantemente mais altos da IL-21 sérica (valores p: 0,0076, 0,0098 e 0,0067, respectivamente). O genótipo em rs4833837 não influenciou a produção de IL-21. O LD entre rs4833837 e os outros três SNPs é baixo (r^2<0,15), portanto, um SNP que fica sobre o halotipo rsl3151961(A)-

rs6822844(G)-rs6840978(C) é mai provável de estar associado à produção aumentada de IL-21. As frequências de genótipos para HLA-DRBI *1501, rs2104286 (IL2RA) e rs6897932 (IL7R) não diferiram dos dados publicados para outros pacientes não selecionados com esclerose múltipla (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), *Lancet Neurol.* **7**, 567-569 (2008); Yeo et al., *Ann Neurol* **61**, 228-236 (2007)).

Finalmente, de modo a verificar se o genótipo influencia a suscetibilidade à autoimunidade depois do alentuzumab, foram categorizados tantos pacientes quanto possível naqueles que desenvolveram (27 pacientes) e definitivamente naqueles (23 pacientes) que não desenvolveram autoimunidade pós-alentuzumab. Vinte e três pacientes não puderam ser categorizados devido à produção transitória de autoanticorpos e/ou tempo insuficiente desde a exposição ao alentuzumab. Foi descoberto que os genótipos (rsl3151961 A/A, rs6822844 G/G, rs6840978 C/C), que mostraram estar associados à concentração de IL-21 sérica mais alta, estavam também associados à autoimunidade pós alentuzumab.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificar um paciente com esclerose múltipla (MS) que tem interleucina-21 (IL-21) elevada em comparação com a IL-21 de um paciente sem doença autoimune, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

medir a IL-21 em uma amostra de sangue do paciente com MS, identificando, assim, um paciente com MS que tem IL-21 elevada em comparação com o dito paciente.

2. Método para identificar um paciente com esclerose múltipla que é provável de ter interleucina-21 (IL-21) elevada em comparação com um paciente sem doença autoimune, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de genotipar o paciente para detectar a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados de: A/A em SNP re13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um ou mais dos genótipos está associada à IL-21 elevada.

3. Método para identificar um paciente com esclerose múltipla (MS) que está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de:

medir a interleucina-21 (IL-21) em uma amostra de sangue do paciente com MS, em que a IL-21 elevada em comparação com um paciente sem doença autoimune indica que o paciente está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune em comparação com pacientes com MS em IL-21 elevada; e

informar ao paciente sobre o risco aumentado.

4. Método para identificar um paciente com esclerose múltipla, que está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de:

genotipar o paciente para detectar a presença ou ausência no paciente de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples

(SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença dos ditos genótipos está associada a um risco aumentado de desenvolver doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem o dito um ou mais genótipos; e

informar ao paciente sobre o dito risco aumentado.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a dita depleção de linfócitos é induzida por tratamento que alveja CD52.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o tratamento que alveja CD52 compreende tratamento com um anticorpo anti-CD52 ou uma porção de ligação de antígeno deste.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CD52 é alentuzumab ou um agente biologicamente similar.

8. Método para selecionar um paciente com esclerose múltipla (MS) que necessita de monitoramento intensificado quanto ao desenvolvimento de uma doença autoimune secundária depois da terapia de depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de:

medir IL-21 em uma amostra de sangue do paciente com MS, em que a IL-21 elevada no dito paciente em comparação com um paciente sem doença autoimune significa que o paciente necessita de monitoramento intensificado quanto ao desenvolvimento de uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem IL-21 elevada.

9. Método para selecionar um paciente com esclerose múltipla em necessidade de monitoramento intensificado quanto ao desenvolvimento de uma doença autoimune secundária depois da terapia de depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de:

genotipar o paciente para detectar a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um ou

mais dos ditos SNPs indica que o paciente necessita de monitoramento intensificado quanto ao desenvolvimento de uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem o dito um ou mais genótipos.

10. Método para informar a decisão de tratamento para um paciente com esclerose múltipla, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

medir a IL-21 em uma amostra de sangue do dito paciente; e

selecionar um regime de tratamento apropriado para a medição de IL-21.

11. Método para informar a decisão de tratamento a um paciente com esclerose múltipla, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

genotipar o paciente quanto à presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, e

selecionar um regime de tratamento apropriado para o genótipo do paciente.

12. Uso de um agente terapêutico, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para uso no tratamento de esclerose múltipla em paciente que se sabe necessitar deste, o método compreendendo as etapas de:

obter informação sobre (i) IL-21 em uma amostra de sangue do paciente; ou (ii) a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978; e

administrar um agente terapêutico para esclerose múltipla ao dito paciente.

13. Uso de um anticorpo que se liga a CD52, ou uma porção de ligação de antígeno do dito anticorpo, caracterizado pelo fato de ser fabrica-

ção de um medicamento para uso em um método para tratar esclerose múltipla em paciente que se sabe que necessita deste, em que o método compreende as etapas de:

obter informação sobre (i) IL-21 em uma amostra de sangue do paciente; ou (ii) a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978; e

administrar o anticorpo ou porção de ligação de antígeno ao dito paciente.

14. Uso de um anticorpo que se liga a CD52, ou uma porção de ligação de antígeno do dito anticorpo, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para uso em um método para tratar esclerose múltipla em um paciente que se sabe estar em necessidade deste,

em que o método compreende (i) medir a IL-21 em uma amostra de sangue do paciente com MS e/ou (ii) genotipar o paciente para detectar a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978.

15. Uso de um anticorpo que se liga a CD52, ou uma porção de ligação de antígeno do dito anticorpo, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para uso em um método para tratar esclerose múltipla em um paciente que se sabe estar em necessidade deste,

em que foi constatado (i) que o paciente tem níveis normais de IL-21 e/ou (ii) não tem um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 13, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é alentuzumab ou um agente biologicamente similar.

17. Uso de um antagonista de IL-21, caracterizado pelo fato de ser fabricação de um medicamento para reduzir a ocorrência ou gravidade

de uma doença autoimune secundária em um paciente com esclerose múltipla, que tenha sido ou será tratado com terapia de depleção de linfócitos, em que a doença autoimune secundária ocorre depois do tratamento com a terapia de depleção de linfócitos, em que o método compreende administrar um antagonista de IL-21.

18. Kit para ensaio imunossorvente ligado por enzimas (ELISA) para detectar o nível de IL-21 sérico em um paciente, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo que se liga a IL-21, ou uma porção de ligação de antígeno do dito anticorpo, ou um receptor de IL-21 solúvel, e uma bula para instruir o usuário a coletar uma amostra de sangue do paciente.

19. Método para identificar um indivíduo que é provável de ter interleucina-21 (IL-21) elevada em comparação com um paciente sem qualquer condição inflamatória conhecida, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de genotipar o indivíduo para detectar a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um ou mais dos ditos genótipos está associada a IL-21 elevada.

20. Método para informar ao paciente com MS sobre o risco elevado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

obter informação sobre IL-21 (IL-21) em uma amostra de sangue do paciente; em que a IL-21 elevada em comparação com um paciente sem doença autoimune indica que o paciente está em risco de desenvolver uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem IL-21 elevada; e

informar ao paciente sobre o risco aumentado ou a falta deste.

21. Método para informar ao paciente com MS sobre o risco elevado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

obter informação sobre a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do

grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978, em que a presença de um mais dos ditos genótipos está associada a um risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem o dito um ou mais genótipos; e

informar ao paciente sobre o dito risco aumentado ou a falta deste.

22. Método para informar ao paciente com MS sobre a necessidade de monitoramento intensificado quanto a uma doença autoimune secundária seguinte à terapia de depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

obter informação sobre IL-21 em uma amostra de sangue do paciente com MS, em que IL-21 elevada no dito paciente em comparação com um paciente sem doença autoimune indica que o paciente está necessitado de monitoramento intensificado quanto ao desenvolvimento de um doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem IL-21 elevada; e

informar ao paciente sobre a necessidade ou falta desta.

23. Método para informar um paciente com MS da necessidade de monitoramento intensificado quanto ao desenvolvimento de uma doença autoimune secundária seguinte a terapia de depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de:

obter informação sobre a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978; em que a presença de um ou mais de SNPs indica que o paciente necessita de monitoramento intensificado quanto ao desenvolvimento de uma doença autoimune secundária em comparação com pacientes com MS sem o dito um ou mais genótipos. e

informar ao paciente sobre a necessidade ou falta deste.

24. Método para informar sobre um regime para monitoramento de um paciente com MS seguinte à terapia de depleção de linfócitos, carac-

terizado pelo fato de que compreende as etapas de:

obter informação sobre (i) IL-21 em uma amostra de sangue do paciente; ou (ii) a presença ou ausência de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978; e

selecionar o regime de monitoramento apropriado para o paciente com base na informação.

25. Kit para tratar esclerose múltipla, caracterizado pelo fato de que compreende:

um agente terapêutico de depleção de linfócitos; e

uma bula para instruir um profissional da saúde ou um paciente sobre o potencial de risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte ao tratamento com o dito agente, em que o dito risco aumentado está associado à (i) IL-21 elevada ou à (ii) presença de um ou mais genótipos de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: A/A em SNP rs13151961, G/G em SNP rs6822844, e C/C em SNP rs6840978.

26. Kit para identificar um paciente com esclerose múltipla (MS) que está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende:

um anticorpo anti-interleucina-21 (IL-21) e um ou mais agentes para detectar a ligação do dito anticorpo à IL-21 em uma amostra de sangue do paciente com MS.

27. Kit para identificar um paciente com esclerose múltipla que está em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos, caracterizado pelo fato de que compreende:

um ou mais reagentes adequados para identificar o genótipo de um ou mais polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) selecionados do grupo que consiste em: em SNP rs13151961, em SNP rs6822844, e em SNP rs6840978, em uma amostra obtida de um indivíduo.

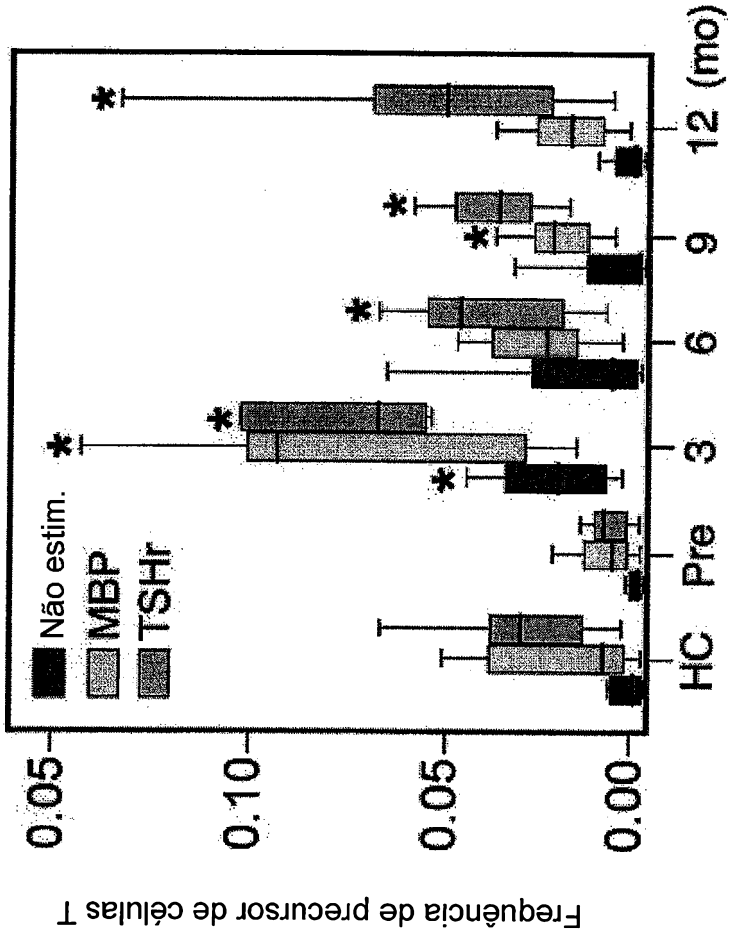

Não estim.
MBP
TSHr
HC
Pre
3
6
9
12 (mo)
0.05
0.10
0.05
0.00
Frequência de precursor de células T

FIG. 1A

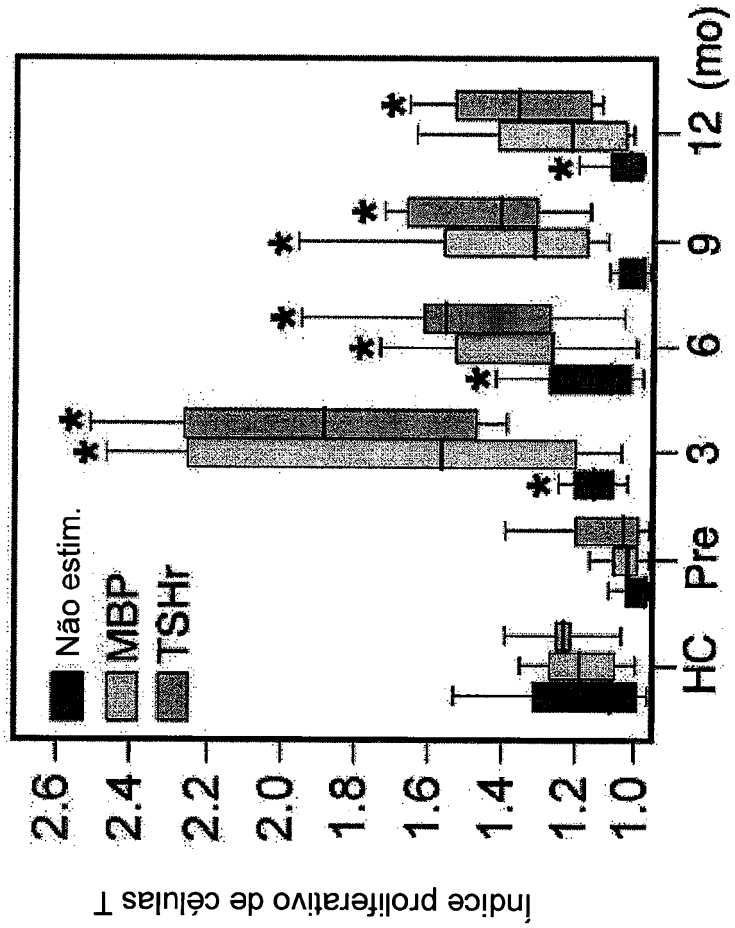

Índice proliferativo de células T
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
Não estim.
MBP
TSHr
HC
Pre
3
6
9
12 (mo)

FIG. 1B

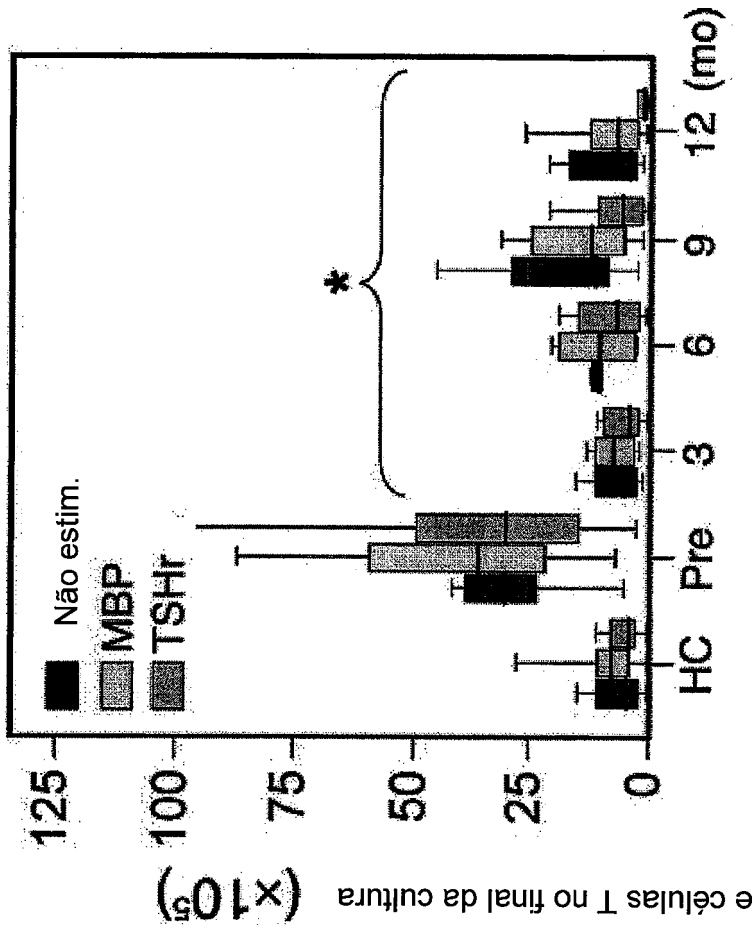

Não estim.
MBP
TSHr
125
100
75
50
25
0
(x10⁵)
No total de células T no final da cultura
HC
Pre
3
6
9
12 (mo)
*

FIG. 1C

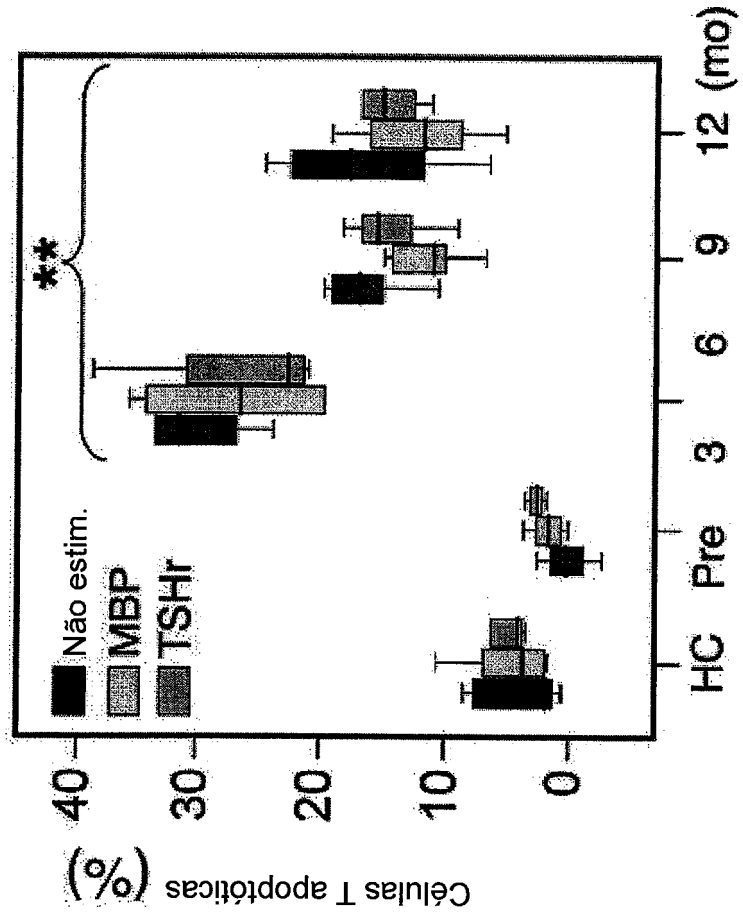

Células T apoptóticas (%)
40
30
20
10
0
HC
Pre
3
6
9
12 (mo)
**
Não estim.
MBP
TSHr

FIG. 1D

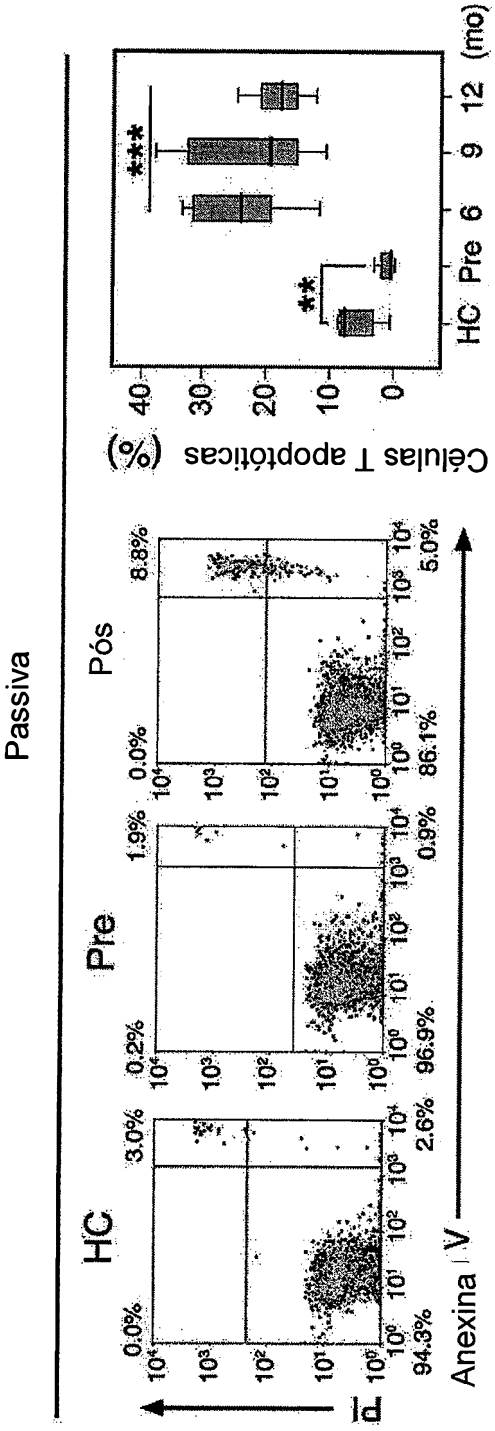

Passiva
HC
Pré
Pós
PI
Anexina I V
0.0%
3.0%
94.3%
2.6%
0.2%
1.9%
96.9%
0.9%
0.0%
8.8%
86.1%
5.0%
Células T apoptóticas (%)
40
30
20
10
0
**
***
HC
Pre
6
9
12
(mo)

FIG. 1E

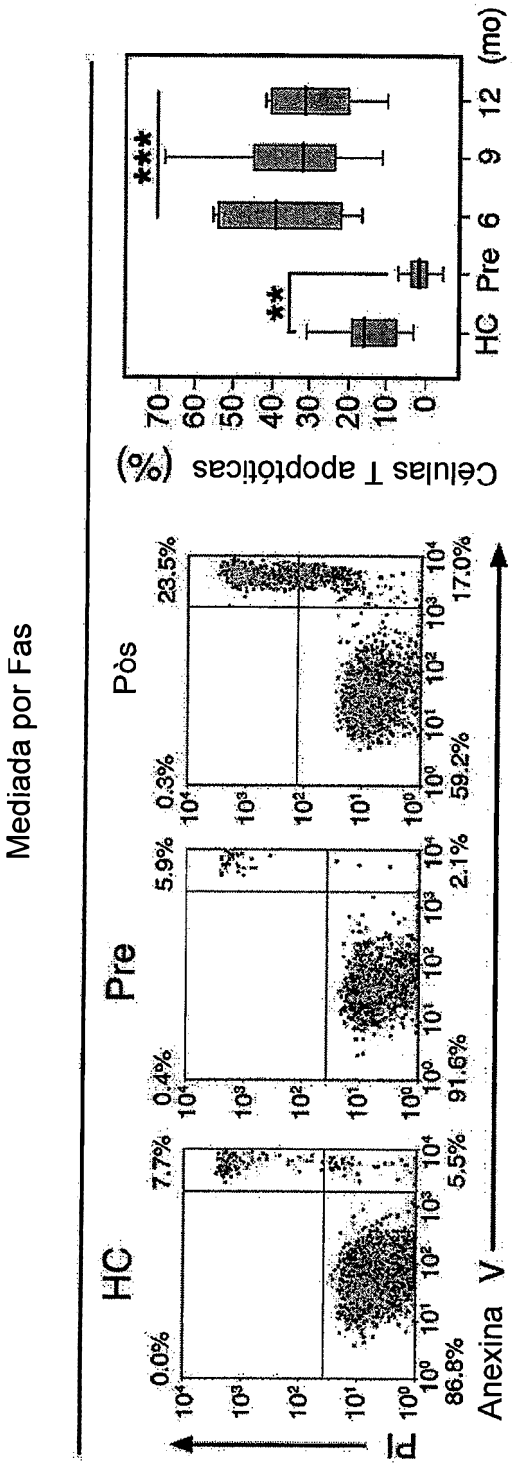

Mediada por Fas
HC
Pre
Pós
PI
Anexina V
0.0%
7.7%
86.8%
5.5%
0.4%
5.9%
91.6%
2.1%
0.3%
23.5%
59.2%
17.0%
Células T apoptóticas (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
**
***
HC
Pre
6
9
12
(mo)

FIG. 1F

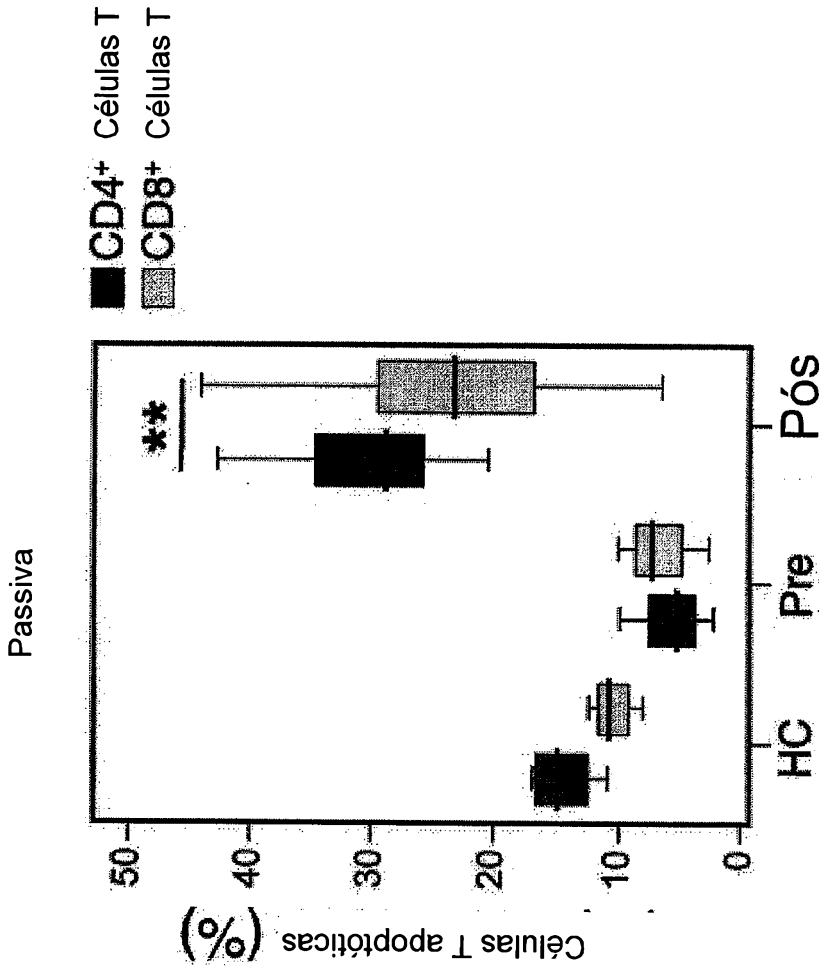

Passiva
CD4+ Células T
CD8+ Células T
**
Células T apoptóticas (%)
50
40
30
20
10
0
HC
Pre
Pós

FIG. 1G

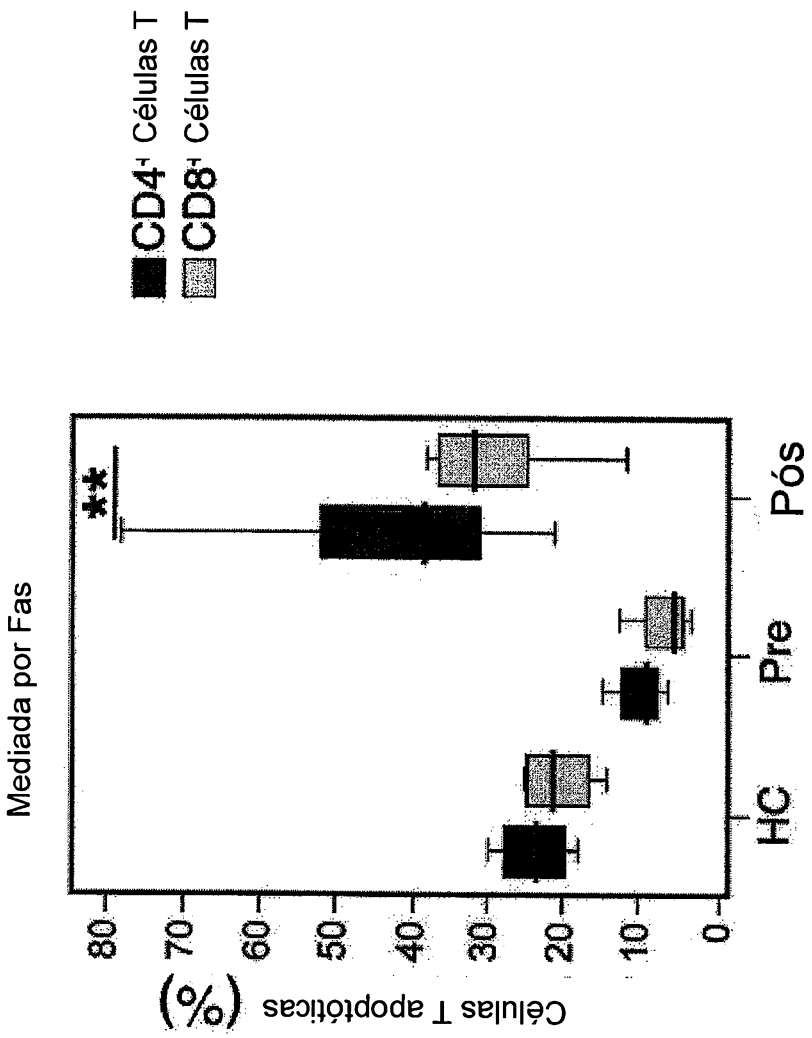

CD4+ Células T
CD8+ Células T
Mediada por Fas
**
Células T apoptóticas (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
HC
Pre
Pós

FIG. 1H

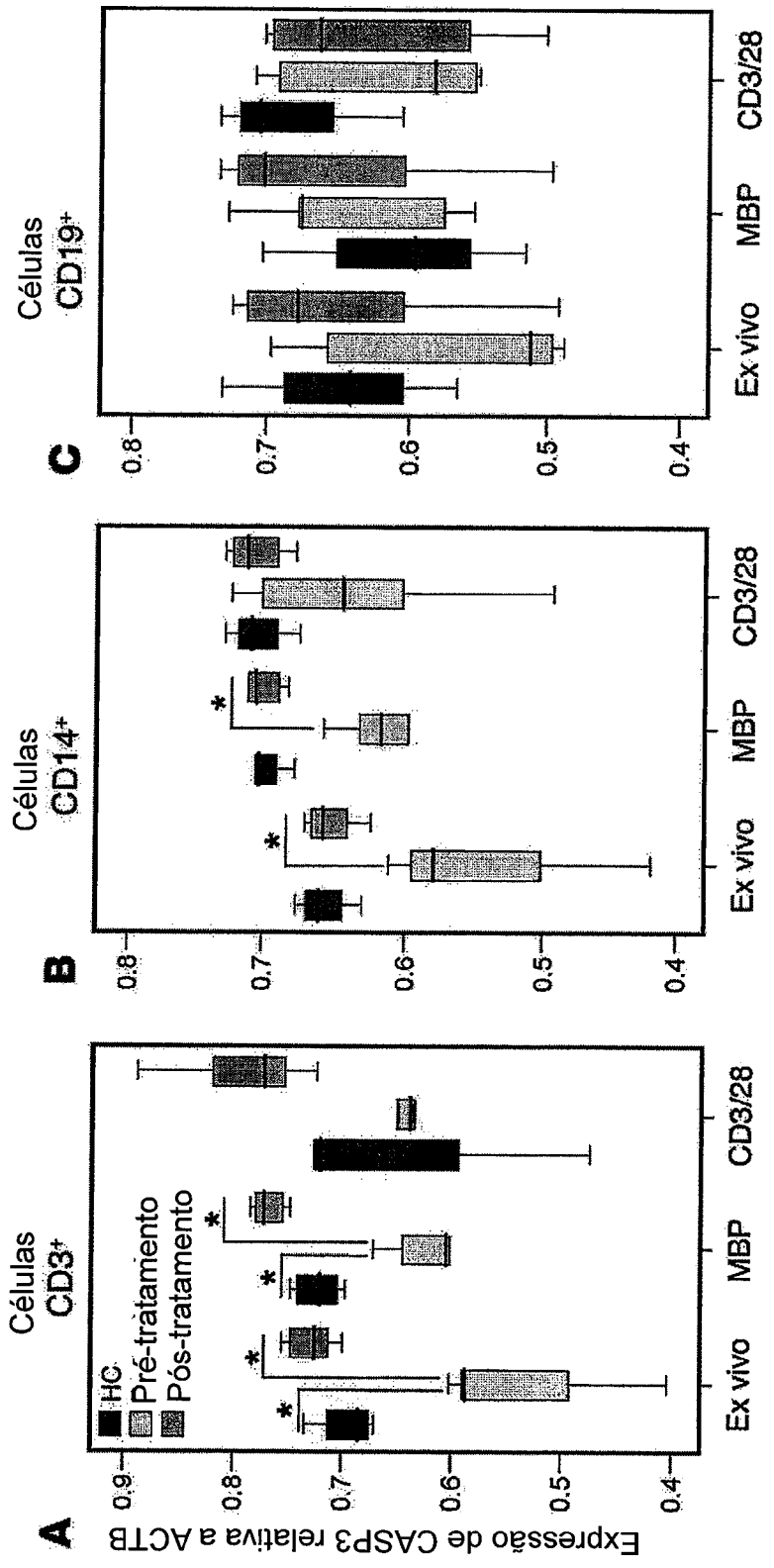

A
Células CD3+
HC
Pré-tratamento
Pós-tratamento
Expressão de CASP3 relativa a ACTB
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
Ex vivo
MBP
CD3/28
B
Células CD14+
C
Células CD19+

FIG. 2

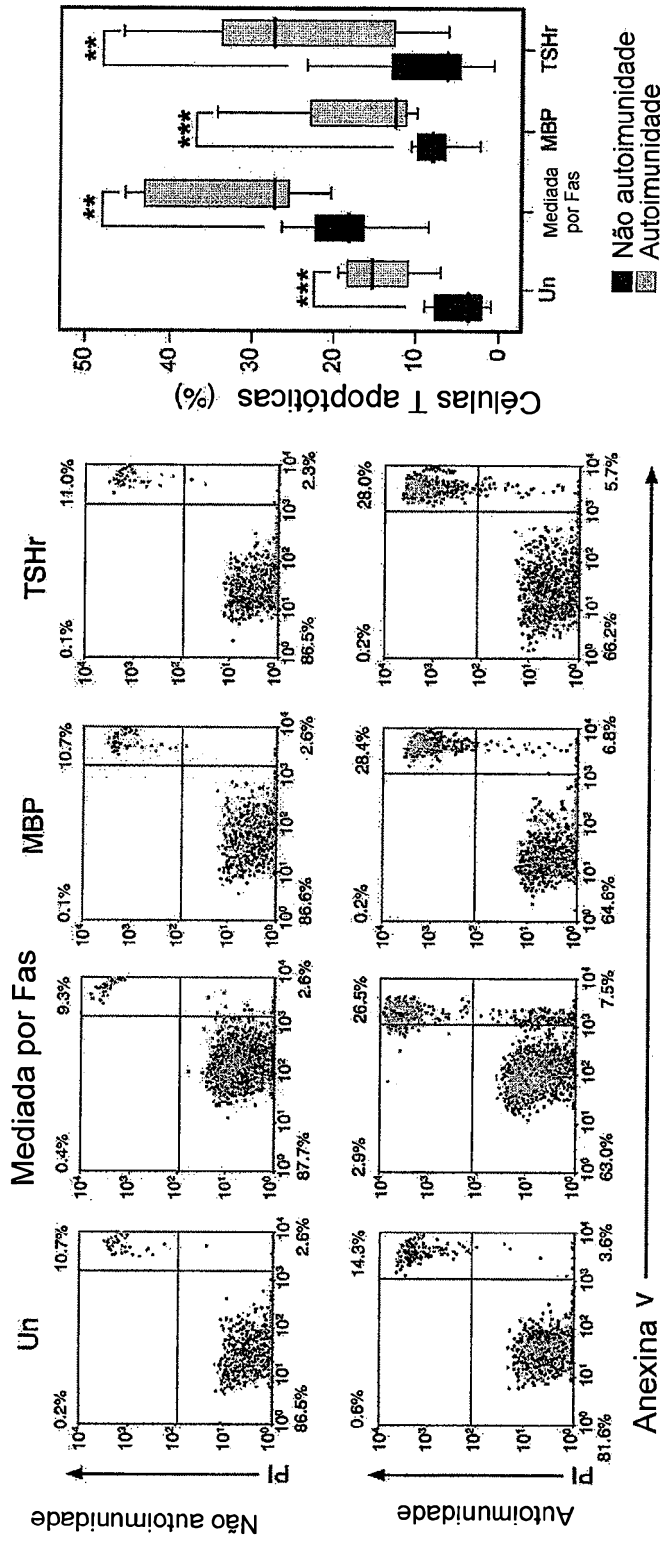

Células T apoptóticas (%)
50
40
30
20
10
0
Un
Mediada por Fas
MBP
TSHr
***
**
Não autoimunidade
Autoimunidade
Un
Mediada por Fas
MBP
TSHr
Não autoimunidade
Autoimunidade
PI
Anexina V
0.2%
86.5%
10.7%
2.6%
0.4%
87.7%
9.3%
2.6%
0.1%
86.6%
10.7%
2.6%
0.1%
86.5%
11.0%
2.9%
0.6%
81.6%
14.3%
3.6%
2.9%
63.0%
26.5%
7.5%
0.2%
64.6%
28.4%
6.8%
0.2%
66.2%
28.0%
5.7%

FIG. 3

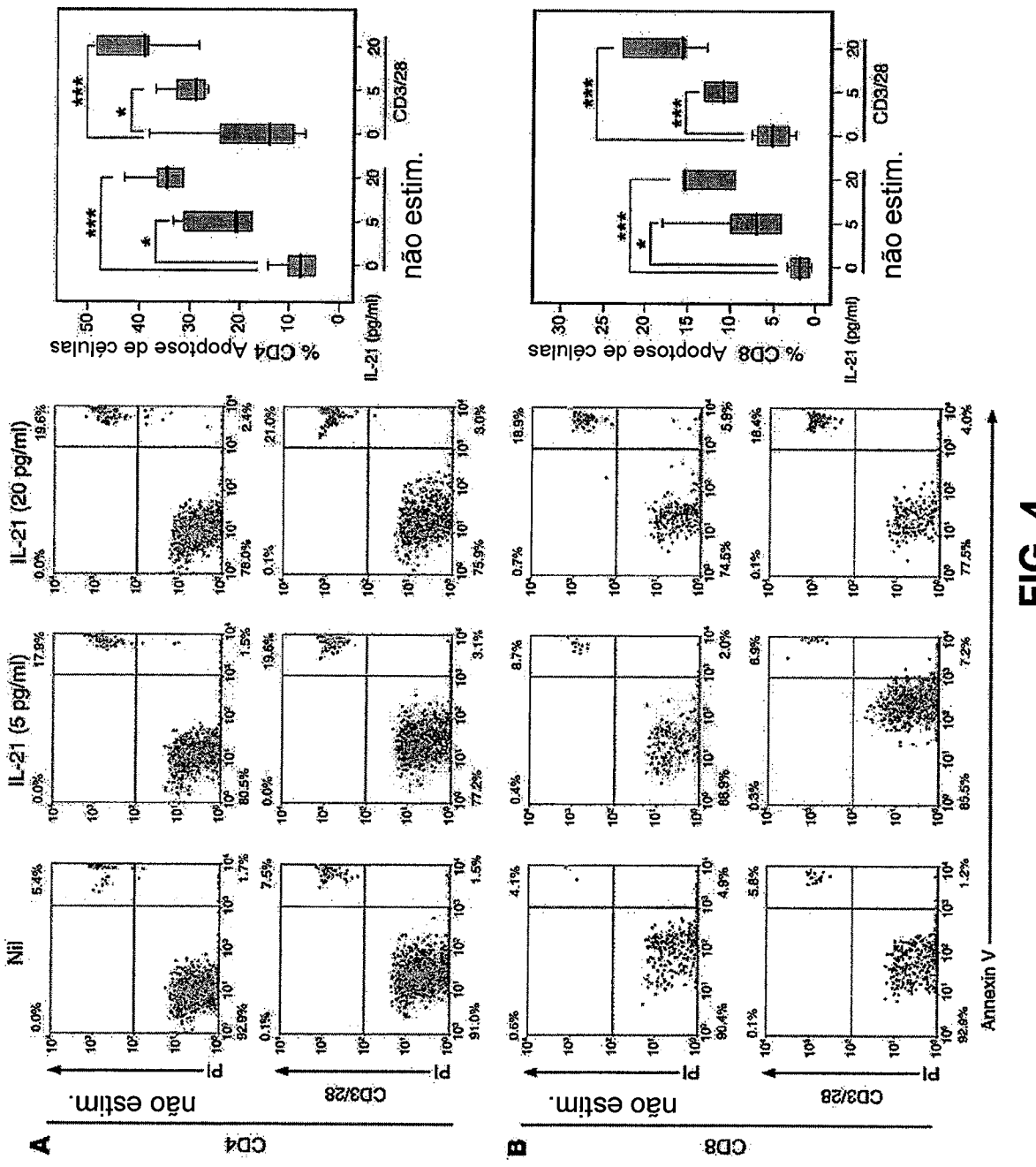

A
CD4
não estim.
CD3/28
Nil
IL-21 (5 pg/ml)
IL-21 (20 pg/ml)
PI
Annexin V
% CD4 Apoptose de células
IL-21 (pg/ml)
não estim.
CD3/28
B
CD8
não estim.
CD3/28
% CD8 Apoptose de células
IL-21 (pg/ml)
não estim.
CD3/28

FIG. 4

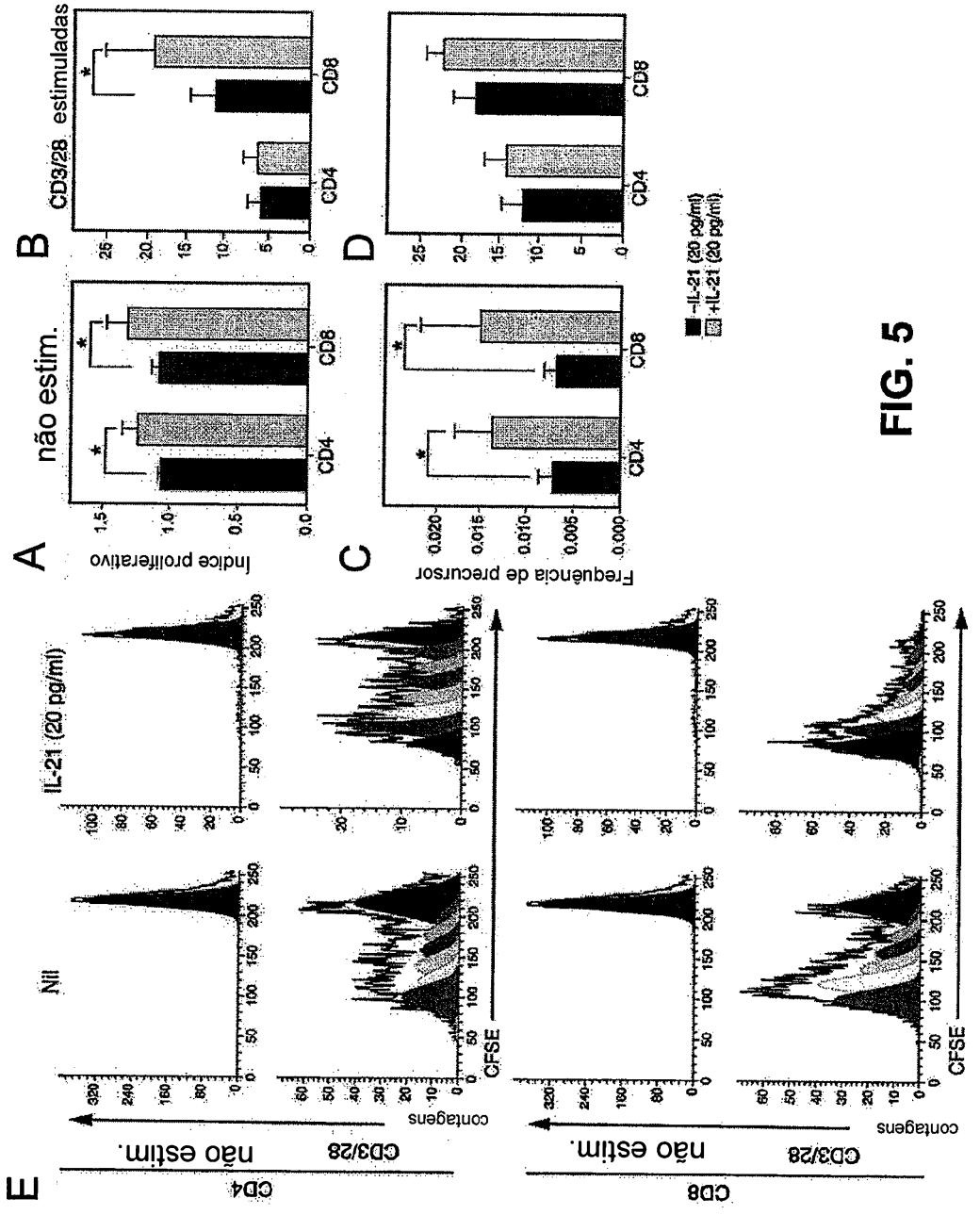

A
não estim.
Índice proliferativo
CD4
CD8
B
CD3/28 estimuladas
C
Frequência de precursor
D
-IL-21 (20 pg/ml)
+IL-21 (20 pg/ml)
E
CD4
não estim.
CD3/28
IL-21 (20 pg/ml)
Nil
contagens
CFSE
CD8

FIG. 5

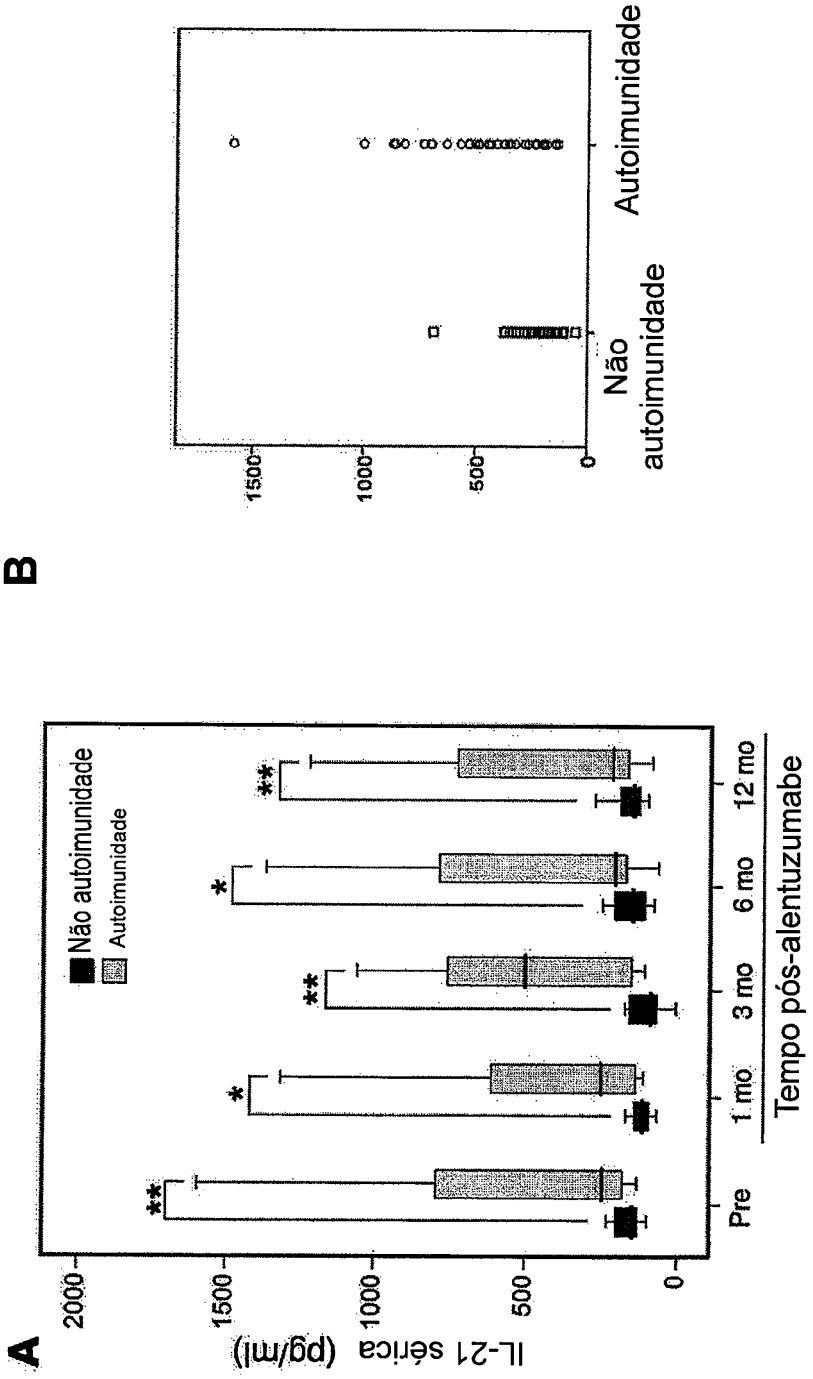

A
IL-21 sérica (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
Não autoimunidade
Autoimunidade
**
*
**
*
**
Pre
1 mo
3 mo
6 mo
12 mo
Tempo pós-alentuzumabe
B
1500
1000
500
0
Não autoimunidade
Autoimunidade

FIG. 6

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA IDENTIFICAR, SELECIONAR E INFORMAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA, USOS DE UM AGENTE TERAPÊUTICO, DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA A CD52, OU DE UMA PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO DITO ANTICORPO E UM ANTAGONISTA DE IL-21, BEM COMO KITS PARA DETECTAR O NÍVEL DE IL-21 SÉRICO EM UM PACIENTE, PARA TRATAR ESCLEROSE MÚLTIPLA E PARA IDENTIFICAR UM PACIENTE COM ESCLEROSE MÚLTIPLA".**

A presente invenção refere-se a métodos para diagnosticar pacientes com esclerose múltipla (MS), incluindo métodos para identificar pacientes com esclerose múltipla que estão em risco aumentado de desenvolver uma doença autoimune secundária seguinte à depleção de linfócitos causada, por exemplo, por tratamento com um anticorpo anti-CD52. Estão também englobados métodos para selecionar regimes de tratamento para pacientes com MS, e reagentes úteis para os métodos acima.