

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 213**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2009 PCT/IB2009/007327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010 WO10041149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2009 E 09804308 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2344677**

54 Título: **Métodos y composiciones para diagnosticar y tratar una enfermedad autoinmunitaria que es secundaria con respecto a la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

**24.10.2008 US 197187 P
08.10.2008 US 195658 P
07.11.2008 US 198631 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2017

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools Trinity Lane Cambridge
Cambridgeshire CB2 1TN, GB**

72 Inventor/es:

**COLES, ALASDAIR, J.;
JONES, JOANNE, L. y
COMPSTON, ALASTAIR**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 632 213 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para diagnosticar y tratar una enfermedad autoinmunitaria que es secundaria con respecto a la esclerosis múltiple

ANTECEDENTES DEL INVENTO

5 La esclerosis múltiple ("MS" acrónimo de multiple sclerosis) es una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del sistema nervioso central (Compston y Coles, Lancet 372, 1502-17 (2008)). Con una prevalencia de aproximadamente uno entre 1.000, la MS es la causa más común de discapacidad neurológica en adultos jóvenes (Polman y Uitdehaag, BMJ 321, 490-4 (2000)). La MS implica una intervención del sistema inmunitario, una lesión inflamatoria aguda de axones y glía, recuperación de la función y reparación estructural, gliosis post-inflamatoria y neurodegeneración (véase, p.ej., Compston y Coles, 2008). Estos procesos secuenciales subyacen en un curso clínico caracterizado por episodios con recuperación, episodios que dejan déficits persistentes, y progresión secundaria. *Id.*

15 La meta de un tratamiento de la MS es reducir la frecuencia y la gravedad de las recaídas, prevenir la discapacidad que procede de una progresión de la enfermedad y favorecer la reparación de los tejidos (Compston y Coles, 2008). El enfoque primario de un tratamiento de la MS es una modulación o supresión del sistema inmunitario. Los fármacos para MS actualmente disponibles incluyen interferón beta-1a (p.ej., AVONEX y REBIF), interferón beta-1b (p.ej., BETASERON), acetato de glatiramer (p.ej., COPAXONE), mitoxantrona (p.ej., NOVANTRONE), y natalizumab (p.ej., TYSABRI). Otro nuevo y prometedor fármaco para la MS es el alemtuzumab (CAMPATH-1H).

20 El alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido hacia la CD52, una proteína ampliamente distribuida sobre la superficie de linfocitos y monocitos pero con una función desconocida. El alemtuzumab se ha usado para tratar la leucemia linfocítica crónica de células B. Un único pulso de tratamiento conduce a una linfopenia rápida, profunda y prolongada. Los números de células se recuperan pero a velocidades variables. Las células T CD4+ son particularmente lentas en recuperarse, permaneciendo agotadas durante por lo menos cinco años (Coles y colaboradores, Journal of Neurology 253, 98-108 (2006)). Una prueba de 2 fases (grupo de estudios CAMMS-223; Coles y colaboradores, N. Engl. J. Med 359, 1786-1801 (2008)) ha mostrado que el alemtuzumab es altamente efectivo para tratar una esclerosis múltiple que recae - remite tempranamente. Este fármaco reduce el riesgo de actividad de la enfermedad y acumulación de discapacidad en más de un 70 % en comparación con el interferón-beta en pacientes con una esclerosis múltiple en recaída-remisión tempranamente. El efecto desfavorable principal es una autoinmunidad que surge en el establecimiento de linfopenia de células T en meses hasta años después de la adición de la dosis. Aproximadamente 20 %-30 % de los pacientes desarrollan autoinmunidad de tiroides, principalmente la enfermedad de Graves (Coles y colaboradores, Lancet 354, 1691-1695 (1999)) y un 3 % de ellos tienen una trombocitopenia inmune (ITP) (Coles y colaboradores, 2008). También se han observado casos individuales de la enfermedad de Goodpasture, de la neutropenia autoinmune (Coles y colaboradores, Journal of Neurology 253, 98-108 (2006)), y de la anemia hemolítica autoinmune (observación no publicada). Además, un 35 5,5 % de los pacientes desarrollan autoanticuerpos no de tiroides prolongados sin enfermedad clínica. La cronología y el espectro de autoinmunidad después del tratamiento con alemtuzumab son similares a lo que se ha observado en otros ejemplos de "autoinmunidad con reconstitución" en otros contextos clínicos, por ejemplo una enfermedad de tiroides autoinmune y unas citopenias autoinmunes también predominan durante meses hasta años después de un trasplante de células madre hematopoyéticas o de un tratamiento antirretroviral del HIV (Chen y colaboradores, Medicine (Baltimore) 84, 98-106 (2005); Daikeler y Tyndall, Best. Pract. Res. Clin. Haematol. 20, 349-360 (2007); Jubault y colaboradores, J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 4254-4257 (2000); Ting, Ziegler, y Vowels, Bone Marrow Transplant. 21, 841-843 (1998); Zandman-Goddard y Shoenfeld, Autoimmun. Rev. 1, 329-337 (2002)).

Mientras que la autoinmunidad que surge en el contexto de una linfopenia ha sido bien reconocida en modelos con animales, raramente es encontrada y por lo tanto es difícil de estudiar en seres humanos. La mayor parte de los individuos linfopénicos no desarrollan autoinmunidad, sugiriendo que están implicados factores adicionales (Krupica y colaboradores, Clin Immunol 120, 121-128 (2006)). Sigue sin explicar lo que son estos factores adicionales. El agotamiento de células reguladoras T ha sido considerado como un factor, como se observa en modelos de colitis y gastritis de mурidos (Alderuccio y colaboradores, J Exp. Med 178, 419-426 (1993); McHugh y colaboradores, J Immunol 168, 5979-5983 (2002); Powrie y colaboradores, Int. Immunol 5, 1461-1471 (1993); Sakaguchi y colaboradores, J Immunol 155, 1151-1164 (1995)). Sin embargo, se ha observado que las células reguladoras T aumentan después del tratamiento con alemtuzumab en pacientes humanos y por lo tanto vuelven a niveles normales (Cox y colaboradores, Eur J Immunol 35, 3332-3342 (2005)). Esta observación se ha reproducido desde entonces (Bloom y colaboradores, Am J Transplant. 8, 793-802 (2008)) y está en conformidad con otros modelos linfopénicos experimentales (de Kleer, I. y colaboradores, Blood 107, 1696-1702 (2006); Zhang, H. y colaboradores, Nat Med 11, 1238-1243 (2005)).

Krupica T. y colaboradores (Clinical Immunology, Academic Press, US, 2006, Vol. 20, No. 1) observaron que el desarrollo espontáneo de autoinmunidad en ratones NOD resulta de la combinación de una linfopenia y una superproducción de IL-21 aumentada.

SUMARIO DEL INVENTO

Hemos inventado nuevos/as y útiles métodos y composiciones para mejorar la gestión del riesgo en el tratamiento de la MS. Los métodos y las composiciones reducen los efectos colaterales del tratamiento de la MS tales como una autoinmunidad secundaria y ayudan a los proveedores de cuidados de salud y pacientes a seleccionar regímenes para la vigilancia y el tratamiento y el post-tratamiento de la MS. Los métodos y las composiciones de este invento están basados en nuestro descubrimiento de que en pacientes de esclerosis múltiple (MS) un elevado nivel de IL-21, detectable incluso antes de una terapia de agotamiento de linfocitos, tal como una terapia con alemtuzumab, se correlaciona con un riesgo aumentado de desarrollar una autoinmunidad secundaria después de la terapia. Hemos descubierto además que un nivel de IL-21 de un individuo puede ser determinado genéticamente; unos genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978 están asociados con un nivel elevado de IL-21.

El alcance del invento es definido de acuerdo con las reivindicaciones. Correspondientemente, la presente divulgación proporciona unos métodos para identificar a un paciente de MS que tiene una interleucina-21 (IL-21) elevada en comparación con la IL-21 en un individuo sin ninguna enfermedad autoinmunitaria. En algunas formas de realización, los métodos comprenden la etapa de medir la IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente de MS, identificando de esta manera a un paciente de MS que tiene una IL-21 elevada en comparación con la de dicho individuo. Alternativamente, los métodos comprenden la etapa de genotipificar al paciente para detectar la presencia o ausencia en el paciente de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) asociados con una IL-21 elevada, tales como los seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, en donde la presencia de uno o más de dichos genotipos está asociada con una IL-21 elevada.

El invento proporciona unos métodos para identificar a un paciente de MS que está en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria después de un agotamiento de linfocitos. En algunas formas de realización, los métodos comprenden la etapa de averiguar (p.ej. por medición) el nivel de interleucina-21 (IL-21) en una muestra de sangre procedente del paciente de MS, en donde un nivel elevado de IL-21 en comparación con el de un individuo sin ninguna enfermedad autoinmunitaria indica que el paciente está en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria en comparación con los pacientes de MS sin IL-21 elevada. Alternativamente, los métodos comprenden la etapa de averiguar por genotipificación la presencia o ausencia en el paciente de MS de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) asociados con una IL-21 elevada, seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, en donde la presencia de uno o más (p.ej. dos o tres) de dichos genotipos está asociada con un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria en comparación con unos pacientes de MS sin dichos uno o más genotipos. Estos métodos comprenden opcionalmente la etapa de informar al paciente y/o a su proveedor de cuidados de salud de dicho riesgo aumentado, y/o la etapa de registrar el riesgo aumentado.

El invento proporciona además unos métodos para seleccionar a un paciente de MS que necesita de dicha vigilancia aumentada del desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria después de una terapia de agotamiento de linfocitos. Estos métodos pueden comprender la etapa de medir la IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente de MS en donde una IL-21 elevada en dicho paciente en comparación con un individuo sin ninguna enfermedad autoinmunitaria indica que el paciente necesita una vigilancia aumentada del desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria en comparación con pacientes de MS sin ninguna IL-21 elevada. Alternativamente, los métodos pueden comprender la etapa de genotipificar al paciente para detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de SNPs asociados con una IL-21 elevada, seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, en donde la presencia de uno o más de dichos SNPs indica que el paciente necesita una vigilancia aumentada del desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria en comparación con pacientes de MS sin dichos uno o más genotipos. Estos métodos comprenden opcionalmente la etapa de informar al paciente y/o a su proveedor de cuidados de salud de la necesidad de una vigilancia aumentada, y/o la etapa de registrar la necesidad.

El invento proporciona también métodos para informar acerca de un tratamiento para un paciente de MS, que comprende medir la IL-21 en una muestra de sangre procedente de dicho paciente o genotipificar el paciente en cuanto la presencia o ausencia de los tres fenotipos de SNP antes mencionados y seleccionar un régimen de tratamiento apropiado para la medición o genotipificación de IL-21.

El invento proporciona un agente terapéutico destinado a su uso en el tratamiento de una MS en un paciente del que se conoce que necesita del mismo; y un uso de un agente terapéutico para la producción de una medicación destinada a su uso en un método de tratar una MS en un paciente del que se conoce que necesita del mismo; que comprende las etapas de (a) obtener o averiguar la información sobre (i) la IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente por medición de la IL-21 en la muestra; o (ii) la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) asociados con una IL-21 elevada, seleccionados del conjunto conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP

rs6840978 (p.ej. genotipificando al paciente); (b) administrar un agente terapéutico para la esclerosis múltiple a dicho paciente, y (c) opcionalmente vigilar al paciente en cuanto al desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria. El agente terapéutico puede estar destinado a su uso en pacientes de los que se encuentre que tienen niveles normales de IL-21 y/o no tienen ninguno de los tres genotipos de SNP de IL-21 antes mencionados. En algunas formas de realización del invento, el agente terapéutico es un anticuerpo anti-CD52 (p.ej. alemtuzumab o un agente biológicamente similar), o unas porciones del mismo que se fijan a antígenos.

Están abarcados además unos regímenes terapéuticos destinados a usarse en los métodos del invento.

El invento proporciona un antagonista de IL-21 destinado a su uso en un método de reducir la aparición o la gravedad de una enfermedad autoinmunitaria secundaria en un paciente de esclerosis múltiple que ha sido o será tratado con una terapia de agotamiento de linfocitos; y el uso de un antagonista de IL-21 en la producción de un medicamento para reducir la aparición o la gravedad de una enfermedad autoinmunitaria secundaria de un paciente de esclerosis múltiple que ha sido o será tratado con una terapia de agotamiento de linfocitos; en donde la enfermedad autoinmunitaria secundaria se presenta después de un tratamiento con la terapia de agotamiento de linfocitos, comprendiendo el método administrar el antagonista de IL-21 a dicho paciente, p.ej. antes de, durante o subsiguientemente al tratamiento con la terapia de agotamiento de linfocitos. Están abarcados por el invento unos antagonistas de IL-21 destinados a su uso en estos métodos (p.ej. un anticuerpo anti-IL-21 o anti-receptor de IL-21, o una porción que se fija a antígenos del mismo, o un receptor de IL-21 soluble), y los usos de estos antagonistas de IL-21 en la producción de un medicamento destinado a su uso en los métodos.

La divulgación proporciona métodos para averiguar la sensibilidad de células T al tratamiento con una terapia de agotamiento de linfocitos en un paciente de esclerosis múltiple, que comprende medir la caspasa-3 en células T obtenidas a partir de dicho paciente después de dicha terapia, en donde un aumento de la caspasa-3 en dichas células T en comparación con las células T procedentes de un paciente de MS que no ha recibido dicha terapia es indicativa de la sensibilidad de las células T a dicha terapia. La medición puede implicar la determinación de la cantidad o la concentración de caspasa-3 o de un ácido nucleico que codifica la caspasa-3.

La divulgación proporciona unos métodos para informar a un paciente de MS de un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un agotamiento de linfocitos, que comprende las etapas de obtener o averiguar una información sobre la interleucina-21 (IL-21) en una muestra de sangre procedente del paciente de MS en donde una IL-21 elevada en comparación con la de un individuo sin ninguna enfermedad autoinmunitaria indica que el paciente se encuentra en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria en comparación con pacientes de MS sin ninguna IL-21 elevada; e informar al paciente de un riesgo aumentado o de la falta del mismo. Alternativamente, los métodos comprenden obtener o averiguar una información sobre la presencia o ausencia de una más de los genotipos de IL-21 antes mencionados, en vez de una información sobre el nivel de IL-21 en sangre. Correspondientemente, la divulgación proporciona también métodos para informar a un paciente de MS de una necesidad o una falta de necesidad de una vigilancia aumentada del desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de una terapia de agotamiento de linfocitos sobre la base del nivel de IL-21 del paciente o la presencia o ausencia de los genotipos de IL-21 más arriba descritos.

La divulgación proporciona unos métodos para informar de un régimen para la vigilancia de un paciente de MS a continuación de una terapia de agotamiento de linfocitos, que comprende las etapas de obtener o averiguar información sobre (i) la IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente; o (ii) la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) asociados con una IL-21 elevada tales como los seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978; y seleccionar un régimen de vigilancia apropiado para el paciente basado en la información. Un apropiado régimen de vigilancia puede incluir, por ejemplo, medir los auto-anticuerpos en el paciente.

El presente invento proporciona ventajas en la gestión del riesgo en un tratamiento del MS. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para distribuir un fármaco para el agotamiento de linfocitos a un paciente de el fin de tratar una esclerosis múltiple, que comprende las etapas de asesorar al paciente sobre el riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un tratamiento con dicho fármaco en donde el riesgo aumentado está asociado con (i) una IL-21 elevada; o con (ii) la presencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) asociados con una IL-21 elevada tales como los seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978; y proporcionar el fármaco al paciente después de dicho asesoramiento, opcionalmente después de haber obtenido el consentimiento informado del paciente.

La divulgación proporciona además unos métodos para identificar a un individuo del que es probable que tenga una interleucina-21 (IL-21) elevada en comparación con la de un individuo sin ninguna condición inflamatoria conocida, que comprende la etapa de genotipificar al individuo con el fin de detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) asociados con una IL-21 elevada, tales como los

seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, en donde la presencia de uno o más de dichos genotipos está asociada con una IL-21 elevada.

5 En el contexto de este invento, el agotamiento de linfocitos puede ser inducido por un tratamiento que se dirige a CD52, p.ej. un tratamiento con un anticuerpo anti-CD52 (p.ej. un anticuerpo monoclonal) o una porción del mismo que se fija a antígenos. El anticuerpo anti-CD52 puede ser alemtuzumab o un agente biológicamente similar, tal como un anticuerpo que compite con el alemtuzumab para fijarse a CD52.

10 En los métodos del invento, la medición de IL-21 puede implicar medir (p.ej. detectar/cuantificar) la cantidad o la concentración de IL-21 o de un ácido nucleico que codifica IL-21 en una muestra, o la cantidad o la concentración de un ARNm que codifica IL-21 en células productoras de IL-21 (p.ej., células Th17) en la muestra. En algunas formas de realización, se realiza la medición de la IL-21 intracelular usando, por ejemplo una tinción de citocinas y una citometría de flujo. En algunas formas de realización se realiza la medición de la IL-21 en suero, usando, por ejemplo, un ensayo de inmunosorbente enlazado con enzimas (ELISA). Son abarcados por la divulgación unos estuches de ELISA para detectar niveles de IL-21 en un individuo humano, que comprenden un anticuerpo anti-IL-21
15 o una porción del mismo que se fija a antígenos, o un receptor de IL-21 soluble. Los estuches pueden incluir además unas instrucciones que dirige a un usuario para tomar una muestra de sangre de un individuo humano.

20 En los métodos de este invento, la información sobre IL-21 (incluyendo una medición o genotipificación) se puede obtener antes de, durante o subsiguientemente a una terapia de MS. Los métodos de este invento se pueden usar en el contexto de cualquier forma de MS, incluyendo pero no limitándose a un esclerosis múltiple en recaída-remisión, una esclerosis múltiple progresiva primaria, y una esclerosis múltiple progresiva secundaria.

25 La divulgación proporciona también estuches para tratar una esclerosis múltiple, que comprende un agente terapéutico que agota a los linfocitos (p.ej. un anticuerpo anti-CD52 tal como alemtuzumab); y unas instrucciones escritas para informar a un paciente proveedor de cuidados de salud del potencial de un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un tratamiento con dicho agente, en donde el riesgo aumentado es indicado por o está asociado con (i) una IL-21 elevada, o (ii) la presencia de uno o más genotipos de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados con una IL-21 elevada, tales como los que se seleccionan entre el conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 de G/G y de C/C en el SNP rs6840978.

30 La divulgación proporciona además unos estuches para identificar a un paciente de MS que se encuentra en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un agotamiento de linfocitos, que comprende un anticuerpo anti-interleucina-21 (IL-21) y unos o más reactivos para detectar la fijación de dicho anticuerpo a IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente de MS. La divulgación proporciona también unos estuches para identificar a un paciente de MS que se encuentra en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un agotamiento de linfocitos, que comprende uno o más reactivos apropiados para identificar el genotipo de uno más polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) seleccionado entre el conjunto que se compone: de SNP rs13151961, de SNP rs6822844 y de SNP rs6840978, en una muestra obtenida a partir de un individuo.

Otras características y ventajas del invento resultarán evidentes a partir de las siguientes figuras y de la descripción detallada.

40 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

45 La FIG. 1A consiste en un gráfico que muestra la frecuencia de precursores (PF) de células T procedentes de testigos sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después del tratamiento con alemtuzumab, no estimulados (Unstim), o a continuación del cultivo con la proteína básica de mielina (MBP) o con el receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHr). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

La FIG. 1B consiste en un gráfico que muestra el índice de proliferación (PI) de células T procedentes de testigos sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después del tratamiento con alemtuzumab, no estimulados (Unstim), o a continuación del cultivo con la proteína básica de mielina (MBP) o con el receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHr). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

50 La FIG. 1C consiste en un gráfico que muestra el número total de células T viables después de 10 días en cultivo procedentes de testigos sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después del tratamiento con alemtuzumab, no estimulados (Unstim), o a continuación del cultivo con la proteína básica de mielina (MBP) o con el receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHr). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

La FIG. 1D consiste en un gráfico que muestra el porcentaje de células T que experimentan apoptosis como respuesta a la ausencia de estímulos o a continuación de un cultivo con MBP o TSHr en cultivos procedentes de testigos sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después del tratamiento con alemtuzumab. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

5 LA FIG. 1E consiste en diagramas y un gráfico que muestra la apoptosis de células T pasivas procedentes de testigos sanos y de pacientes antes y después del tratamiento con alemtuzumab a intervalos de 3 meses. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

10 La FIG. 1F consiste en diagramas y un gráfico que muestra la apoptosis mediada por Fas de células T procedentes de testigos sanos y de pacientes antes y después del tratamiento con alemtuzumab a intervalos de 3 meses. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

La FIG. 1G consiste en un gráfico que muestra la apoptosis de células T CD4+ y CD8+ pasivas procedentes de testigos sanos, pacientes pre-tratamiento y a los 9 meses post-alemtuzumab. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

15 La FIG. 1H consiste en un gráfico que muestra la apoptosis mediada por Fas de células T CD4+ y CD8+ procedentes de testigos sanos, pacientes pre-tratamiento y a los 9 meses post-alemtuzumab. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

20 Las FIGS. 2A-2C consiste en unos gráficos que muestran la expresión de ARNm de caspasa 3 en relación con expresión de ARNm beta-actina en (A) células T CD3+, (B) monocitos CD14+, y (C) células B CD19+, respectivamente, ya sea inmediatamente *ex-vivo* o a continuación de una estimulación con MBP o una estimulación policlonal (anticuerpos anti-CD3/28). (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

25 La FIG. 3 consiste en unos diagramas y un gráfico que muestran que una autoinmunidad después del tratamiento con alemtuzumab está asociada con una excesiva apoptosis de células T. Los porcentajes de apoptosis de células T que son pasivas (Un), mediadas por Fas, o como respuesta a una estimulación con MBP o TSHr en las que carecen de autoinmunidad (Ge y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 3041-3046 (2004)) o las que tienen una autoinmunidad secundaria (Ge y colaboradores, 2004) se muestran en diagramas separados. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

30 Las FIGS. 4A y 4B consiste en unos diagramas y gráficos que muestran que la rhIL-21 induce la apoptosis de células T *in vitro*. Ellas muestran que (A) células T CD4+ y (B) células T CD8+, respectivamente, no estimuladas o estimuladas policlonalmente (anti-CD3/CD28), experimentan apoptosis como respuesta a la rhIL-21 de una manera dependiente de la dosis. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

35 Las FIGS. 5A-5D consiste en unos gráficos que muestran que la rhIL-21 induce la proliferación *in vitro* de células T. LA FIG. 5A consiste en un gráfico que muestra el índice de proliferación de células T CD4+ y CD8+ no estimuladas como respuesta a la rhIL-21. La FIG. 5B consiste en un gráfico que muestra el índice de proliferación de células T CD4+ y CD8+ estimuladas policlonalmente (anti-CD3/CD28) como respuesta a la rhIL-21. LA FIG. 5C es un gráfico que muestra la frecuencia de precursores de células T CD4+ y CD8+ no estimuladas como respuesta a la rhIL-21. La FIG. 5D consiste en un gráfico que muestra la frecuencia de precursores de células T CD4+ y CD8+ estimuladas policlonalmente. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

40 La FIG. 5E consiste en unos diagramas que muestran el número de células CD4+ o CD8+ no estimuladas o estimuladas policlonalmente (anti-CD3/CD28) en diferentes canales en la ausencia de, o como respuesta a, la rhIL-21.

La FIG. 6A es un gráfico que muestra la IL-21 en suero antes y después del tratamiento con alemtuzumab en 15 pacientes con, y 15 pacientes sin, autoinmunidad secundaria. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

45 La FIG. 6B es un gráfico que muestra los niveles de IL-21 en suero (pg/ml) antes del tratamiento en los pacientes no autoinmunes (los que no tenían una autoinmunidad post-alemtuzumab) y los pacientes autoinmunes (los que tenían una autoinmunidad post-alemtuzumab).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 Este invento está basado en nuestro descubrimiento de que la aparición de una autoinmunidad secundaria en un paciente de MS a continuación de una terapia de agotamiento de linfocitos (p.ej., después de un tratamiento con alemtuzumab) está asociada con una IL-21 elevada en el paciente. Hemos descubierto que la IL-21 es elevada en

comparación con la norma (véanse las discusiones más abajo) incluso antes de la terapia en pacientes de MS que posteriormente desarrollan una autoinmunidad secundaria post-terapia. Hemos descubierto también que después de una terapia de agotamiento de linfocitos, la IL-21 es elevada incluso más espectacularmente en esos mismos pacientes, en comparación con unos pacientes de MS sin signos de autoinmunidad secundaria, cuya IL-21 es elevada en una extensión mucho más pequeña. Por lo tanto, los niveles de IL-21 son predictivos de la aparición de una autoinmunidad secundaria después de una terapia de agotamiento de linfocitos en un paciente de MS. Hemos descubierto también que unos genotipos de polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978 están asociados con una IL-21 elevada en un individuo; por lo tanto la genotipificación de un paciente de MS en cuanto a la presencia o ausencia de estos genotipos de SNP específicos ayuda también a predecir el riesgo de desarrollar una autoinmunidad secundaria en el paciente a continuación de un agotamiento de linfocitos.

Hemos descrito por primera vez en 1999 (Coles y colaboradores, 1999) que una autoinmunidad complica a un tratamiento con alemtuzumab (CAMPATH-1H) y hemos continuado observando esta complicación de, lo que se reconoce crecientemente como, una terapia altamente efectiva para una esclerosis múltiple en recaída-remisión tempranamente (Coles y colaboradores, J Neurology 253, 98-108 (2006); Coles y colaboradores, 1999 y 2008). Nuestros estudios descritos seguidamente implicaban una serie de cohortes de pacientes disponibles y tenían como meta comprender este "modelo" sin precedentes de autoinmunidad humana que se presenta en un subconjunto de pacientes de MS tratados con alemtuzumab.

El estado inmune es alterado radicalmente después de una exposición a alemtuzumab. Las células T que se regeneran en el entorno linfopénico generado por el alemtuzumab son altamente proliferativas y se inclinan hacia una auto-reactividad. Sin embargo, estas células son altamente inestables y de corta vida. Mientras que su destino no había sido abordado previamente de manera directa (King y colaboradores, Cell 117, 265-277 (2004)), hemos mostrados que estas células mueren rápidamente por apoptosis. Unos niveles altos y sostenidos de apoptosis de células T puede explicar por qué una única dosis de alemtuzumab induce una linfopenia de células T que dura varios años incluso aunque la vida mitad del alemtuzumab circulante es solamente de seis días y los precursores hematológicos no se han agotado (Gilleece y colaboradores, Blood 82, 807-812 (1993)).

Frente a estos antecedentes, hemos mostrado que los pacientes con autoinmunidad secundaria tienen mayores tasas de apoptosis de células T, pero no una mayor linfopenia de células T, que los que carecen de autoinmunidad, sugiriendo un ciclado aumentado de células en este grupo. Estas perturbaciones del ciclado de células T están asociadas con una expresión de IL-21 en suero significativamente más alta que hemos encontrado como determinado genéticamente en al menos algunos casos. Además, la susceptibilidad a una autoinmunidad asociada con linfopenia es manifiesta antes del agotamiento de linfocitos, prediciendo un tratamiento previo de niveles de IL-21 con exactitud (valor predictivo positivo de más que 70 %, p.ej. de 83 %, y valor predictivo negativo de más que 62 %, p.ej. 72 %) el desarrollo de una autoinmunidad durante meses hasta años después de la exposición al alemtuzumab. Sin estar vinculado por ninguna teoría creemos que impulsando a un exceso los ciclos de expansión y muerte de células T, la IL-21 aumenta las oportunidades estocásticas de que las células T encuentren tolerancia a auto-antígenos y a la rotura, promoviendo por lo tanto una autoinmunidad.

En resumen, nuestros hallazgos proporcionan la primera exploración de autoinmunidad inducida por linfopenia en seres humanos y proporcionan un marco conceptual para comprender una autoinmunidad asociada con linfopenia que va más allá del estrecho contexto de tratar una esclerosis múltiple con alemtuzumab. El concepto consiste en que en primer lugar un agotamiento terapéutico de linfocitos y en segundo lugar una superproducción genéticamente restringida de IL-21, conducen a un estado del exceso de ciclado de células T y de supervivencia reducida, que favorece una autoinmunidad en seres humanos. Estos hallazgos proporcionan bases para el presente invento.

Este invento proporciona métodos para gestionar pacientes de MS cuando se considera una terapia de agotamiento de linfocitos tal como una terapia de alemtuzumab. Por ejemplo, nuestro invento proporciona métodos para identificar a un paciente de MS que tiene una IL-21 elevada en comparación con la norma (es decir, niveles de IL-21 en uno o varios individuos testigos como se describirá seguidamente), y métodos para identificar a un paciente de MS que se encuentra en riesgo aumentado de desarrollar una autoinmunidad secundaria a continuación de un agotamiento de linfocitos. Estos métodos comprenden la etapa de medir la IL-21 (p.ej. niveles de proteínas intracelulares o extracelulares, niveles de transcritos de ARN o niveles de actividad de IL-21; véanse las discusiones presentadas seguidamente) en una muestra de sangre procedente del paciente, y comparar el valor de IL-21 con el valor normal de IL-21. Alternativamente, en lugar de o además del ensayo de sangre, se puede genotipificar al paciente en cuanto a la presencia o ausencia de uno o más genotipos de SNP de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, en donde la presencia de uno, dos o los tres genotipos citados está asociada con una IL-21 elevada. Tal como se discute más arriba, una IL-21 elevada está asociada con un riesgo aumentado de desarrollar una autoinmunidad secundaria en el paciente de MS a continuación de un agotamiento de linfocitos, en comparación con unos pacientes de MS que no tienen una IL-21 elevada.

La identificación de un paciente por los métodos del invento puede ser seguida por cierto número de otras etapas. Por ejemplo, el paciente puede ser informado del riesgo aumentado de desarrollar una autoinmunidad secundaria a

continuación de una terapia de agotamiento de linfocitos, o de la falta de dicho riesgo, basando en su nivel de IL-21 o genotipo. Por lo tanto, el invento permitirá asesorar de manera individualizada acerca de los riesgos de la terapia antes de comprometerse con la terapia. El proveedor de cuidados de salud puede considerar unas opciones terapéuticas a la vista del riesgo de autoinmunidad secundaria y proporcionar una recomendación que incluye, por ejemplo, administrar un antagonista de IL-21, antes de, durante, o después de, una terapia de agotamiento de linfocitos, o seleccionar un régimen de tratamiento que no implique un agotamiento de linfocitos.

El proveedor de cuidados de salud puede considerar unos planes de gestión del riesgo para un paciente que ha elegido ser sometido a una terapia de agotamiento de linfocitos. Por ejemplo, el proveedor de cuidados de salud puede informar al paciente de una necesidad de vigilancia aumentada del desarrollo de una autoinmunidad secundaria después de una terapia de agotamiento de linfocitos a la vista de su riesgo aumentado de desarrollar una autoinmunidad secundaria. El proveedor de cuidados de salud puede recomendar también un apropiado régimen de vigilancia después de una terapia de agotamiento de linfocitos. Un régimen de vigilancia apropiado para pacientes en riesgo puede incluir, sin limitación, una vigilancia más frecuente de una autoinmunidad secundaria después de una terapia de agotamiento de linfocitos en un intervalo de, por ejemplo, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año. La vigilancia puede necesitar ser continuada durante un extenso período de tiempo, por ejemplo, durante más de un año, dos años, tres años, cuatro años, cinco años o más, puesto que algunos pacientes pueden no presentarse con autoinmunidad secundaria hasta bastante después de un año a continuación de una terapia de agotamiento de linfocitos. La vigilancia aumentada puede implicar también, por ejemplo un examen médico más a fondo (p.ej. más ensayos de sangre) por un especialista para descubrir cualesquiera signos de autoinmunidad secundaria. Además, a un personal farmacéutico o clínico que distribuye un fármaco de agotamiento de linfocitos a un paciente para tratar una MS se le puede requerir que asesore al paciente acerca del riesgo aumentado de desarrollar una autoinmunidad secundaria a continuación del uso del fármaco, en el caso de que el paciente tenga un nivel elevado de IL-21 y/o tenga los genotipos de IL-21 particulares que aquí se describen, que han sido asociados con un nivel elevado de IL-21 en suero. Al personal farmacéutico o clínico se le puede requerir obtener consentimiento informado del paciente antes de distribuir el fármaco a este paciente.

Pacientes de esclerosis múltiple

Los métodos y las composiciones de este invento se pueden examinar en el contexto de cualquier forma de MS, por ejemplo una MS en recaída-remisión, una MS progresiva primaria, y una MS progresiva secundaria. Son pacientes MS en el contexto de este invento los que han sido diagnosticados como que tienen una forma de MS mediante, por ejemplo, el historial de síntomas y el examen neurológico con la ayuda de un ensayos tales como representación en imágenes por resonancia magnética (RMI), gripes espinales, ensayos potenciales evocados y análisis en laboratorio de muestras de sangre.

Una esclerosis múltiple ("MS"), también conocida como esclerosis diseminada, es una condición autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario ataca al sistema nervioso central, conduciendo a una desmielinización (Compston y Coles, 2008). La MS destruye una capa grasa denominada la envoltura de mielina que se enrolla alrededor de fibras nerviosas y las aísla eléctricamente. Casi cualquier síntoma neurológico puede aparecer con la enfermedad y con frecuencia progresa hasta una discapacidad física y cognitiva (Compston y Coles, 2008). Una MS adopta varias formas. Nuevos síntomas pueden aparecer en ataques discretos (formas que recaen), o se pueden acumular lentamente en el transcurso del tiempo (formas progresivas) (Lublin y colaboradores, Neurology 46 (4), 907-11 (1996)). Entre ataques, los síntomas pueden desaparecer completamente (remisión), pero con frecuencia aparecen problemas neurológicos permanentes, especialmente cuando la enfermedad avanza (Lublin y colaboradores, 1996). Varios subtipos o patrones de progresión han sido descritos y son importantes para realizar un pronóstico así como tomar decisiones terapéuticas. En 1996 la United States National Sclerosis Society normalizó cuatro definiciones de subtipos; en recaída-remisión, progresivo secundario, progresivo primario, y que recae progresivamente (Lublin y colaboradores, 1996).

El subtipo en recaída-remisión se caracteriza por ataques agudos impredecibles, denominados exacerbaciones o recaídas, seguidos por unos periodos de meses hasta años de quietud relativa (remisión) sin nuevos signos de actividad de la enfermedad. Esto describe el curso inicial de la mayor parte de los individuos con MS (Lublin y colaboradores, 1996).

Una MS progresiva secundaria comienza con un curso en recaída-remisión pero evoluciona subsiguientemente en una progresiva declinación neurológica entre ataques agudos sin periodos definidos de remisión, incluso aunque pueden aparecer ocasionales recaídas y minoritarias remisiones (Lublin y colaboradores, 1996).

El subtipo progresivo primario está caracterizado por una progresión gradual pero constante de discapacidad sin ninguna remisión evidente después de que aparezcan sus síntomas de MS iniciales (Miller y colaboradores, Lancet Neurol 6 (10), 903-12 (2007)). Está caracterizado por la progresión de la discapacidad desde el comienzo sin ningunas, o solo ocasionales y minoritarias, remisiones y mejorías (Lublin y colaboradores, 1996). La edad del comienzo para el subtipo progresivo primario es usualmente posterior a otros subtipos (Miller y colaboradores, 2007).

Una MS que recae progresivamente está caracterizada por una declinación neurológica permanente con ataques agudos que pueden o no pueden ser seguidos por alguna recuperación. Éste es el menos corriente de todos los subtipos que se han descrito aquí más arriba (Lublin y colaboradores, 1996).

5 También se han descrito unos casos con comportamiento no normal algunas veces referidos como formas marginales de MS (Fontaine, Rev. Neurol. (Paris) 157 (8-9 Pt 2): 929-34 (2001)). Estas formas incluyen la enfermedad de Devic, la esclerosis concéntrica de Baló, la esclerosis difusa de Schilder y la esclerosis múltiple de Marburg (Capello y colaboradores, Neurol. Sci. 25 Suppl 4: S361-3 (2004); Hainfellner y colaboradores, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 55 (12): 1194-6(1992)).

Agotamiento de linfocitos en pacientes de esclerosis múltiple

10 Como se usa en el presente contexto, el "agotamiento de linfocitos" es un tipo de inmunosupresión por reducción de los linfocitos, p.ej. células T y/o células B, circulantes dando como resultado una linfopenia. Se observa un agotamiento prolongado de linfocitos cuando se usa, por ejemplo, un trasplante de médula ósea (BMT) autólogo o irradiación de linfoides total para tratar una esclerosis múltiple. Véase, p.ej., Cox y colaboradores, Eur. J. Immunol. 35, 3332-3342 (2005). Por ejemplo, un agotamiento de linfocitos se puede conseguir mediante un uso combinado de timoglobulina, de ciclofosfamida y de irradiación del cuerpo entero. Un agotamiento de linfocitos en pacientes de MS se puede conseguir también mediante un cierto número de tratamientos con fármacos. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD52 humanizado, CAMPATH-1H (alemtuzumab), se ha usado en una terapia de agotamiento de linfocitos para tratar a pacientes de MS. Se ha mostrado que una linfopenia inducida por CAMPATH-1H reduce eficazmente una inflamación del sistema nervioso central tanto clínica como radiológicamente (Coles y colaboradores, Ann. Neurol. 46, 296-304 (1999); Coles y colaboradores, 2008).

Se pueden usar también otros agentes en una terapia de agotamiento de linfocitos para tratar a pacientes de MS. Estos agentes pueden ser los que causan la muerte celular de linfocitos o inhiben las funciones de linfocitos. Ellos incluyen, sin limitación, (1) unos agentes que se dirigen a células portadoras de CD52, tales como agentes biológicamente similares al alemtuzumab, es decir distintos de anticuerpos anti-CD52 (p.ej. anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos) que se fijan al mismo epítipo o a uno diferente del de alemtuzumab o compiten con el alemtuzumab para fijarse a CD52, y polipéptidos CD52 solubles que compiten con CD52 de superficie de células para fijarse a uno o varios ligandos de CD52; (2) unas biomoléculas tales como péptidos, proteínas y anticuerpos (p.ej. anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos) que se dirigen a moléculas de superficie de células sobre linfocitos, tales como anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD20 (p.ej., rituximab), anticuerpos anti-TCR y anticuerpos anti-integrina (p.ej., natalizumab); (3) citotoxinas (p.ej., agentes que inducen apóptosis, ciclofosfamida, agentes alquilantes, e intercaladores de ADN) suministrados específica o no específicamente a linfocitos; y (4) porciones que se fijan a antígenos de los anticuerpos antes mencionados. Los anticuerpos pueden incluir, sin ninguna limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos bifuncionales, anticuerpos oligoclonales y anticuerpos policlonales.

El término "porción de fijación a antígenos" como se usa en el presente contexto, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de fijarse específicamente al mismo antígeno que el anticuerpo entero del que se deriva la porción. Ejemplos de "una porción que se fija a antígenos" incluyen, sin limitación, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, un scFv, y un diacuerpo. Los anticuerpos y las porciones de los mismos que se fijan a antígenos, útiles en este invento, se pueden producir por cualesquiera métodos bien conocidos en la especialidad técnica.

Cualquiera de las anteriores terapias de agotamiento de linfocitos puede causar una linfopenia, y en algunos pacientes, la linfopenia conduce a una autoinmunidad secundaria.

Autoinmunidad secundaria en pacientes de MS

Se hace referencia a una autoinmunidad en el presente caso como una "autoinmunidad secundaria" cuando ella surge subsiguientemente al comienzo de una primera enfermedad ("primaria"), por ejemplo una enfermedad autoinmunitaria "primaria". Una autoinmunidad secundaria surge algunas veces en pacientes de MS que tienen, o han tenido, una linfopenia a continuación p.ej. de una terapia de agotamiento de linfocitos. En algunos individuos, una autoinmunidad secundaria surge prontamente después de una terapia de agotamiento de linfocitos (p.ej. por tratamiento con alemtuzumab). En otros individuos, una autoinmunidad secundaria puede no surgir hasta varios meses o años después de una terapia de agotamiento de linfocitos; en algunos de esos individuos, en el momento en donde ellos desarrollan una inmunidad secundaria, puede haberse producido una recuperación sustancial de leucocitos (del cómputo total de linfocitos) de manera tal que ellos ya no sean linfopénicos.

55 Una autoinmunidad secundaria que surge en pacientes de MS linfopénicos puede ser cualquier tipo de condición autoinmunitaria distinta de una MS, incluyendo, pero sin limitarse a, autoinmunidad de tiroides (p.ej. la enfermedad de Graves), una trombocitopenia inmunitaria (ITP), la enfermedad de Goodpasture, una neutropenia autoinmunitaria,

una anemia hemolítica autoinmunitaria y una linfopenia autoinmunitaria. Las técnicas para diagnosticar y vigilar estas enfermedades autoinmunitarias son bien conocidas para los expertos en la especialidad técnica incluyendo la averiguación de síntomas en un examen médico tal como un análisis de sangre. El invento considera el uso de cualquiera de los métodos conocidos. Por ejemplo, los niveles de autoanticuerpos en un fluido corporal de un paciente (p.ej. sangre), se pueden determinar como un medio de detectar señales de autoinmunidad. Específicamente, se pueden medir anticuerpos anti-nucleares, anticuerpos anti-músculos lisos y anticuerpos anti-mitocondriales. En el caso de que se detecten anticuerpos anti-nucleares, se pueden realizar ensayos adicionales para medir anticuerpos anti ADN de doble hebra, anticuerpos anti-ribonucleoproteínas y anticuerpos anti-La. Se pueden medir anticuerpos de anti-peroxidasa tiroidea(TPO) y anticuerpos de receptores anti-hormona estimulante de tiroides (TSH) para detectar enfermedades autoinmunitarias de la tiroides; si se detectan anticuerpos anti-TPO o anticuerpos de receptores anti-TSH, se puede medir si está afectada la función de la tiroides midiendo los niveles de T3 libre, de T4 libre y de TSH. Los anticuerpos anti-plaquetas se pueden medir para detectar una trombocitopenia autoinmunitaria; y una medición de niveles de plaquetas en sangre puede servir para determinar si la presencia de anticuerpos anti-plaquetas está causando una reducción en el número de plaquetas.

15 **Medición de la IL-21**

En los métodos de este invento, la IL-21 se puede medir con un cierto número de técnicas. La IL-21 es un miembro de la familia de citocinas relacionadas con gamma-c, y tiene una potente actividad para inhibir la proliferación de células T y B y la citotoxicidad de células asesinas naturales (NK). La IL-21 es expresada principalmente por células T CD4+ activadas (p.ej. células Th17) y es importante en respuestas inmunitarias de células T cooperadoras de tipo I (Th1) (Weiss y colaboradores, Expert Opin Biol. Ther. 7, 1705-1721 (2007); Sivakumar y colaboradores, Immunology 112, 177-182 (2004)). El gen de IL-21 humana codifica un precursor de polipéptido de 162 residuos de aminoácidos y una proteína madura plenamente procesada de 133 residuos de aminoácidos (aproximadamente 15 kD); el gen está colocado sobre el cromosoma humano 4q26-27 (Sivakumar y colaboradores, 2004). Se ha encontrado el receptor para IL-21 (IL-21R) en células B periféricas quietas, células mononucleares de sangre periférica activadas y en el centro germinal de nodos linfáticos humanos (Marleau y colaboradores, J Leukocyte Biol. 78, 575-584 (2005)).

Unos métodos de medir la IL-21 son bien conocidos por los expertos en la especialidad técnica. De acuerdo con algunas formas de realización del presente invento, la medición del nivel de IL-21 se realiza en una muestra de fluido corporal (p.ej. sangre, plasma, orina, saliva, o fluido cerebroespinal) obtenida de un paciente. El nivel de IL-21 de la muestra es medido por cualquier ensayo apropiado para la detección de proteínas, que incluye, pero no se limita a, inmunoensayos tales como ensayos de inmunsorbente enlazados a enzimas (ELISA). Unos estuches comerciales para ELISA con el fin de medir IL-21 humana están disponibles, por ejemplo, de KOMABIOTECH (Seul, Corea), Bender MedSystems (Burlingame, CA), y eBioscience (San Diego, CA)..

Alternativamente, los niveles de transcritos de IL-21 en células productoras de IL-21 (p.ej. células Th17) obtenidas del paciente pueden ser medidos mediante análisis de borrón Northern y reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (Q-PCR). Unos métodos de aislar células Th17 son bien conocidos en la especialidad técnica, y el asilamiento se puede realizar usando unos estuches comercialmente disponibles, p.ej. estuches procedentes de Miltenyi Biotec (Auburn, CA), eBioscience (San Diego, CA). En algunas formas de realización, los niveles de IL-21 se miden por tinción de citocinas y citometría de flujo en donde un anticuerpo anti-IL-21 enlazado a un residuo detectable se usa para detectar el nivel intracelular de IL-21 en células productoras de IL-21 procedentes del paciente. La IL-21 se puede medir también en términos de actividad en un ensayo biológico, p.ej. midiendo respuestas proliferativas de células T a una combinación de IL-21 e IL-15 usando, p.ej., CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) (Zeng y colaboradores, Curr. Protoc. Immunol. 78:6.30.1-6.30.8 (2007)). Otro método de medir IL-21 está basado en la fosforilación de Stat3 con tirosina inducida por IL-21 en células T CD8(+) esplénicas usando un análisis basado en una citometría de flujo (Zeng y colaboradores, 2007). Los expertos en la especialidad técnica apreciarán con facilidad otros medios apropiados para medir la IL-21.

En los métodos de este invento, el valor (o índice) de referencia para determinar si un paciente tiene una IL-21 elevada (anormalmente alta) es el valor de IL-21 de un individuo testigo, o el valor medio de IL-21 de un grupo de individuos testigos, obtenido usando el mismo ensayo que se realiza en el mismo momento o en uno diferente. El individuo testigo es un individuo normal o sano, que, en este contexto, es un individuo sin ninguna condición inflamatoria conocida en curso, que incluye, incluyendo sin ninguna enfermedad autoinmunitaria (sin ningún síntoma detectable de una enfermedad autoinmunitaria). En algunas formas de realización, los individuos testigos no son linfopénicos. Un aumento del nivel de IL-21 en aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 100 %, un múltiplo de dos, un múltiplo de tres, un múltiplo de cuatro, un múltiplo de cinco, un múltiplo de diez, un múltiplo de veinte, un múltiplo de treinta, un múltiplo de cuarenta, un múltiplo de cincuenta, un múltiplo de cien o más se puede considerar como un aumento significativo. Ciertos análisis estadísticos se pueden aplicar para determinar si el nivel de IL-21 en una muestra de ensayo es significativamente diferente del nivel testigo. Dichos análisis estadísticos son bien conocidos por los expertos en la especialidad técnica y pueden incluir, sin ninguna limitación, ensayos paramétricos (p.ej. el ensayo t de Student de dos colas) o no paramétricos (p.ej., el ensayo U de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Detectar genotipos de SNP de IL-21

En algunos métodos de este invento, una genotipificación se usa para producir si un paciente es propenso a tener, (es decir está en riesgo de tener o es probable de que tenga) una IL-21 elevada y por lo tanto está en riesgo de desarrollar una autoinmunidad secundaria mientras que tiene una linfopenia. La "genotipificación" se refiere al proceso de determinar el genotipo de un individuo mediante el uso de ensayos biológicos. Unos métodos de genotipificar son bien conocidos por los expertos en la especialidad técnica, e incluyen, sin ninguna limitación, una PCR, una secuenciación de ADN, sondas oligo específicas para alelos (ASO) e hibridación a micromatrices o perlas de ADN. La genotipificación puede ser parcial, es decir que se determina solamente una pequeña fracción del genotipo de un individuo. En el contexto de este invento, sólo se necesita detectar ciertos SNPs. Un SNP es una variación de secuencias de ADN que se produce cuando un único nucleótido – A, T, C o G - en una correspondiente porción del genoma difiere entre miembros de una especie o entre cromosomas emparejados de un individuo. Unos conocidos SNPs humanos son números asignados de identificación de SNP de referencia (refSNP o rs) en el archivo de dominio público Single Nucleotide Polimorphism Database (dbSNP) alojado en el National Center for Biotechnology Information (NCBI)..

Los autores del presente invento han descubierto que los genotipos de SNP minoritarios de rs13151961 A/A, rs6822844 G/G y rs6840978 C/C están asociados con niveles significativamente más altos de IL-21 en suero en comparación con individuos que no tienen estos genotipos. Unos pacientes de MS que tienen uno o más de estos fenotipos de SNP tienen, por lo tanto, una susceptibilidad aumentada a desarrollar una autoinmunidad secundaria después de un agotamiento de linfocitos, en comparación con pacientes de MS que no tienen estos genotipos

Cronología de obtención de información acerca de IL-21

La obtención de información acerca de IL-21 (niveles de IL-21 o genotipos de SNP relacionados con IL-21) de un paciente de MS es útil para seleccionar regímenes de tratamiento y de vigilancia después de tratamiento para el paciente. Cuando la información se obtiene antes de una terapia de MS, el paciente puede ser informado del riesgo relativo de desarrollar una autoinmunidad secundaria a continuación de una terapia de agotamiento de linfocitos y se pueden tomar decisiones de tratamiento de un modo correspondiente. El paciente también puede ser informado de una necesidad de vigilancia aumentada post-tratamiento, p.ej. un examen más frecuente y más a fondo realizado por un especialista, si él es clasificado como "que está en riesgo". Por lo tanto la información de IL-21 mejora la gestión del riesgo (por médicos, farmacéuticos y pacientes) en un tratamiento de MS.

La obtención de información acerca de IL-21 durante o después de un tratamiento de MS también será útil para vigilar el desarrollo y el tratamiento de autoinmunidad secundaria. Como se ha señalado más arriba y se describirá adicionalmente más abajo, hemos descubierto que a continuación de una terapia de agotamiento de linfocitos, los pacientes de MS que pasan a desarrollar autoinmunidad secundaria tienen un aumento mucho más grande en su IL-21 en suero, en comparación con pacientes de MS que no desarrollan autoinmunidad secundaria. El último grupo de pacientes de MS produce solo ligeramente más cantidad de IL-21 a continuación de un agotamiento de linfocitos. Por lo tanto, midiendo la producción de IL-21 después de un tratamiento de agotamiento de linfocitos, se puede también predecir el riesgo de una autoinmunidad secundaria, que puede no aparecer hasta varios meses o años después del tratamiento.

Tratamiento de una autoinmunidad secundaria

Una enfermedad de autoinmunidad secundaria que surge en pacientes de MS puede ser tratada basándose en el tipo de la enfermedad. En algunas formas de realización del presente invento, la autoinmunidad secundaria puede ser tratada usando una dosis efectiva de un antagonista de IL-21. Un antagonista de IL-21 puede ser un agente terapéutico que inhibe la actividad de IL-21, p.ej. un agente que inhibe la interacción entre IL-21 e IL-21R. Una "dosis efectiva" se refiere a la cantidad de un agente inhibidor que es suficiente para inhibir la actividad de IL-21 en un paciente de manera tal que sean aliviados o prevenidos los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria secundaria. Unos antagonistas de IL-21 pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos para IL-21 o IL-21R humana/o o proteínas de IL-21R solubles. Véanse p.ej. la patente de los EE.UU. N° 7.410.780 y la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. N° 20080241098. Unas composiciones farmacéuticas que contienen un antagonista de IL-21 se pueden producir de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la especialidad técnica. Unas composiciones farmacéuticas que contienen antagonistas de IL-21 se pueden administrar a un paciente usando un método apropiado conocido en la especialidad técnica, p.ej. por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Estuches para tratar y ensayar a pacientes de MS

La presente divulgación proporciona unos estuches para tratar una esclerosis múltiple. Un estuche de esta divulgación puede contener, entre otras cosas, un fármaco agotador de linfocitos (p.ej. alemtuzumab) y unas instrucciones escritas para informar a un paciente o a un proveedor de cuidados de salud de contraindicaciones del

5 fármaco, por ejemplo el potencial de un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un tratamiento con el fármaco. El riesgo aumentado puede ser asociado con o indicado por (i) una IL-21 elevada, o (ii) la presencia de uno o más genotipos de polimorfismos de nucleótidos (SNPs) seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978.

10 En otras formas de realización, la divulgación proporciona unos estuches para detectar la IL-21 en suero en un paciente de MS y/o para identificar pacientes de MS en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un agotamiento de linfocitos. Dichos estuches pueden comprender un anticuerpo anti-IL-21 o una porción del mismo que se fija a antígenos, o un receptor de IL-21 soluble, y opcionalmente unas instrucciones que dirigen a un usuario a sacar una muestra de sangre de un paciente, y opcionalmente uno o más reactivos para detectar la fijación del anticuerpo, de la porción, o del receptor de IL-21 soluble a IL-21 en la muestra de sangre procedente del paciente de MS. Dichos estuches habrán sido validados o aprobados por una autoridad reguladora apropiada para realizar diagnósticos médicos en pacientes, tales como pacientes de MS.

15 Todavía otras formas de realización, la divulgación proporciona unos estuches para identificar a un paciente de MS que está en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un agotamiento de linfocitos. Los estuches pueden comprender uno o más reactivos apropiados para identificar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de SNP tomados del conjunto que se compone de: SNP rs13151961, de SNP rs6822844 y de SNP rs6840978, en una muestra obtenida de un paciente de MS y unas instrucciones que dirigen a un usuario a sacar una muestra de un paciente de MS.

Averiguar la sensibilidad de células T a un tratamiento de MS

25 Esta divulgación proporciona métodos para averiguar la sensibilidad de células T a un tratamiento con una terapia de agotamiento de linfocitos en un paciente de MS. Los métodos implican medir la caspasa-3 en células T obtenidas del paciente después del tratamiento. Un aumento en la caspasa-3 (p.ej. la proteína caspasa-3, un transcrito de ARN y/o los niveles de actividad) en las células T en comparación con las células T procedentes de un paciente de MS que no está recibiendo el tratamiento, indica que las células T en el paciente tratado han respondido al tratamiento. Estos métodos están basados en nuestro descubrimiento de que las células T procedentes de personas con MS sin tratar son resistentes a la apoptosis y que esta resistencia está asociada con una infraexpresión de caspasa-3. Sin embargo, después de una terapia de agotamiento de linfocitos la expresión de caspasa-3 es aumentada significativamente en células T, alcanzando niveles observados en personas sanas.

35 Las técnicas de medir la caspasa-3 en células T son bien conocidas en la especialidad técnica. Por ejemplo se pueden obtener extractos celulares a partir de células T usando técnicas bien conocidas en la especialidad técnica, y medir los niveles de la proteína caspasa-3, mediante p.ej. un ELISA. Unos estuches para ELISA comerciales para medir caspasa-3 humana están disponibles de, p.ej., Bender MedSystems (Burlingame, CA), EMD Chemicals, Inc. (San Diego, CA), y R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). Alternativamente los niveles de transcritos de caspasa-3 pueden ser medidos en células T mediante, por ejemplo, un análisis de borrón Northern o una PCR cuantitativa. La caspasa-3 puede también ser medida en términos de actividad en un ensayo biológico, p.ej. midiendo su actividad de proteasa. Los estuches comerciales para medir la actividad de caspasa-3 están disponibles de, p.ej. Roche Applied Science (Indianapolis, IN) e Invitrogen (Carlsbad, CA).

40 A menos que se defina otra cosa distinta, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente contexto tienen el mismo significado que es entendido corrientemente por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad técnica a la que pertenece este invento. Métodos y materiales ejemplificadores se describen seguidamente, aunque también se pueden usar en la práctica de ensayar del presente invento métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente caso. En el caso de un conflicto, la presente memoria descriptiva incluyendo las definiciones controlará. Aunque se cita en el presente caso un cierto número de documentos esta citación no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forme parte del conocimiento general corriente en la especialidad técnica. A lo largo de esta memoria descriptiva y las formas de realización la palabra "comprende," o variaciones tales como "comprenden" o "comprender" serán útiles para implicar la inclusión de un número entero especificado o de un grupo de números enteros especificado pero no la inclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. Los materiales, los métodos y los ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Se entiende que los siguientes ejemplos ilustran los métodos y los materiales del presente invento.

EJEMPLOS

55 En los siguientes ejemplos, todos los pacientes tienen una esclerosis múltiple en recaída-remisión y fueron participantes en una de dos pruebas clínicas: CAMMS-223 y CAMMS-224 (REC 02/315 y 03/078) en las que el

alemtuzumab se administró por infusión intravenosa de 12-24 mg/día durante cinco días, seguido por un tratamiento renovado a los 12 meses. Los pacientes y los testigos consintieron una venodisección con fines de investigación (LREC 02/263) y todos ellos estaban libres de exposición a otros agentes modificadores de la enfermedad, incluyendo esteroides, durante por lo menos un mes en el momento de sacar muestras de sangre.

5 Los datos de proliferación y apoptosis de linfocitos fueron generados por un estudio de la sección transversal de células *ex vivo* frescas procedentes de 65 pacientes y 21 testigos sanos (7 varones, edad media 34 años). Estas hipótesis generadas acerca del ciclo de células T en la patogénesis de una autoinmunidad secundaria, que fueron ensayadas en muestras disponibles a los nueve meses después de un tratamiento con alemtuzumab, que fue escogido en el momento más temprano en el que una apoptosis de células T podría ser analizada robustamente. De las 29 muestras disponibles en este momento, 10 de ellas cumplen nuestra definición del estudio de autoinmunidad (1 varón, edad media 36 años) en comparación con 10 que carecen de autoinmunidad (3 varones, edad media 38 años).

10 La autoinmunidad fue definida como el desarrollo de una nueva enfermedad autoinmunitaria (con o sin autoanticuerpos), o títulos significativos persistentes de autoanticuerpos (presentes en al menos dos ocasiones con una separación de tres meses) sin enfermedad clínica. Una "falta de autoinmunidad" fue definida como la ausencia de una enfermedad autoinmunitaria y de autoanticuerpos durante por lo menos 18 meses después del tratamiento con alemtuzumab en este estudio. De los diez pacientes con autoinmunidad, solamente tres tenían autoanticuerpos (anticuerpos antinucleares). Seguidamente se midió en serie la IL-21 en suero en: 15 pacientes seleccionados aleatoriamente con autoinmunidad – cinco de los cuales habían sido estudiados como más arriba (tres varones, edad media 34 años; doce con autoinmunidad de tiroides, uno con la enfermedad de Goodpasture, una con ITP, y solamente uno con anticuerpos antinucleares), y quince pacientes seleccionados aleatoriamente sin autoinmunidad - seis de los cuales habían sido estudiados como más arriba (cinco varones, edad media 31 años) y diecinueve testigos sanos (siete varones, edad media 33 años).

25 73 individuos fueron estudiados para análisis genéticos, de éstos 23 cumplen la definición de "falta de autoinmunidad" y 27 tenían una autoinmunidad secundaria después del tratamiento con alemtuzumab (solamente seis con autoanticuerpos, cuatro con anticuerpos antinucleares y dos con anticuerpos anti-músculos lisos; dieciocho con autoinmunidad de tiroides, dos con ITP y uno con la enfermedad de Goodpasture). Los 23 individuos remanentes no pudieron ser clasificados en categorías sobre la base de la producción transitoria de autoanticuerpos y/o de un tiempo insuficiente desde el tratamiento con alemtuzumab.

30 Para todos los análisis estadísticos descritos en los siguientes ejemplos, los datos fueron analizados usando el SPSS 12.0.1 para Windows. Después de la averiguación de la normalidad se realizaron ensayos paramétricos (ensayo t de Student) o no paramétricos (Wilcoxon-Mann-Whitney). Los valores de p son señalados a lo largo del texto en donde un valor de $p < 0,05$ era considerado como estadísticamente significativo, modificado por una corrección de Bonferroni cuando se indicaba.

35 **Ejemplo 1: El alemtuzumab induce una linfopenia de células T**

Una única dosis de alemtuzumab dio como resultado el agotamiento de linfocitos T CD4+ y CD8+ respectivamente en 5,6 % y 6,8 % respectivamente de los valores de línea de base en el mes 1, y 30,3 % y 40,8 % respectivamente en el mes 12 (datos no mostrados).

40 **Ejemplo 2: Las células T procedentes de pacientes con esclerosis múltiple no tratada son resistentes a la muerte celular**

Para los diversos ensayos realizados en este Ejemplo se usaron diferentes muestras en sección transversal y longitudinales de acuerdo con la disponibilidad. Como un preludio para medir el ciclo de células de linfocitos después del tratamiento con alemtuzumab, nosotros examinamos la respuesta proliferativa de células T, no estimuladas o en cultivo con proteína básica de mielina (MBP) o el receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHr), entre pacientes de esclerosis múltiple no tratados y testigos normales (FIGS. 1A y 1B).

A. Cultivos de células mononucleares periféricas

50 Unas células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron a partir de una sangre heparinizada por centrifugación en un gradiente de densidades Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech). Las PBMCs se suspendieron inmediatamente en un medio de cultivo (RPMI) que contenía 1 % de penicilina, 1 % de estreptomina y 10 % de suero de ternero fetal (Sigma S5394) y se ajustaron a una concentración de células viables de 10^6 /ml (determinada por exclusión de azul trypan). Para inducir una muerte celular pasiva, las PBMCs se incubaron durante 72 horas en medios a solas sin factores de crecimiento adicionales. Una apoptosis mediada por Fas fue inducida cultivando las PBMCs durante 48 horas con anti-CD28 soluble (1µg/ml: donados amablemente por M. Frewin, Universidad de Oxford) en placas previamente revestidas con mAb anti-CD3 (1µg/ml - BD Pharmingen), seguida por

una incubación durante 18 horas con Fas anti-humano activador (clon CH11, 1 µg/ml - Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

B. Detección de apoptosis

5 Unas células T apoptóticas se detectaron tiñendo células con anticuerpos monoclonales anti-humanos de ratón conjugados con alofocianina CD3 (Serotec MCA463APC), CD4 (Serotec MCA1267APC) y CD8 (Serotec MCA1226APC), anexina-V conjugada con FITC y yoduro de propidio (BD Pharmingen). La fluorescencia fue detectada por citometría de flujo (FACSCALIBUR: Becton Dickinson, Mountain View, CA). Basándose en el derrame hacia delante y lateral, se trazó una ventana ancha de linfocitos que incluía linfocitos vivos y apoptóticos (que tenían FSc reducidos y SSc aumentados). Al menos 15.000 sucesos situados dentro de la puerta se recogieron y
10 analizaron usando el programa lógico WinMDI 2.8. Las células apoptóticas tempranas se definieron como anexina V⁺PI⁻ y las células apoptóticas o necróticas tardías se definieron como anexina V⁺PI⁺ (Aubry y colaboradores, Cytometry 37, 197-204 (1999)). La muerte celular apoptótica fue definida como la muerte celular total (anexina V⁺PI⁺ más anexina V⁺PI⁻) bloqueada por inhibición con pan-caspasa con Q-VD-OPh (RnD Systems OPH001).

C. Ensayos de proliferación

15 Unas PBMCs fueron cargadas con el tinte para seguimiento de la división celular, CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína) (Lyons y colaboradores Methods Cell Biol. 63, 375-398 (2001)) y se cultivaron con 50 µg/ml de la proteína básica de mielina (MBP: RDI-TRK8M79/LYO) o 1 µg/ml del dominio extracelular de receptores de la hormona estimulante de tiroides unido a una proteína de fijación a matriz (TSHr: donada amablemente por M. Ludgate, Universidad de Cardiff). Después de teñir con CFSE durante 10 días en células,
20 identificadas por marcadores de superficie específicos (CD4, CD8), se analizó por citometría de flujo. La frecuencia de precursores (definida como proporción de linfocitos que dejan que la población parental se someta a por lo menos dos divisiones celulares) y el índice de proliferación (definido como la suma de las células en todas las generaciones dividida por el número calculado de células parentales) se calcularon usando Modfit LT 3.0 (Verity Software). El número absoluto de células supervivientes se midió por comparación con un número fijo de perlas inertes (BD CALIBRITE, BD Biosciences), incluidas en cultivos.
25

D. Resultados

No hubo diferencia en la respuesta proliferativa de células T no estimuladas o en cultivo con la proteína básica de mielina (MBP) o el receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHr), entre pacientes de esclerosis múltiple no
30 tratados y testigos normales (FIGS. 1A y 1B). Inversamente, la supervivencia de células T procedentes de pacientes de esclerosis múltiple no tratados era ≥ 4 veces mayor que la de los testigos ($p < 0,005$; FIG. 1C), sugiriendo que una muerte reducida de células T es una característica de una esclerosis múltiple no tratada. Hemos confirmado esto demostrando que las células T procedentes de pacientes no tratados son resistentes a una apoptosis tanto pasiva como mediada por Fas comparada con testigos sanos (pasiva: 0,3 % frente a 6,7 %, $p = 0,0016$; y mediada por Fas: 2,9 % frente a 15,5 %, $p = 0,0018$; FIGS. 1E y 1F).

Ejemplo 3: Las células T que se regeneran después de un tratamiento con alemtuzumab son altamente proliferativas, y se inclinan hacia autorreactividad y son susceptibles de apoptosis

Usando los ensayos descritos en el Ejemplo 2, hemos encontrado que después del tratamiento con alemtuzumab, la proporción de células T que responden a auto-antígenos (frecuencia de precursores) y el grado de proliferación (índice de proliferación) aumentaron significativamente en comparación con pacientes no tratados y testigos sanos.
40 Por ejemplo en el mes 3, la proliferación de células T no estimuladas era $> 6,5$, la de pacientes no tratados y la proliferación como respuesta a una estimulación con MBP y TSHr aumentó en 900 % y 700 % respectivamente (todos $p < 0,01$: FIGS. 1A y 1B). La apoptosis de células T aumentó también significativamente después del tratamiento con alemtuzumab. Como respuesta a una estimulación antigénica, la proporción de células T que se sometían a apoptosis a los seis meses era 10 veces mayor que en la línea de base (FIG. 1D; $p < 0,001$ para todos los antígenos) dando como resultado menos células T viables al final del cultivo (FIG. 1C). Las apoptosis pasivas y
45 mediadas por Fas aumentaron también después del tratamiento con alemtuzumab, con unas tasas por lo menos dobles de las observadas en el grupo testigo sano (pasivas: 24,5 %, 22,2 % y 17,9 % a los 6, 9 y 12 meses, respectivamente, comparadas con 6,7 % en testigos, todo $p < 0,001$; mediadas por Fas 37,8 %, 35,8 % y 29,9 % a los 6, 9 y 12 meses, respectivamente, comparadas con 15,5 % en testigos, todos $p < 0,01$; FIGS. 1E y 1F). Una apoptosis de linfocitos aumentada después del tratamiento con alemtuzumab se observó en ambas subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (FIGS. 1G y 1H) y persistió durante por lo menos 18 meses después de un tratamiento con alemtuzumab (datos no mostrados).
50

Ejemplo 4: Las células T procedentes de pacientes de esclerosis múltiple no tratados infraexpresan caspasa 3**A. Análisis de ARNm**

5 Los PBMCs, inmediatamente *ex-vivo* o de cultivo con MBP o estimulación policlonal fueron separadas positivamente usando 20 µl de perlas magnéticas (Miltenyi Biotec; Microbeads CD19, Microbeads CD3, Microbeads CD14) por 1×10^7 células cargadas dentro de una columna MACS® LS. Las células retenidas magnéticamente fueron eluidas, lavadas y almacenadas en RNA^{later}™ a -70°C (pureza celular consistentemente de 95-98 %, datos no mostrados).

10 La expresión de Fas, FasL, Bcl-2, Bcl-XI, Bad, Bax, Bid, Bim, Survivin, c-FLIP y Caspasa 3, 8 y 9 se determinó mediante una RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) semicuantitativa. El ARNm fue extraído a partir de células almacenadas en RNA^{later}™ usando el estuche RNEASY Mini Kit (QIAGEN) y transcrito inversamente a ADNc usando el estuche PRO-STAR First Strand RT-PCR Kit (Stratagene). Los cebadores y las sondas de PCR se diseñaron usando el PRIMER EXPRESS (PE Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y se adquirieron de Oswel DNA service. La información de secuencias de ARNm se obtuvo de GenBank. Una PCR

15 cuantitativa en tiempo real se realizó en un sistema ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Perkin Elmer) usando una mezcla patrón PCR Mastermix containing ROX (Eurogentec RT-QP2X-03). Las secuencias de los cebadores y de las sondas eran 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), JOE sonda marcada con 5'-CGG CAC CTG CAC ACC TGG ATC-3' (SEQ ID NO:3); Bcl-XI para 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), FAM sonda marcada con 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 con 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 con 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 con FAM 5'-TCA AGG ACC ACC GCA TCT CTA CAT T-3' (SEQ ID NO:15); c-FLIP para 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 con FAM 5'-CTG CCA TCA GCA CTC TAT AGT CCG AAA CAA -3' (SEQ ID NO:18); Caspasa 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 con JOE 5'-CTC CCT ACA GGG TCA TGC TCT ATC AGA TTT CAG -3' (SEQ ID NO:21); Caspasa 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 con FAM 5'-CTG GAA TAT CCC TGG ACA ACA GTT ATA AA -3' (SEQ ID NO:24); Caspasa 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 con 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 con 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 con 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 con JOE 5'-AGC CCT GGC ATG TCA ACA GCG TTC -3' (SEQ ID NO:36) y 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 con FAM 5'-TAG CCA CAG CCA CCT CTC TCC CT-3' (SEQ ID NO:39).

B. Resultados

45 La expresión de ARNm de células T de caspasa 3, el efector caspasa común a ambas rutas apoptóticas a partir de pacientes de esclerosis múltiple era reducida en comparación con los testigos; esto era significativo para PBMCs no estimuladas y estimuladas con MBP (por 78 % y 87 % respectivamente, en ambos casos $p < 0,05$, después de una corrección por comparaciones múltiples) pero no para cultivos estimulados policlonalmente (FIG. 2A). Una tendencia similar se observó en células CD 14+ (pero no en células CD 19+) aunque esta diferencia no sobrevive a una corrección por comparaciones múltiples (FIG. 2B). Después del tratamiento con alemtuzumab, la expresión de caspasa 3 aumentó significativamente en células T y monocitos, alcanzando unos niveles que se observan en testigos sanos ($p < 0,05$; FIGS. 2A y 2B). La expresión de todos los otros genes ensayados (enumerada en la parte de métodos) estaba inalterada después del tratamiento con alemtuzumab.

55 Por lo tanto, nuestros estudios muestran que unas células T procedentes de personas con esclerosis múltiple no tratadas son resistentes a la apoptosis, y esta resistencia está asociada con la infraexpresión de caspasa 3. De modo consistente con la posición de este efector caspasa en el punto de convergencia de las rutas apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, hemos demostrado resistencia de las células T a una apoptosis tanto mediada por Fas como pasiva en nuestros pacientes. La infraexpresión de caspasa-3 ha sido descrita en algunas enfermedades autoinmunitarias, incluyendo la diabetes del tipo I (Vendrame y colaboradores, Eur J Endocrinol 152, 119-125

(2005)), la tiroiditis de Hashimoto y el síndrome poliendocrino autoinmunitario - 2 (Vendrame y colaboradores, J Clin Endocrinol Metabjc (2006)). Esto, sin embargo, es un nuevo hallazgo en esclerosis múltiple.

Ejemplo 5: Una autoinmunidad secundaria después del tratamiento con alemtuzumab está asociada con una excesiva apoptosis de células T

5 Habiendo demostrado una proliferación de linfocitos y una apoptosis aumentadas como una respuesta genérica a un tratamiento, hemos ensayado la relación entre una apoptosis de células T y el desarrollo de una autoinmunidad después del tratamiento con alemtuzumab, definida como el desarrollo de una nueva enfermedad autoinmunitaria y/o de autoanticuerpos persistentes por encima de la región normal, después del tratamiento con alemtuzumab, mantenida durante por lo menos tres meses. Usando esta definición, las células T derivadas de pacientes con autoinmunidad (n = 10) mostraron unos niveles significativamente más altos de muerte celular apoptótica en todas las condiciones de cultivo a los 9 meses después del tratamiento, cuando se comparaban con células T procedentes de pacientes no autoinmunes (n = 10) estudiados en el mismo momento (no estimulados 4,7 % frente a 14,4 %, mediados por Fas 18,2 % frente a 32,1 %, MBP 7,6 % frente a 17,6 %, y TSHr 9,5 % frente a 25,5 %, $p < 0,01$ para todas las comparaciones; FIG. 3). Si se aplicaba una definición de autoinmunidad más estricta, siendo ésta el desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria excluyendo la producción de anticuerpos no patógenos, permaneció la diferencia, a pesar de reducir a 7 el número en el grupo autoinmune (no estimulados, 4,7 % frente a 15,4 %; mediados por Fas, 18,2 % frente a 31,7 %; MBP, 7,6 % frente a 20,2 %; TSHr, 9,5 % frente a 13,4 %; $P < 0,02$ para todas las comparaciones).

20 No hubo diferencia en la tasa de reconstitución de células T entre los dos grupos (p.ej., a los 6 meses, los cálculos de CD4 son $0,15 \times 10^9/l$ frente a $0,19 \times 10^9/l$; y los cálculos de CD8 son de $0,11 \times 10^9/l$ frente a $0,11 \times 10^9/l$, en los que tenían y carecían de autoinmunidad respectivamente) sugiriendo un ciclado de células T aumentado en el grupo autoinmune (datos no mostrados).

Ejemplo 6: La IL-21 induce la proliferación y la apoptosis de células T

A. Ensayos y entresacado de IL-21

25 La IL-21 en suero se midió usando el estuche EBIO SCIENCE (88-7216-86) como dicen las instrucciones. Las placas fueron leídas usando un lector de microplacas (modelo 680, BioRad) a 450 nm. Las PBMCs no estimuladas y estimuladas policlonalmente (1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 fijado a una placa y 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD28 soluble) se entresacaron con 5 pg/ml y 20 pg/ml de rhIL-21 (EBIO SCIENCE 14-8219). La apoptosis y la proliferación de CD4+ y CD8+ se evaluaron como más arriba se ha descrito.

30 **B. Resultados**

Hemos ensayado el efecto de una IL-21 exógena sobre la apoptosis y la proliferación de células T humanas *in vitro*. El entresacado de PBMCs a partir de testigos sanos con rhIL-21 condujo a un aumento en la muerte apoptótica de células T CD4+ (FIG. 4A) y CD8+ (FIG. 4B) no estimuladas y estimuladas policlonalmente de una manera dependiente de la dosis ($p < 0,05$ para todas las condiciones). El entresacado de células no estimuladas con rhIL-21 condujo a un aumento pequeño pero significativo en la proliferación de células T tanto CD4+ como CD8+; con un aumento tanto en el índice de proliferación (CD4+ y CD8+: 1,07 frente a 1,25, $p = 0,017$; y 1,09 frente a 1,32, $p = 0,017$ respectivamente; FIG. 5A) como en la frecuencia de precursores (CD4+ 0,007 frente a 0,014, $p = 0,016$; CD8+ 0,007 frente a 0,015, $p = 0,026$; FIG. 5C). La IL-21 no afecta a la proporción de células T CD4+ y CD8+ que proliferan como respuesta a una estimulación policlonal (FIG. 5D), sugiriendo que ellas ya habían sido estimuladas de manera máxima. La IL-21, sin embargo, conduce a un aumento significativo en la extensión de la proliferación de células CD8+ (índice de proliferación 11,59 frente a 19,39, $p = 0,012$; FIG. 5B).

Ejemplo 7: La IL-21 predice el desarrollo de una autoinmunidad secundaria después del tratamiento con alemtuzumab

45 En todos los momentos en el Ejemplo 6, la concentración de IL-21 en suero era significativamente mayor en pacientes que desarrollaban una autoinmunidad secundaria, en comparación con el grupo no autoinmune (para todas las comparaciones $p < 0,05$; FIG. 6A). Hemos examinado todas las muestras de suero de tratamiento previo procedentes de 84 pacientes que subsiguientemente iban a recibir alemtuzumab. Después de por lo menos dos años de seguimiento con estos pacientes los hemos clasificados en categorías como estando en el grupo "autoinmune" (n = 35: 32 pacientes con enfermedades de tiroides, uno con ITP, uno con la enfermedad de Goodpasture, y uno con Alopecia) o un grupo "no-autoinmune" (n = 49: pacientes que no contienen anticuerpos o solo los contienen transitoriamente (de manera no sostenida a lo largo de seis meses)). Estos sueros de tratamiento de tratamiento previo tenían una concentración media de IL-21 estadísticamente mayor que los testigos; sin embargo, esto era enteramente justificado por altos niveles de IL-21 en los pacientes que iban a desarrollar autoinmunidad secundaria. Había una diferencia altamente significativa en los niveles medios de IL-21 en

tratamiento previo, entre los que iban a desarrollar autoinmunidad (464 pg/ml) y los que no iban (229 pg/ml; $p=0,0002$) (FIG. 6B).

La asociación entre linfopenia inducida y autoinmunidad ha sido observada en modelos con animales. En condiciones linfopénicas, las remanentes células T son sometidas a una extensa expansión compensatoria con el fin de reconstituir al sistema inmunitario. Este proceso, denominado proliferación homeostática, recurre a una estimulación a través del complejo TCR-auto-péptido-MHC (Ge y colaboradores, P.N.A.S. 101, 3041-3046 (2004); Ge y colaboradores, P.N.A.S. 98, 1728-1733 (2001); Kassiotis y colaboradores, J Exp. Med. 197, 1007-1016 (2003)) y da como resultado una población inclinada hacia el reconocimiento aumentado de un auto-antígeno, como se observa en nuestros estudios. Además, unas células T que se expanden rápidamente adquirieron el fenotipo y las características funcionales de células con memoria incluyendo: una dependencia reducida de una estimulación concomitante, la capacidad de responder a dosis más bajas de un antígeno que las células ingenuas, y la secreción rápida de citocinas inflamatorias al realizar una reestimulación, promoviendo de esta manera adicionalmente la degradación de la autotolerancia (Cho y colaboradores, JExp. Med. 192, 549-556 (2000); Goldrath y colaboradores J Exp. Med. 192, 557-564 (2000); Murali-Krishna y colaboradores, J Immunol 165, 1733-1737 (2000); Wu y colaboradores, Nat Med. 10, 87-92 (2004)). Sin embargo, a pesar de estos cambios, la autoinmunidad no es una consecuencia inevitable de una linfopenia. Desde luego, como con nuestros pacientes la mayor parte de los individuos linfopénicos no desarrollan autoinmunidad, sugiriendo que se requieren "co-factores" adicionales.

Hemos demostrado aquí por primera vez en seres humanos que la superproducción de IL-21 es el "segundo acierto" requerido en el desarrollo de autoinmunidad secundaria a continuación de un tratamiento por lo demás exitoso de la esclerosis múltiple con un agente de agotamiento de linfocitos tal como alemtuzumab. Nuestros estudios muestran que una autoinmunidad surge en pacientes agotados o en linfocitos, siendo impulsada una mayor apoptosis de células T y un mayor ciclo de células por niveles más altos influenciados genéticamente de IL-21 que son detectables incluso antes del tratamiento. Incluso antes del tratamiento, los pacientes que iban a desarrollar una autoinmunidad secundaria tenían niveles de la IL-21 en suero mayores en más de 2 veces que el grupo no autoinmune, sugiriendo que la IL-21 en suero puede servir como un biomarcador para el riesgo de desarrollar autoinmunidad durante meses hasta años después de un tratamiento con alemtuzumab. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, creemos que impulsando a un exceso a los ciclos de expansión y la muerte de células T, la IL-21 aumenta la probabilidad de generar células T auto-reactivas y por lo tanto de una autoinmunidad. Por lo tanto un ciclo anormal de células T inducido por citocinas es un principio general de autoinmunidad asociada con linfopenia.

Ejemplos 8: El genotipo de IL-21 influye sobre la expresión de IL-21 y se asocia con una autoinmunidad

A. Genotipificar la IL-21

En total se ensayaron en el cromosoma 4q27 cuatro SNPs, rs13151961, rs6822844, rs4833837 y rs6840978, que se sitúan en una región de fuerte desequilibrio de enlace, que contiene cuatro genes, *KIAA1109-ADAD1-IL2-IL21*. La totalidad de los cuatro SNPs estaban disponibles como productos Assay-On-Demand (AoD = de ensayo a demanda) de Applied Biosystems. La genotipificación de los SNPs se realizó usando la metodología TaqMan de Applied Biosystems de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. Una reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizó en máquinas 384-well 9700 Viper PCR de Applied Biosystems después de lo cual los genotipos fueron localizados en un sistema 7900 High Throughput Sequence Detection System (SDS) usando el SDS Software Version 2.1. Cada individuo fue genotipificado en duplicado. Todos los individuos fueron genotipificados adicionalmente en cuanto a los factores genéticos asociados con la esclerosis múltiple: *HLA-DRB1*1501*, rs2104286 (*IL2RA*) y rs6897932 (*IL7R*).

B. Resultados

Con el fin de determinar si hay una asociación entre una variación genética y la producción de IL-21 hemos genotipificado a 73 individuos, en los que se había determinado la concentración de IL-21 en suero antes del tratamiento con alemtuzumab para cuatro polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) que están situados dentro de un bloque de desequilibrio de enlaces (LD) en el cromosoma 4q27 que codifica el gen de IL-21. La menor frecuencia de alelos para la totalidad de los cuatro SNPs estaba en línea con datos publicados: rs13151961G (14,5 %), rs6822844T (14,6 %), rs4833837G (38,0 %) y rs6840978T (18,1 %) (Glas y colaboradores, Am. J. Gastroenterol. 104, 1737-1744 (2009)). Hemos encontrado que el genotipo en 3 de los 4 SNPs (rs13151961 A/A, rs6822844 G/G y rs6840978 C/C) estaba asociado con niveles significativamente más altos de IL-21 en suero (valores de p : 0,0076, 0,0098 y 0,0067 respectivamente). El genotipo en rs4833837 no influye sobre la producción de IL-21. El LD entre rs4833837 y los otros tres SNPs es bajo ($r^2 < 0,15$), y por lo tanto es máximamente probable que un SNP que está situado en el haplotipo rs13151961(A)-rs6822844(G)-rs6840978(C) esté asociado con una producción aumentada de IL-21. Las frecuencias de genotipos para *HLA-DRB1*1501*, rs2104286 (*IL2RA*) y rs6897932 (*IL7R*) no difieren de los datos publicados para otros pacientes no seleccionados de esclerosis múltiple (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Lancet Neurol. 7, 567-569 (2008); Yeo y colaboradores, Ann Neurol 61, 228-236 (2007)).

5 Finalmente, con el fin de abordar si el genotipo influye sobre la susceptibilidad a autoinmunidad después del tratamiento con alemtuzumab, hemos clasificado en categorías tantos pacientes como fue posible dentro de los que desarrollan autoinmunidad después del tratamiento con alemtuzumab (27 individuos) y los que definitivamente no lo hacen (23 individuos). 23 pacientes no pudieron ser clasificados en categorías debido a una producción transitoria de autoanticuerpos y/o a un tiempo insuficiente desde la exposición a alemtuzumab. Los genotipos (rs13151961 A/A, rs6822844 G/G, rs6840978 C/C), que se había mostrado que estaban asociados con una más alta concentración de IL-21, se encontraron también como que estaban asociados con autoinmunidad después del tratamiento con alemtuzumab.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar a un paciente de esclerosis múltiple (MS) que está en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria después de un agotamiento de linfocitos, que comprende: medir el nivel de interleucina-21 (IL-21) en una muestra de sangre procedente del paciente de MS; y comparar el nivel de IL-21 en la muestra procedente del paciente de MS con el nivel de IL-21 procedente de un individuo que no tiene una enfermedad autoinmunitaria; en donde una IL-21 elevada en comparación con un individuo que no tiene una enfermedad autoinmunitaria indica que el paciente está en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria en comparación con pacientes de MS sin ninguna IL-21 elevada.
- 10 2. Un método para seleccionar a un paciente de esclerosis múltiple (MS) que necesita una vigilancia aumentada en cuanto al desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria después de una terapia de agotamiento de linfocitos, que comprende: medir el nivel de interleucina-21 (IL-21) en una muestra de sangre procedente del paciente de MS; y comparar el nivel de IL-21 en la muestra procedente del paciente de MS con el nivel de IL-21 procedente de un individuo que no tiene una enfermedad autoinmunitaria; en donde una IL-21 elevada en dicho paciente en comparación con un individuo que no tiene una enfermedad autoinmunitaria indica que el paciente está
- 15 necesitando una vigilancia aumentada en cuanto al desarrollo una enfermedad autoinmunitaria secundaria en comparación con pacientes de MS sin una IL-21 elevada.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la medición se hace del ARNm que codifica IL-21 en células productoras de IL-21 en la muestra.
4. El método de la reivindicación 3, en donde las células productoras de IL-21 son células de Th17.
- 20 5. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la medición se hace de IL-21 intracelular.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la medición comprende una tinción y una citometría de flujo.
7. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la medición se hace de IL-21 en suero.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la medición comprende el uso de un ensayo de inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA).
- 25 9. Un método para identificar a un paciente de esclerosis múltiple que se encuentra en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria después de un agotamiento de linfocitos, que comprende: genotipificar al individuo con el fin de detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978 en donde la presencia de uno o más de dichos genotipos está
- 30 asociada con IL-21 elevada; en donde la presencia de uno o más de dichos genotipos está asociada con un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria comparada con pacientes de MS que no tienen dichos uno o más genotipos.
10. Un método para seleccionar a un paciente de esclerosis múltiple que necesita vigilancia aumentada en cuanto al desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria después de una terapia de agotamiento de linfocitos, que comprende: identificar a un paciente de MS de acuerdo con el método de la reivindicación 9, en donde la presencia de uno o más SNPs indica que el paciente necesita una vigilancia aumentada en cuanto al desarrollo de una enfermedad autoinmunitaria secundaria, en comparación con pacientes de MS que no tienen dichos uno o más genotipos.
- 35 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 10, que comprende además seleccionar un régimen de tratamiento apropiado para la medición de IL-21 o el genotipo de IL-21.
- 40 12. El método de la reivindicación 1 ó 9, en donde dicho agotamiento de linfocitos es inducido por un tratamiento que se dirige a CD52.
13. El método de la reivindicación 12, en donde el tratamiento que se dirige a CD52 comprende un tratamiento con un anticuerpo anti-CD52 o una porción del mismo que se fija a antígenos.
- 45 14. El método de la reivindicaciones 2 ó 10, en donde la terapia de agotamiento de linfocitos se dirige a células portadoras de CD52.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la terapia de agotamiento de linfocitos que se dirige a células portadoras de CD52 comprende administrar al paciente un anticuerpo que se fija a CD52 o una porción de dicho anticuerpo que se fija a un antígeno.
16. El método de la reivindicación 13 ó 15, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 5 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13, 15 ó 16, en donde el anticuerpo compite para fijarse a CD52 con el alemtuzumab.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13, 15, 16 ó 17 en donde el anticuerpo anti-CD52 es alemtuzumab o un agente biológicamente similar.
- 10 19. El método de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del conjunto que se compone de: púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP), la enfermedad de Graves, la enfermedad de Goodpasture, la enfermedad de tiroides autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria y linfopenia autoinmunitaria.
20. El uso de un agente terapéutico para la producción de una medicación destinada a usarse en un método de tratar esclerosis múltiple en un paciente conocido como que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de:
 15 obtener información acerca de
 (i) IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente, de acuerdo con la reivindicación 1; o
 (ii) la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961,
 de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, de acuerdo con la
 20 reivindicación 9;
 y administrar un agente terapéutico para esclerosis múltiples a dicho paciente.
21. Un agente terapéutico destinado a su uso en un método de tratar esclerosis múltiple en un paciente del que se conoce que necesita del mismo, comprendiendo el método las etapas de:
 25 obtener información acerca de
 (i) IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente, de acuerdo con la reivindicación 1; o
 (ii) la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961,
 de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, de acuerdo con la
 30 reivindicación 9;
 y administrar un agente terapéutico para esclerosis múltiples a dicho paciente.
22. Un agente terapéutico destinado a su uso de acuerdo con la reivindicación 21 o a su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el agente terapéutico es un anticuerpo que se fija a CD52 o una porción dicho anticuerpo que se fija a antígenos.
23. Un agente terapéutico destinado a su uso de acuerdo con la reivindicación 22 o a su uso de acuerdo con la
 35 reivindicación 22, en donde el anticuerpo es alemtuzumab o un agente biológicamente similar.
24. Un agente terapéutico destinado a su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 hasta 23 o a su uso de acuerdo con las reivindicaciones 20, 22 ó 23 en donde la etapa de obtención comprende (i) medir la IL-21 en una muestra de sangre procedente del paciente de MS de acuerdo con la reivindicación 1 y/o (ii) genotipificar al
 40 paciente de el fin de detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) seleccionado del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, de acuerdo con la reivindicación 9;
25. Un agente terapéutico destinado a usarse de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 hasta 24 o el uso de acuerdo con las reivindicaciones 20 ó 22 hasta 24 en donde se ha encontrado que el paciente (i) tiene
 45 niveles normales de IL-21 de acuerdo con la reivindicación 1 y/o (ii) no tiene uno o más genotipos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) seleccionados del conjunto que se compone: de A/A en el SNP rs13151961, de G/G en el SNP rs6822844 y de C/C en el SNP rs6840978, de acuerdo con la reivindicación 9;
26. El uso de un antagonista de IL-21 en la producción de un medicamento para reducir la aparición o la gravedad de una enfermedad autoinmunitaria secundaria en un paciente de esclerosis múltiple que ha sido tratado o será
 50 tratado con una terapia de agotamiento de linfocitos en donde la enfermedad autoinmunitaria secundaria aparece después de un tratamiento con la terapia de agotamiento de linfocitos, comprendiendo el método administrar el antagonista de IL-21 a dicho paciente.

- 5 27. Un antagonista de IL-21 destinado a su uso en un método de reducir la aparición o la gravedad de una enfermedad autoinmunitaria secundaria en un paciente de esclerosis múltiple que ha sido tratado o será tratado con una terapia de agotamiento de linfocitos en donde la enfermedad autoinmunitaria secundaria aparece después de un tratamiento con la terapia de agotamiento de linfocitos, comprendiendo el método administrar el antagonista de IL-21 a dicho paciente.
28. El método, el uso, el agente terapéutico o el agonista de IL-21 de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en donde la esclerosis múltiple es una esclerosis múltiple en recaída-remisión.
29. El método, el uso, el agente terapéutico o el agonista de IL-21 de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en donde la esclerosis múltiple es una esclerosis múltiple progresiva primaria.
- 10 30. El método, el uso, el agente terapéutico o el agonista de IL-21 de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones. en donde la esclerosis múltiple es una esclerosis múltiple progresiva secundaria.
- 15 31. El uso de uno o más reactivos apropiados para identificar el genotipo de uno o más polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en una muestra obtenida a partir de un individuo, para identificar a un paciente de esclerosis múltiple que se encuentra en riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria a continuación de un agotamiento de linfocitos en donde dicho uno o más SNPs se seleccionan entre el conjunto que se compone de: SNP rs13151961, de SNP rs6822844 y de SNP rs6840978 y en donde la presencia de uno o más de dichos genotipos está asociada con un riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria secundaria, en comparación con un paciente de esclerosis múltiple que no tiene dichos uno o más genotipos.

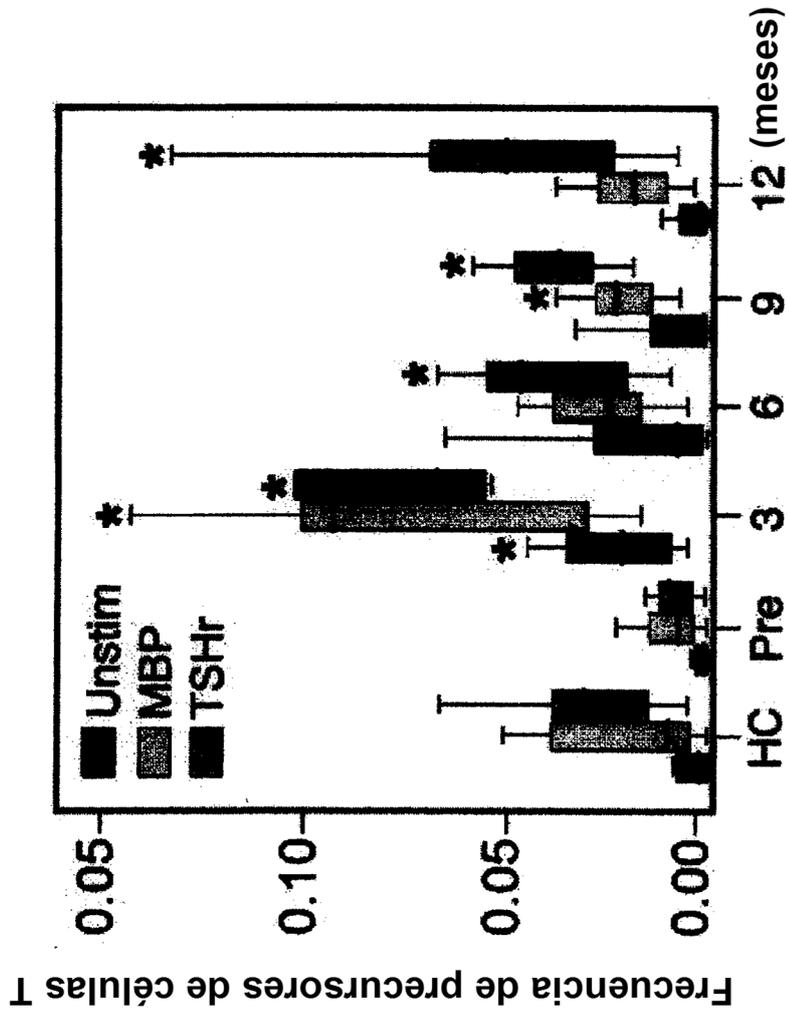


FIG. 1A

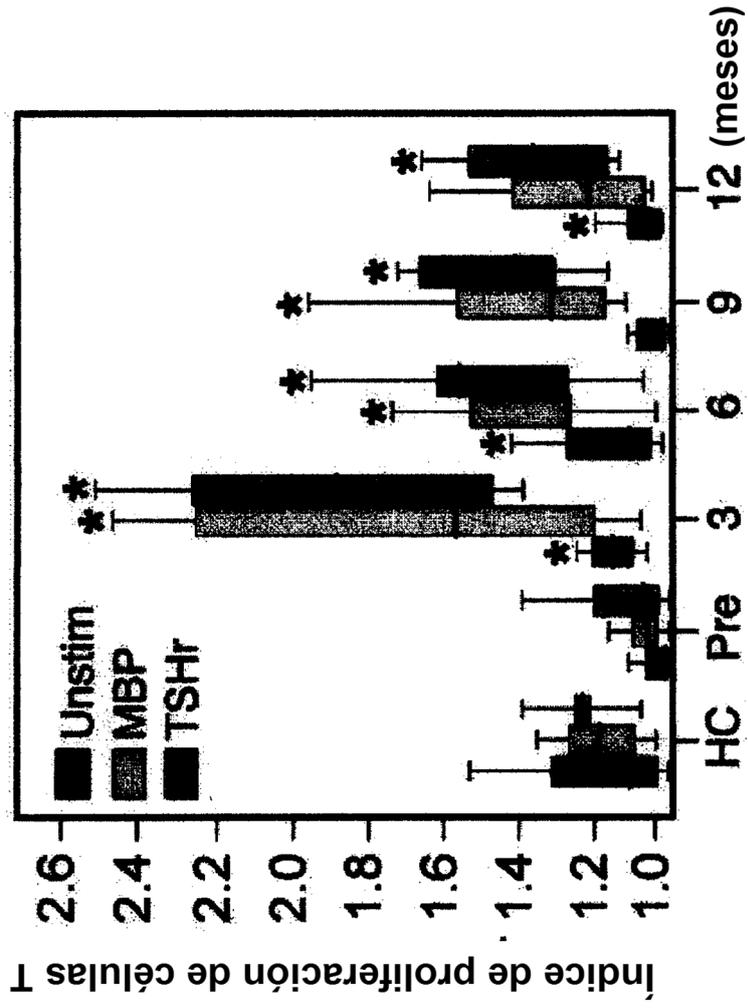


FIG. 1B

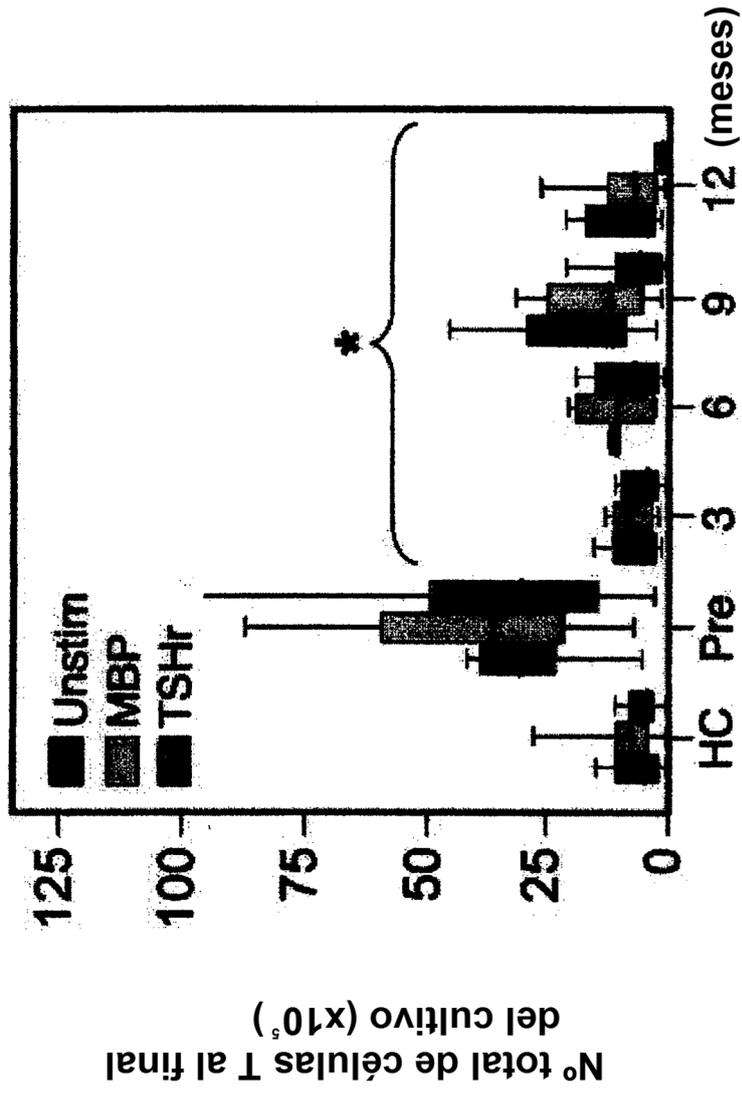


FIG. 1C

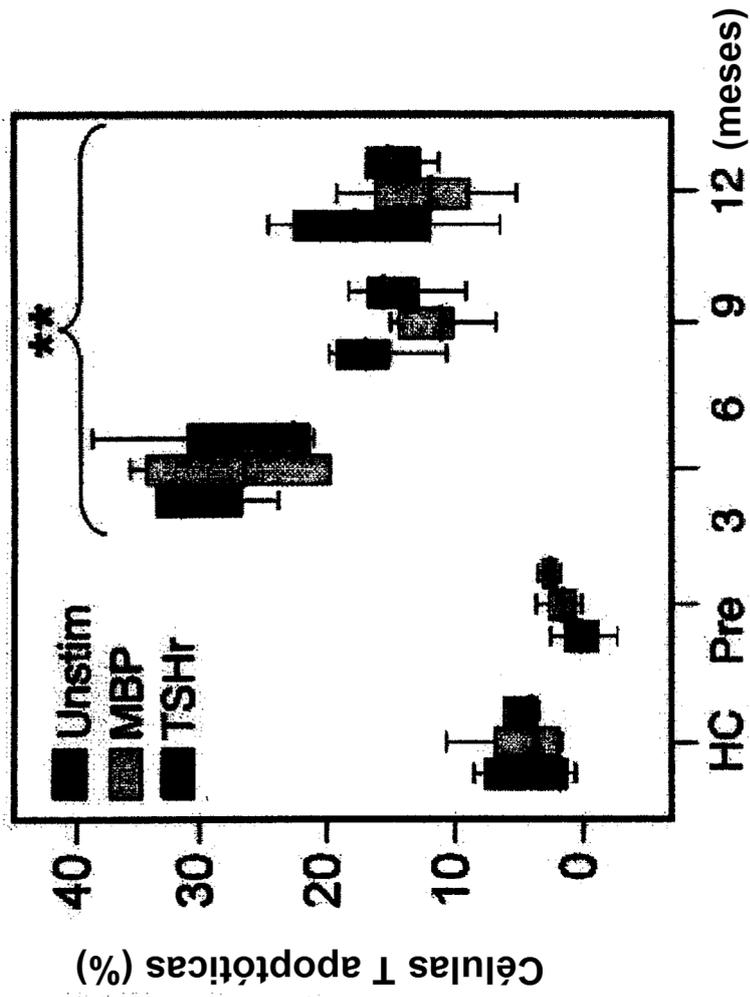


FIG. 1D

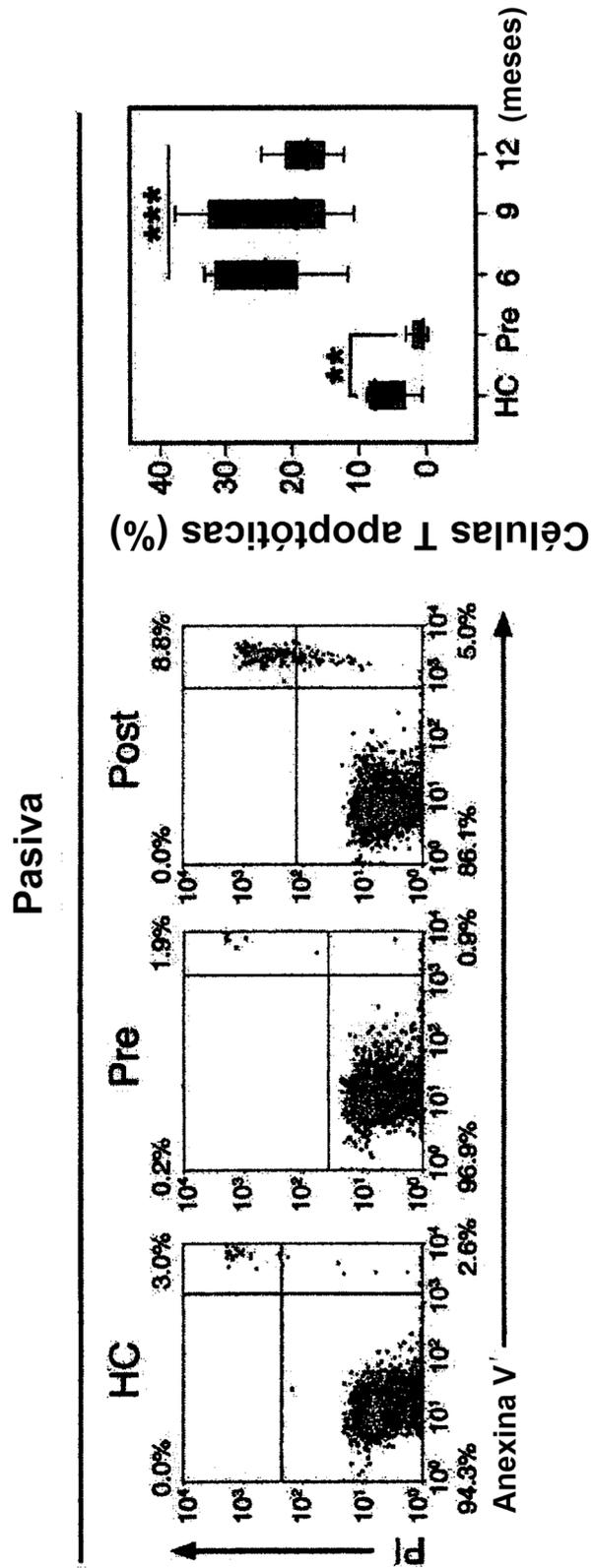


FIG. 1E

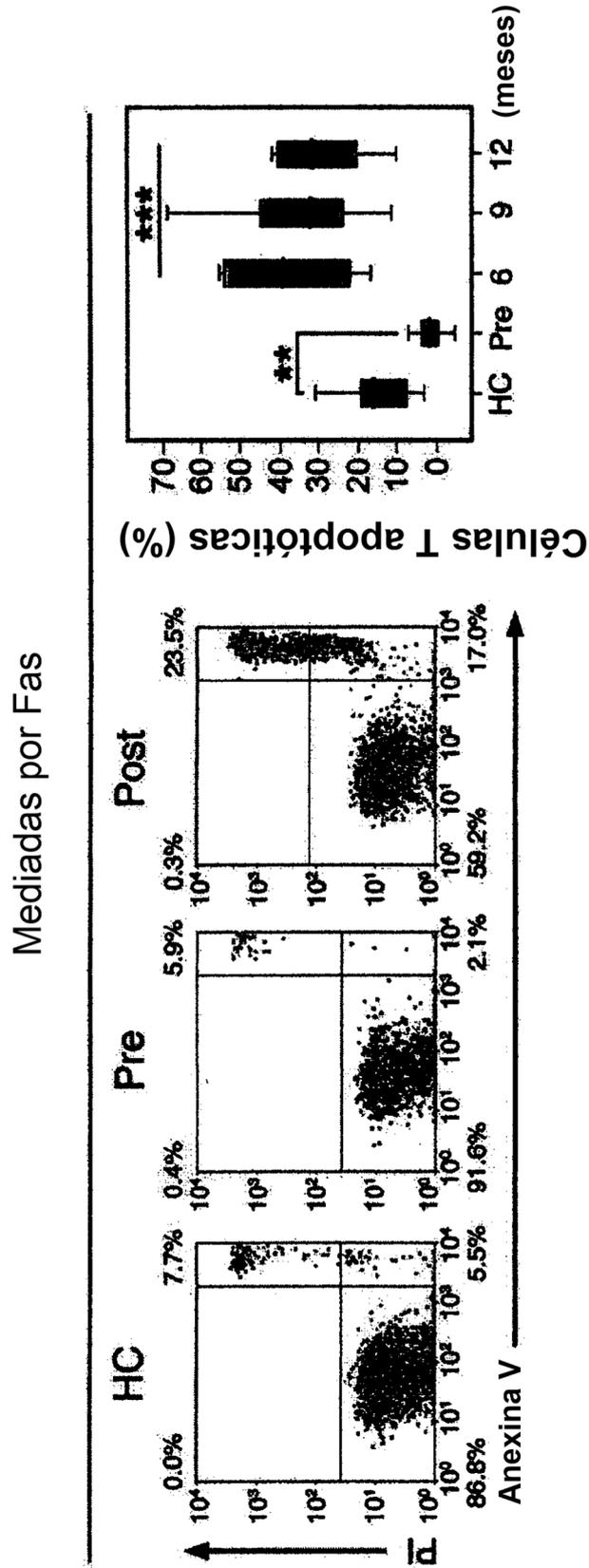


FIG. 1F

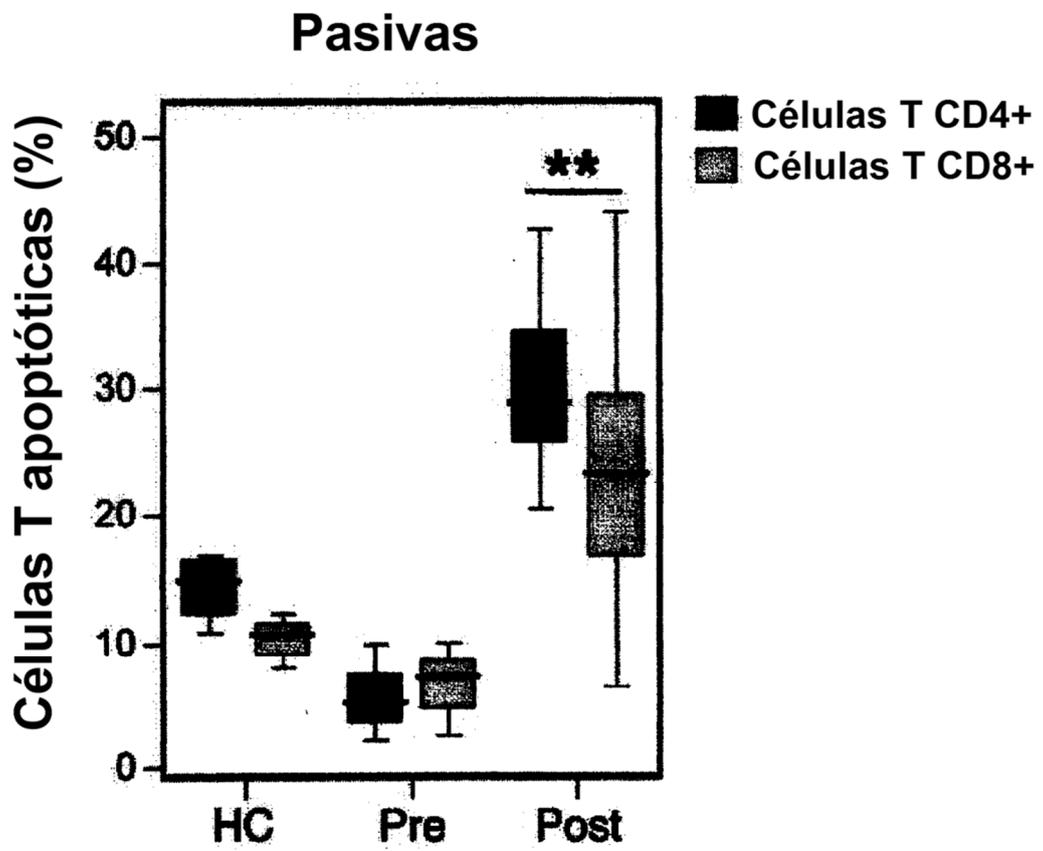


FIG. 1G

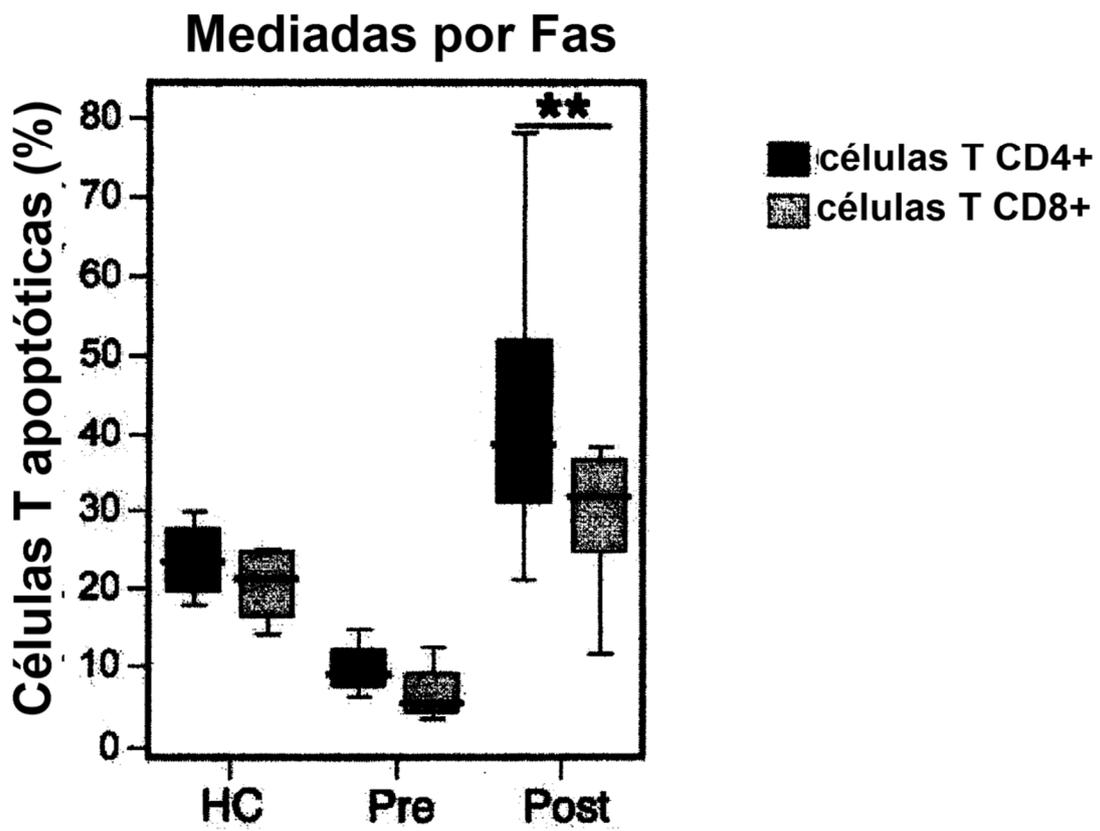


FIG. 1H

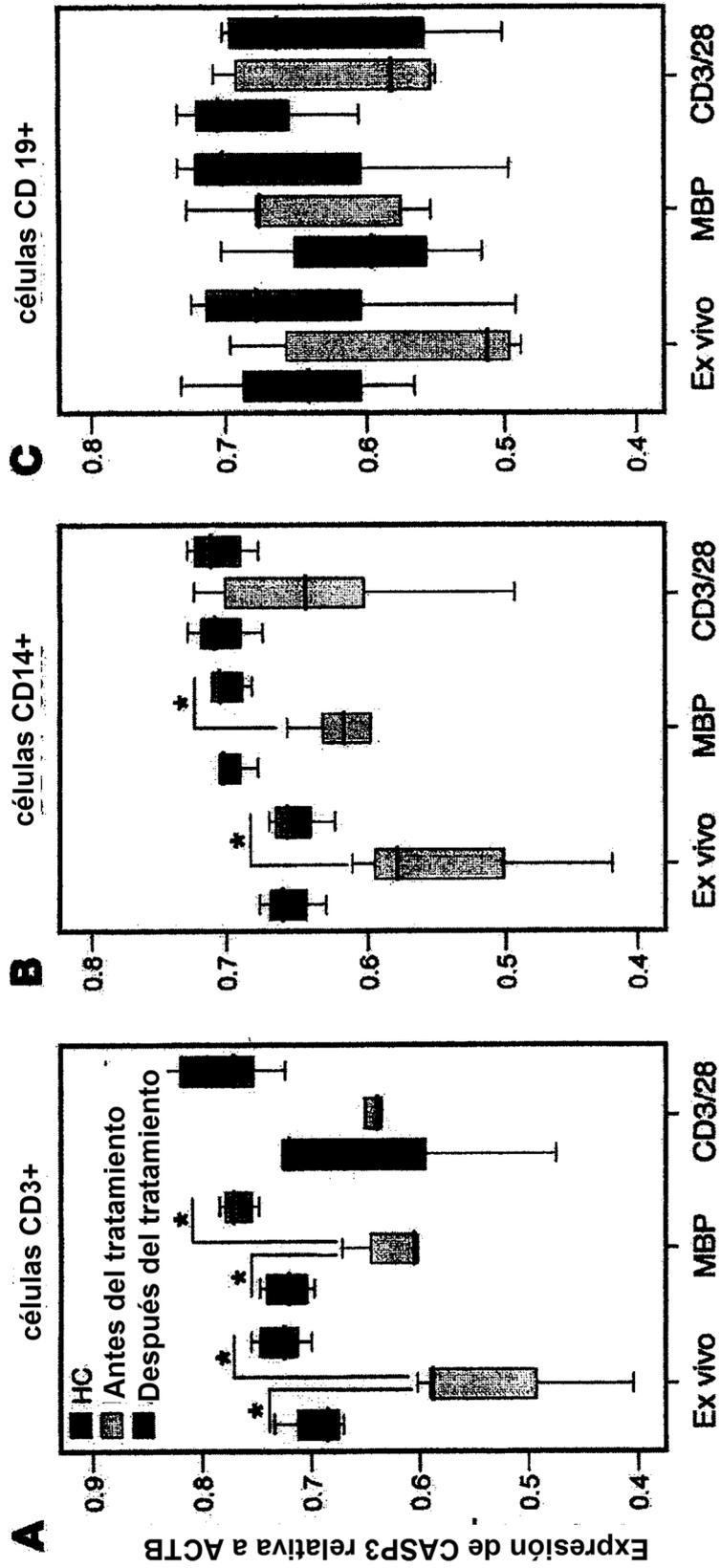


FIG. 2

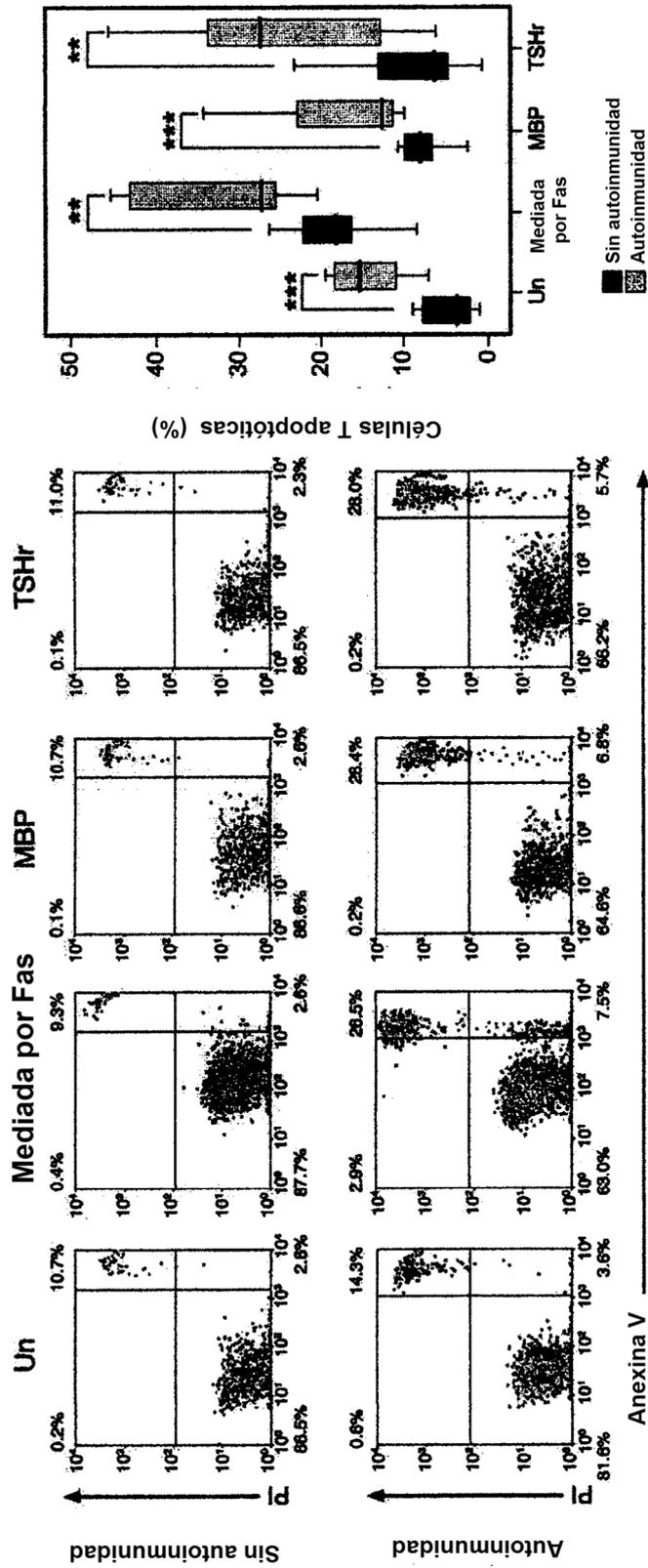


FIG. 3

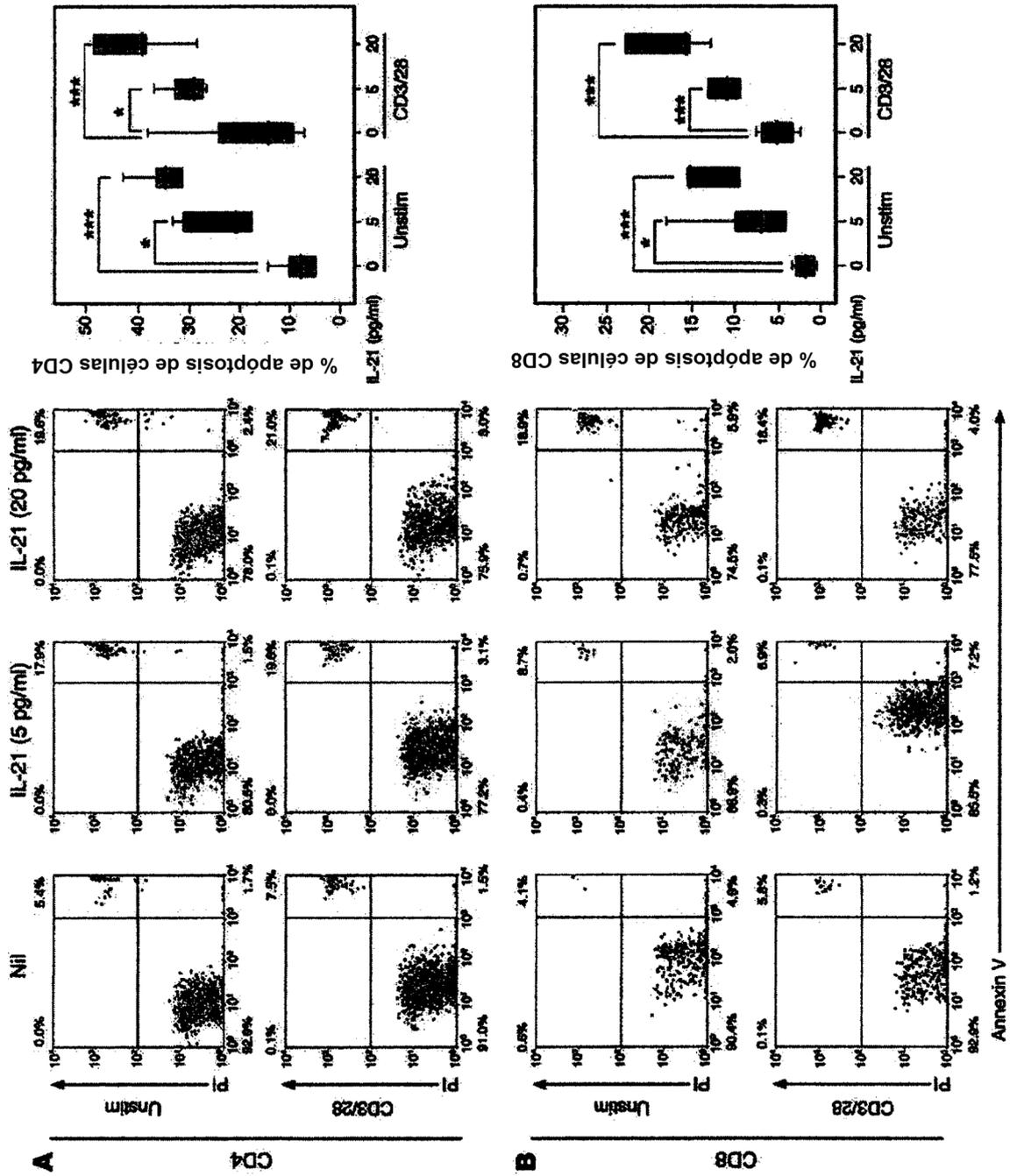


FIG. 4

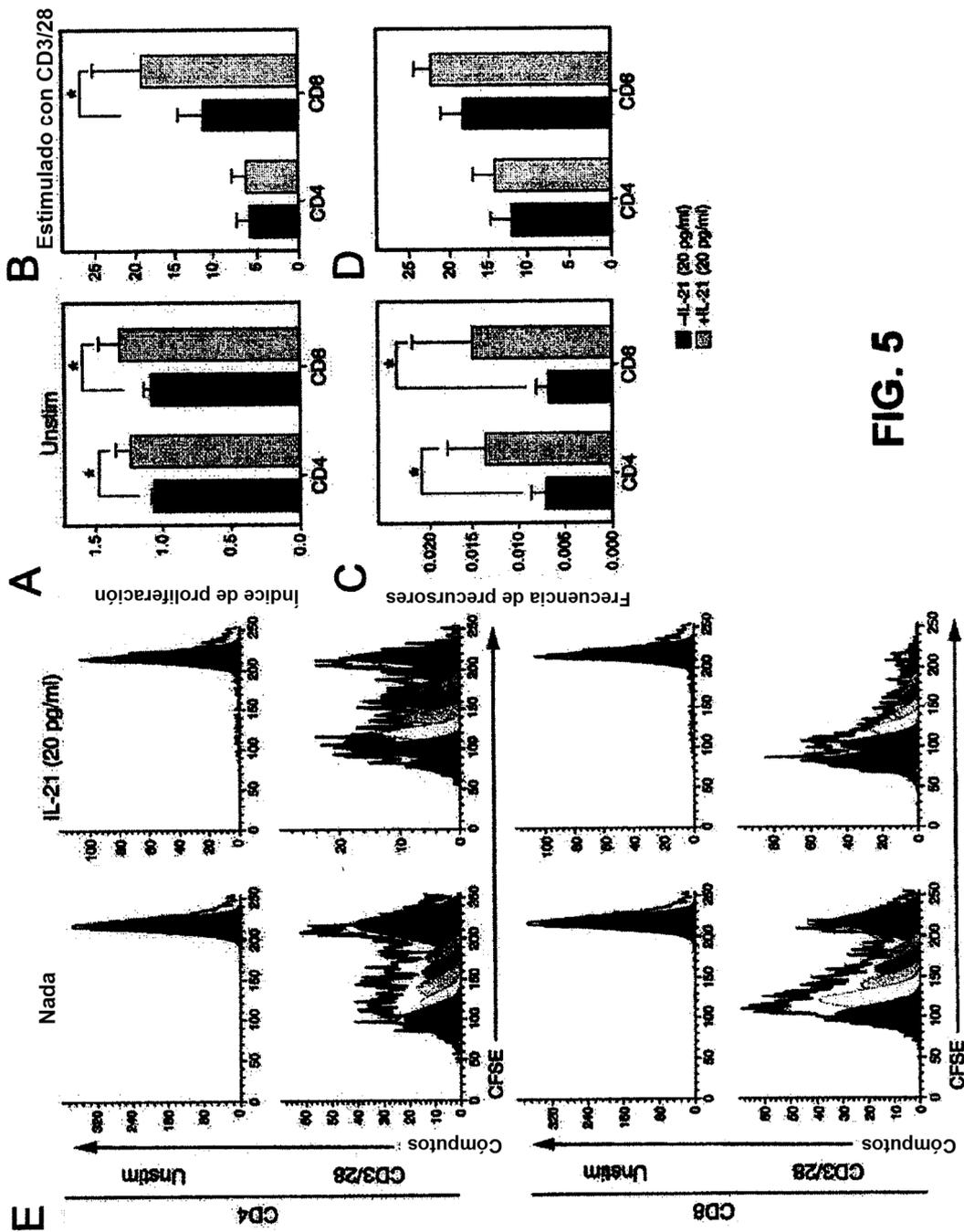


FIG. 5

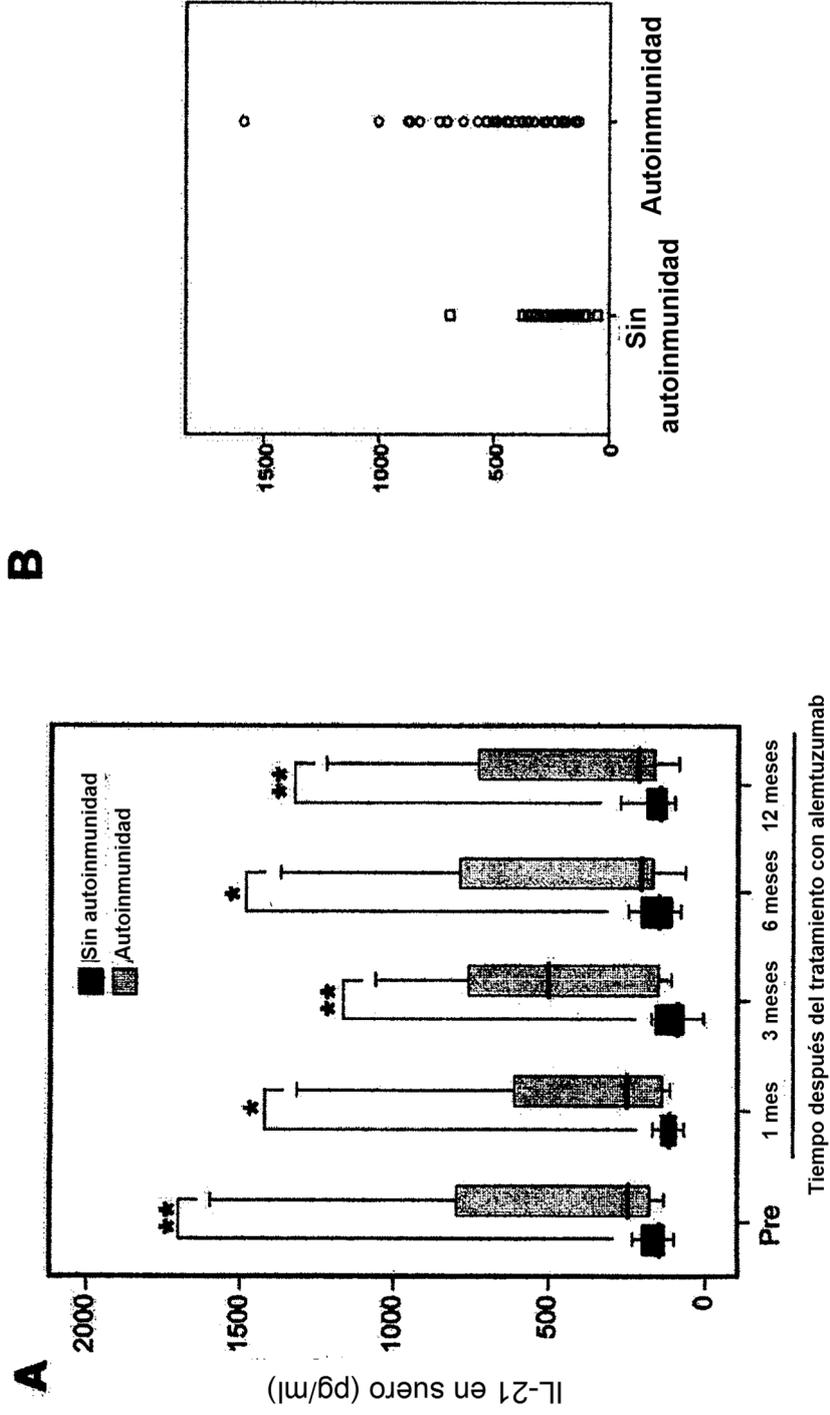


FIG. 6