

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 553**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2015 PCT/EP2015/058588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162124**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2015 E 15723846 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3134132**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria**

30 Prioridad:

22.04.2014 EP 14305595

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

06.03.2020

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

INSTITUT CURIE (25.0%);

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (25.0%) y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%)

72 Inventor/es:

PIAGGIO, ELIANE y

PEROL, LOUIS

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 746 553 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 para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria, a péptidos y al tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

10 Estado de la técnica

La fisiopatología de la diabetes tipo 1 (DT1) está relacionada con múltiples defectos en la vía de interleucina-2 (IL-2) que comprometen la homeostasis reguladora de los linfocitos T (linfocito Treg) y, por lo tanto, la tolerancia inmunitaria.

15 En seres humanos con DT1, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos biomarcadores de autoinmunidad en curso, especialmente hoy en día cuando hay un número creciente de nuevas terapias inmunomoduladoras que podrían ofrecerse a sujetos en riesgo durante la fase prodrómica, cuando el tratamiento podría ser más eficaz. Los nuevos biomarcadores podrían ayudar a definir mejor a esas personas con alto riesgo de desarrollar DT1.

20 En la actualidad, se utilizan para el diagnóstico de DT1 la medición de los autoanticuerpos IAA -en adelante, en el presente documento, AutoAb- (que preceden a la aparición de DT1), y las respuestas de los linfocitos T a las células β pancreáticas y a la presencia de los alelos HLA-DQ8 y DQ2 de susceptibilidad.

El documento WO2005094200 describe composiciones y métodos para diferenciar entre diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 mediante la medición de niveles de marcadores proteicos adiponectina y leptina y divulga que dichos marcadores proteicos están presentes de manera diferencial en las muestras de pacientes que padecen diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y/o trastornos diabéticos en comparación con muestras de sujetos de control. El documento WO2005094200 también divulga métodos y kits que pueden usarse como ayuda para el diagnóstico de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y/o trastornos diabéticos mediante la detección de estos marcadores proteicos. La medición de estos marcadores proteicos, solos o en combinación, en muestras de pacientes proporciona información que un médico diagnosticador puede correlacionar con un diagnóstico probable del alcance de la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y/o trastorno diabético. El documento US 2012/077709 divulga un método para diferenciar entre diabetes tipo 1 y tipo 2 en un sujeto que implica determinar la cantidad de un biomarcador en la muestra obtenida del sujeto y correlacionar la cantidad de biomarcador en la muestra con presencia de diabetes tipo 1 o tipo 2 en el sujeto, donde los marcadores proteicos se seleccionan de adiponectina, leptina, ghrelina, resistina, anticuerpos contra insulina, autoanticuerpos contra descarboxilasa del ácido glutámico, autoanticuerpos contra IL-2, autoanticuerpos contra IA-2, incretinas, TNF-alfa, IL-6 y sus fragmentos o variantes. El documento 2 EP 1 829 893 describe formulaciones inmunoterapéuticas para generar autoanticuerpos capaces de evitar la unión de interleucina-2 a su receptor, así como su uso como heredero en el tratamiento del cáncer. Las formulaciones terapéuticas pueden aumentar la inmunogenicidad de la IL-2 conjugada con la proteína portadora P64k de Neisseria Meningitidis en el adyuvante Montanide ISA 51 para la inducción de autoanticuerpos neutralizantes de IL-2. El documento EP 1 829 893 también divulga péptidos inmunogénicos derivados de IL-2. El primer péptido, corresponde a N³³-A⁵⁰ y tiene la secuencia NPKLTRLTFFKPYMPKKA; el segundo péptido, corresponde a los aminoácidos T¹¹³-T¹³³ y tiene la secuencia TIVEFLNRWITFCQSIISTLT.

45 Objeto de la invención

Los presentes inventores han descubierto que los AutoAb anti-IL-2 (IL-2AAb) con capacidad neutralizante están asociados a la DT1. Los inventores de la presente invención han descubierto además que los AutoAb ILA-2 están presentes a altas frecuencias en la DT1, pero también en el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y en los pacientes con polimiositis autoinmunitaria.

Los inventores de la presente invención también han observado que en DT1 hay una pérdida de tolerancia inmunitaria a IL-2, atestiguada por la presencia de linfocitos T y B autorreactivos a IL-2.

Los inventores de la presente invención han descubierto además que la respuesta de linfocitos T autorreactiva anti-IL-2 en DT1 se dirige principalmente a un epitopo específico.

Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos biomarcadores de DT1 y otras enfermedades autoinmunitarias.

Descripción de las realizaciones preferidas

Los pacientes con enfermedades autoinmunitarias, particularmente los pacientes conDT1, lupus eritematoso sistémico y con artritis reumatoide muestran altas frecuencias de IL-2AAb. Los AutoAb HIL-2 son, por lo tanto, biomarcadores de tales enfermedades.

5 Por lo tanto, un asunto de la presente solicitud es un método *in vitro* para determinar si un paciente tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad autoinmunitaria o para evaluar la gravedad o predecir el desenlace de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende una etapa de detectar o cuantificar en una muestra biológica obtenida de dicho paciente una respuesta inmunitaria anti-IL2.

La respuesta inmunitaria anti-IL2 puede evidenciarse mediante la detección de uno o más de:

- 10
- Linfocitos B que producen AutoAb anti-IL2;
 - anticuerpos anti-IL2;
 - Linfocitos T específicos de IL-2.

Las combinaciones preferidas de parámetros son:

- 15
- Linfocitos B que producen AutoAb anti-IL2 y anticuerpos anti-IL2,
 - anticuerpos anti-IL2 y linfocitos T específicos de IL-2, y
 - linfocitos T específicos de IL-2 y linfocitos B que producen AutoAb anti-IL2

20 Un asunto de la presente solicitud es particularmente un método para determinar *in vitro* si un paciente tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad autoinmunitaria, que comprende una etapa para detectar o cuantificar la presencia de AutoAb en una muestra biológica obtenida de dicho paciente en donde los AutoAb son AutoAb anti-IL2, en particular AutoAb anti-IL2 neutralizantes.

25 La cuantificación de la presencia de AutoAb anti-IL2 neutralizantes en una muestra biológica obtenida de un paciente que recibe IL2 como tratamiento terapéutico, por ejemplo, permite ajustar la cantidad de IL2 administrada y predecir la respuesta del paciente al tratamiento con IL2.

30 Otro asunto de la presente solicitud es un método para predecir en un paciente el desenlace de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende una etapa para detectar o cuantificar la presencia de AutoAb en una muestra biológica obtenida de dicho paciente en donde los AutoAb son AutoAb anti-IL2, en particular AutoAb anti-IL2 neutralizantes.

35 La enfermedad autoinmunitaria se selecciona preferentemente del grupo que consiste en diabetes tipo 1 (DT1), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren (SJO) y polimiositis (JO1) y es particularmente la diabetes tipo 1.

Las muestras que se pueden usar en los presentes métodos son, por ejemplo, plasma, suero, sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), material de citaféresis, células de bazo, células de ganglios linfáticos y médula ósea, sobrenadante de células inmunitarias cultivadas y preferentemente suero y PBMC.

40 La detección de la presencia de linfocitos B que producen anticuerpos anti-IL-2 en una muestra biológica se puede implementar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISPOT de linfocitos B, o por citometría de flujo, y preferentemente, ELISPOT de linfocitos B.

45 La detección de la presencia de AutoAb en una muestra biológica se puede implementar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISA, ELISA competitivo o ELISA modificado (como los que usan péptidos/proteínas acoplados a biotina, o modificado para detectar complejos IL-2/anti-IL-2Ab), neutralización de IL-2 usando células sensibles a IL-2, líneas celulares dependientes de IL-2, tales como ensayo basado en CTLL-2, citometría de flujo basada en partículas múltiples, inmunoprecipitación en fase líquida, electroquimioluminiscencia, radioinmunoensayo, y preferentemente métodos inmunoenzimáticos.

50 La cuantificación de la presencia de linfocitos B que producen anticuerpos anti-IL-2 en una muestra biológica se puede implementar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISPOT de linfocitos B, o por citometría de flujo

55 Tal método preferido, por ejemplo, consiste en

- Proporcionar una muestra, ventajosamente PBMC, de un paciente y realizar ELISPOT de linfocitos B para medir los linfocitos B que producen anticuerpos anti-IL-2

60 La cuantificación de la presencia de AutoAb en una muestra biológica también se puede implementar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como ELISA, ELISA competitivo o ELISA modificado (como los que usan péptidos/proteínas acoplados a biotina, neutralización de IL-2 usando células sensibles a IL-2, líneas celulares dependientes de IL-2, tales como ensayo basado en CTLL-2, citometría de flujo basada en partículas múltiples, inmunoprecipitación en fase líquida, electroquimioluminiscencia, radioinmunoensayo, y preferentemente métodos

65 inmunoenzimáticos.

Tal método preferido, por ejemplo, consiste en

- Proporcionar una muestra, ventajosamente suero de un paciente y realizar una prueba ELISA para medir anticuerpos anti-IL-2.
 - 5 - Proporcionar una muestra, ventajosamente suero de un paciente y realizar una prueba ELISA competitivo para medir anticuerpos anti-IL-2.
 - Proporcionar una muestra, ventajosamente suero de un paciente y realizar una prueba ELISA diseñada para medir complejos inmunitarios IL-2/anticuerpos anti-IL-2.
 - Proporcionar una muestra, ventajosamente suero de un paciente y realizar una citometría de flujo basada en partículas múltiples, para medir anticuerpos anti-IL-2
 - 10 - Proporcionar una muestra, ventajosamente suero de un paciente y realizar una prueba de neutralización de IL-2 usando células sensibles a IL-2 y/o líneas celulares dependientes de IL-2, tales como un ensayo basado en CTLL-2 para evaluar la presencia de anticuerpos anti-IL-2.
- 15 Un objeto de la presente invención es también un método para predecir/ajustar la respuesta a IL-2 administrada de manera exógena con fines terapéuticos, que comprende una etapa de detección o cuantificación en una muestra biológica obtenida de dicho paciente de una respuesta inmunitaria anti-IL2.

20 Para predecir la respuesta de un paciente a IL-2 administrada de manera exógena (como Proleukin® por ejemplo), el método comprende preferentemente las etapas que consisten en:

- proporcionar una muestra biológica obtenida de dicho paciente
- detectar la presencia de anticuerpos anti-IL-2 (autoanticuerpos o anticuerpos detectados contra la IL-2 administrada exógenamente) utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA, ELISA competitivo o ELISA modificado (como los que usan péptidos/proteínas acoplados a biotina, neutralización de IL-2 usando células sensibles a IL-2, líneas celulares dependientes de IL-2, tales como ensayo basado en CTLL-2, citometría de flujo basada en partículas múltiples, inmunoprecipitación en fase líquida, electroquimioluminiscencia, radioinmunoensayo, y preferentemente métodos inmunoenzimáticos.
- 25 - o alternativamente detectar la presencia de complejos circulantes de IL-2/anti-IL-2 usando, por ejemplo, un ELISA específico para detectar complejos o un ELISA que incluye una etapa de disociación de los complejos.
- 30 - si los anticuerpos anti-IL-2 están presentes, por ejemplo con un valor de UA obtenido por ELISA, mayor que el límite establecido para la técnica, la cantidad de IL-2 que se administrará al paciente debe adaptarse de acuerdo con a la respuesta inmunitaria deseada.

35 Para ajustar la respuesta de un paciente tratado a IL-2 administrada exógenamente, el método comprende preferentemente las etapas que consisten en:

- proporcionar una muestra biológica obtenida de dicho paciente tratado
- cuantificar la presencia de anticuerpos anti-IL-2
- 40 - si los anticuerpos anti-IL-2 son más altos que el límite definido para cada técnica, la cantidad de IL-2 administrada debe aumentarse y, por el contrario, si los anticuerpos anti-IL-2 están por debajo del valor límite, la cantidad de IL-2 administrada no tiene que modificarse.

45 Como alternativa, para ajustar la respuesta de un paciente tratado a IL-2 administrada exógenamente, el método se adaptaría a la respuesta biológica deseada, a saber, usando dosis bajas de IL-2 para aumentar la proporción de linfocitos T reguladores, o, alternativamente, usando dosis altas de IL-2 para aumentar la proporción de linfocitos T NK(citotóxico natural) y CD8+.

50 Por ejemplo, en el caso de administrar IL-2 para aumentar las proporciones de linfocitos T reguladores, la cantidad de IL-2 administrada debe ajustarse en pacientes que portan anticuerpos anti-IL-2 para obtener un aumento fijo en Treg (por ejemplo, un aumento del 20% de la proporción de linfocitos T reguladores en la sangre, después de la administración de IL-2). Ejemplos de tratamientos que podrían beneficiarse de este ajuste de dosis de IL-2 podrían ser el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador, en la que la IL-2 se administra a dosis bajas ($0,3 \times 10^6$, 1×10^6 o 3×10^6 UI/metro cuadrado de superficie corporal, durante 8 semanas seguidas de una pausa de 4 semanas) o con IL-2 en dosis ultrabajas ($0,5 \times 10^5$, 1×10^5 o 2×10^5 UI/m²/día durante 5 días);

60 Otro ejemplo de tratamiento en el que la administración de IL-2 en pacientes con anticuerpos anti-IL-2 podría adaptarse para obtener el aumento fijo en la proporción Treg es DT1 (donde se puede administrar IL-2 a (1×10^6 o 3×10^6 UI/m²/día durante 5 días) o en vasculitis autoinmunitaria (donde se puede administrar IL-2 como 4 ciclos de 3×10^6 UI/día durante 5 días separados por un período de reposos de 9 o 16 días)

El método comprendería preferentemente las etapas que consisten en

- proporcionar una muestra biológica obtenida de dicho paciente tratado, detectar la presencia de anticuerpos anti-IL-2, inyectar IL-2 a los pacientes y definir la dosis óptima basada en el aumento de la proporción de linfocitos T reguladores obtenida después de 3 inyecciones diarias de IL-2.
- 65

Por ejemplo, en el caso de administrar IL-2 para aumentar las proporciones de linfocitos T NK o CD8+, la cantidad de IL-2 administrada debe ajustarse en pacientes que portan anticuerpos anti-IL-2 para obtener un aumento fijo en estas poblaciones. Un ejemplo de dicho tratamiento es el tratamiento del melanoma metastásico o el carcinoma de células renales, donde la IL-2 se administra a dosis altas en diferentes programas de dosificación (por ejemplo: administración de 6×10^5 UI/Kg cada 8 horas mediante una infusión intravenosa de 15 minutos para un máximo de 14 dosis).

El método comprendería preferentemente las etapas que consisten en

- 10 - proporcionar una muestra biológica obtenida de dicho paciente tratado, detectar la presencia de anticuerpos anti-IL-2, inyectar IL-2 a los pacientes y definir la dosis óptima basada en el aumento de la proporción de linfocitos TNK o CD8+ obtenida después de 3 inyecciones diarias de IL-2.

15 Como se ha mencionado previamente, los inventores de la presente invención han descubierto además que la respuesta de linfocitos T autorreactiva anti-IL-2 en DT1 se dirige a cualquier péptido derivado de IL-2 y se dirige principalmente a un epítipo específico.

20 Esta es la razón por la cual el objeto de la presente invención incluye cualquier péptido específicamente reconocido por anticuerpos anti-IL2 o linfocitos T específicos de IL-2 de DT1, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y pacientes con polimiositis autoinmunitaria en donde dicho péptido deriva de IL -2, y particularmente un péptido derivado de IL-2 de fórmula I



25 en donde

R1 representa la función amino primaria libre o sustituida del aminoácido N-terminal, y
R2 representa el grupo hidroxilo libre o sustituido de la función carboxilo del aminoácido C-terminal.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a un producto de aminoácidos que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 6 aminoácidos y menos de 50 aminoácidos, preferentemente menos de 40 aminoácidos, más preferentemente menos de 30 aminoácidos, particularmente menos de 25 aminoácidos ácidos, más particularmente menos de 20 aminoácidos.

35 El objeto de la presente invención también incluye las variantes conservativas de función de tales péptidos.

40 Las "variantes conservativas de la función", como se usan en el presente documento, se refieren a aquellas en las que un resto de aminoácido dado en un péptido se ha cambiado (insertado, eliminado o sustituido) sin alterar la conformación y función global (véase más arriba) del péptido. Dichas variantes incluyen péptidos que tienen alteraciones de aminoácidos tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones. Una "delección" se refiere a la ausencia de uno o más aminoácidos en el péptido. Una "inserción" se refiere a la adición de uno o más aminoácidos en el péptido. Una "sustitución" se refiere al reemplazo de uno o más aminoácidos por otro resto de aminoácido en el péptido.

45 Normalmente, un aminoácido dado se reemplaza por un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en un péptido, de tal forma que puede variar el porcentaje de similitud de secuencia de proteína o aminoácidos entre dos péptidos cualquiera con una función similar y puede ser, por ejemplo, del 70% al 90% según lo determinado de acuerdo con un esquema de alineación tal como por el Método de Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservativa de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60% de identidad de aminoácidos como se determina por los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos un 75%, más preferentemente al menos un 85%, y todavía preferentemente al menos un 90%, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que el péptido natural o precursor con el que se compara. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80%, preferentemente más del 85%, preferentemente más del 90% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90%, preferentemente más del 95 %, son similares (funcionalmente idénticos) en toda la longitud de la secuencia más corta. Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación utilizando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias como BLAST, FASTA, etc.

60 El objeto de la presente invención también incluye los derivados químicos conservativos de función de tales péptidos. Un "derivado químico conservativo de función" también incluye péptidos modificados químicamente, preferentemente en funciones R1 y R2 o en una función lateral amino o carboxilo del péptido de fórmula I.

65 Los péptidos preferidos de la invención son

- LTRMLTFKFYMPKKA SEQ ID NO: 1
- EFLNRWITFSQSIIS SEQ ID NO: 2

5 o variantes conservativas de la función de tales péptidos.

Con respecto a las variantes, como es conocido por la persona experta en la materia de inmunología, son posibles modificaciones de las cadenas peptídicas naturales sin modificar, sin embargo, la naturaleza de las propiedades inmunológicas de los péptidos inmunogénicos. Por lo tanto, también se pueden mencionar derivados de péptidos de IL-2, que son altamente homólogos a estas secuencias naturales, como se mencionó anteriormente, al tiempo que conservan las propiedades inmunitarias de este sitio epitópico del péptido natural. Su zona de homología puede variar de 5 a 40 restos, por ejemplo de 8 a 40 restos, o también de 8 a 35 restos, preferentemente de 10 a 35 restos pero también de 12 a 35 restos, de forma notable de 12 a 30 restos, en particular de 15 a 30 restos y muy particularmente de 15 a 25 restos.

Los derivados de péptidos de IL-2 pueden contener restos modificados, con la condición de que las modificaciones no reduzcan apreciablemente la inmunogenicidad, ya sea mediante la adición de radicales químicos (metilo, acetilo, etc.) o mediante modificación estereoquímica (uso de aminoácidos de la serie D). Los derivados de péptidos de la citocina deberían, como los péptidos de IL-2, inducir anticuerpos que interactúen con IL-2.

Los derivados de péptidos de IL-2 de acuerdo con la invención pueden comprender una o más modificaciones en los aminoácidos de los que están constituidos, tales como deleciones, sustituciones, adiciones o funcionalizaciones (como la acilación) de uno o más aminoácidos, en la medida en que estas modificaciones permanezcan dentro de la región marco especificada anteriormente (caracteres inmunitarios). Por ejemplo, en general, el reemplazo de un resto de leucina por un resto de isoleucina no modifica tales propiedades; las modificaciones generalmente deberían referirse a menos del 40% de los aminoácidos, en particular menos del 30%, preferentemente menos del 20% y bastante particularmente menos del 10 % de los aminoácidos del péptido natural. Es importante que los anticuerpos inducidos por los péptidos modificados sean activos frente a las citocinas nativas.

Estas modificaciones están dentro del alcance de una persona experta en la materia, que puede verificar la incidencia de las modificaciones mediante pruebas simples. La inmunogenicidad de tales derivados modificados puede evaluarse mediante ELISA después de la inmunización de ratones, siendo el antígeno probado mediante ELISA la citocina completa o el péptido de citocina inmunizante, o mediante pruebas de bloqueo de enlaces citocina-receptor. Las posibles modificaciones afectan preferentemente a menos de 8 aminoácidos, ventajosamente menos de 6 aminoácidos, en particular menos de 4 aminoácidos, y particularmente 3 aminoácidos o menos, tal como 2 o 1 aminoácido único.

Un sujeto de la invención también es un compuesto caracterizado porque contiene al menos un péptido de citocina o un derivado de péptido de citocina mencionado anteriormente. Tal compuesto puede comprender repeticiones idénticas de péptido/derivado, o diferentes combinaciones de péptido/derivado, ya sea en forma lineal o en forma de estructura de candelabro o acoplamiento mezclados con proteínas transportadoras. Tal compuesto también se puede presentar en forma ciclada. Por lo tanto, los péptidos de IL-2 o los derivados de péptidos de IL-2 de acuerdo con la invención pueden insertarse, por ejemplo, en secuencias más largas de aminoácidos que proporcionan en particular una mejor conformación o combinarse con epítopos T exógenos (ya sea para inmunizaciones de proteínas o de ADN).

Se pueden asociar ventajosamente de manera covalente con proteínas transportadoras como por ejemplo KLH.

Estos péptidos de IL-2 o derivados de IL-2 de la invención pueden incluirse en cualquier secuencia de proteína que no comprenda homología con los otros epítopos de la IL-2 natural. Por ejemplo, pueden ser sitios que unen el receptor, a cuyos extremos simplemente se agrega una cisteína para conferir una estructura cíclica al péptido. Otro ejemplo es un péptido rodeado de secuencias de epítopos T de la toxina tetánica. Otro ejemplo más puede comprender un péptido correspondiente a la secuencia del sitio de unión al receptor pero donde determinados aminoácidos son reemplazados por sus isómeros de la serie D para evitar su efecto agonista.

Para aumentar la respuesta inmunitaria, los péptidos de IL-2 o derivados de IL-2 de la invención pueden acoplarse a proteínas transportadoras. Los métodos de acoplamiento y la proteína transportadora considerada pueden ser diferentes de acuerdo con el péptido diana: pueden ser, por ejemplo, la proteína Hemocianina de Lapa Californiana (KLH) y el Toxoide Tetánico (TT) conjugados con los péptidos por métodos químicos bien conocidos por un experto en la materia, tal como los acoplamientos con carbodiimida, glutaraldehído o benzidina bis-diazotizada. La implementación de estos acoplamientos se puede facilitar mediante la adición o incorporación de aminoácidos en la secuencia, tal como por ejemplo restos de histidina, tirosina o cisteína. Dichos compuestos peptídicos acoplados a un epítipo T exógeno (que se origina en *Plasmodium falciparum*, KLH, etc.), ya sea química o genéticamente, también entran dentro del alcance de la invención.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden producirse en particular mediante síntesis química o ingeniería genética o cualquier otro método adecuado. La síntesis de péptidos cíclicos, injertando, según sea necesario, uno o

más aminoácidos al final de la cadena como cisteínas para crear un puente disulfuro hace posible recuperar parte de la estructura secundaria que poseen estos fragmentos de péptidos en la estructura dimensional de la proteína.

5 Los péptidos de la invención tienen propiedades ventajosas. Son específicamente reconocidos por linfocitos T. Por lo tanto, pueden usarse para detectar una respuesta inmunitaria en curso mediada por linfocitos T. También se pueden usar para inducir tolerancia a IL-2 en forma natural o en formas mutadas de IL-2 utilizadas para fines clínicos en seres humanos. Estas propiedades se ilustran a continuación en la sección experimental. Justifican el uso de los péptidos de la invención descritos anteriormente como un fármaco.

10 Se pueden usar particularmente como vacunas para generar Ab de IL-2 a partir de pacientes.

Los péptidos preferidos de la invención son

- 15 - LTRMLTFKIFYMPKKA SEQ ID NO: 1
- EFLNRWITFSQSIIS SEQ ID NO: 2

o variantes conservativas de la función de tales péptidos.

20 La detección de la presencia de dichos linfocitos T específicos de péptido en una muestra biológica se puede implementar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como la medición de la activación de T al encontrar dichos péptidos *in vitro*. La medición de la activación de los linfocitos T puede realizarse mediante métodos tales como la medición de la proliferación de linfocitos T mediante la incorporación de timidina o la producción de citocinas mediante ELISA, luminex o citometría de flujo.

25 La cuantificación de la presencia de linfocitos T específicos de IL-2 en una muestra biológica puede implementarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como medir la proliferación de linfocitos T por incorporación de timidina o la producción de citocinas por ELISPOT, ELISA, luminex o citometría de flujo.

Tal método preferido, por ejemplo, consiste en

- 30 - Proporcionar una muestra, ventajosamente PBMC, de un paciente y realizar un ensayo de activación de linfocitos T *in vitro* utilizando una biblioteca de péptidos derivados de la secuencia de IL-2 y medir la producción de IFN-g por ELISPOT
- Proporcionar una muestra, ventajosamente PBMC, de un paciente y realizar un ensayo de activación de linfocitos T *in vitro* utilizando una biblioteca de péptidos derivados de la secuencia de IL-2 y medir la producción de IFN-g por matriz de perlas citométricas (CBA)
35 - Proporcionar una muestra, ventajosamente PBMC, de un paciente y realizar un ensayo de activación de linfocitos T *in vitro* utilizando una biblioteca de péptidos derivados de la secuencia de IL-2 y medir la incorporación de timidina

40 La invención también se refiere a cualquier péptido derivado de IL-2, en el que dicho péptido se reconoce específicamente por anticuerpos anti-IL2 o linfocitos T específicos de IL-2 de DT1, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y pacientes con polimiositis autoinmunitaria y en particular un péptido derivado de IL-2 de fórmula I

45 R1-LTRMLTFKIFYMPKKA-R2 (I)

en donde

50 R1 representa la función amino primaria libre o sustituida del aminoácido N-terminal, y
R2 representa el grupo hidroxilo libre o sustituido de la función carboxilo del aminoácido C-terminal,

así como las variantes conservativas de la función de tales péptidos, para su uso en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, es decir como fármaco.

55 Los péptidos preferidos de la invención son

- LTRMLTFKIFYMPKKA SEQ ID NO: 1
- EFLNRWITFSQSIIS SEQ ID NO: 2

60 o variantes conservativas de la función de tales péptidos.

Más en particular, la proteína IL-2 o péptidos derivados de IL-2 o una variante conservativa de la función de los mismos, y preferentemente los péptidos derivados de IL-2 o una variante conservativa de la función de los mismos pueden usarse con fines clínicos para inducir tolerancia a IL-2 en forma natural o en formas mutadas de IL-2.

65 Estas propiedades y aplicaciones también justifican el uso de los péptidos de la invención descritos anteriormente en

una composición farmacéutica.

Como medicamentos, se puede incorporar un péptido IL-2 o un derivado de IL-2 de la invención en composiciones farmacéuticas destinadas a cualquier vía convencional en su uso en el campo de las vacunas, en particular por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía oral. La administración puede realizarse en una dosis única o repetirse una o más veces después de un determinado período de tiempo.

Las nuevas composiciones farmacéuticas, en particular las vacunas, de la invención están compuestas por una cantidad eficaz de al menos un péptido de IL-2 o preferentemente un péptido de fórmula I o una variante conservativa de su función y de un transportador o excipiente farmacéutico inerte.

Un asunto de la presente solicitud es también una composición farmacéutica curativa o preventiva, caracterizada porque comprende como principio activo, uno o más péptidos de IL2 o derivados de IL2 como se define anteriormente.

El agente inmunogénico puede acondicionarse solo o mezclado con un excipiente o una mezcla de excipientes farmacéuticamente aceptables como adyuvante. Un asunto de la presente solicitud es más particularmente una vacuna que contiene como inmunógeno, un péptido de IL-2 o derivado de IL-2 mencionado anteriormente.

Un asunto de la presente invención es también un proceso para preparar una composición descrita anteriormente, caracterizado porque, de acuerdo con métodos conocidos per se, el principio o principios activos se mezclan con excipientes aceptables, en particular farmacéuticamente aceptables.

Debido a que pueden usarse para inducir tolerancia a IL-2, las nuevas composiciones de la invención son útiles, por ejemplo, tanto en el tratamiento curativo como preventivo de la enfermedad mediada por el sistema inmunitario, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. También se pueden usar en el tratamiento de la DT1, así como en el tratamiento del LES. También pueden usarse en el tratamiento de AR, SJO, JO-1, EM.

La dosis habitual, que varía según el sujeto y la afección en cuestión, puede ser, por ejemplo, de 1 a 1000 µg, en particular de 10 a 500 µg, por vía subcutánea, una vez al mes durante tres meses, después periódicamente en función del recuento de anticuerpos séricos inducidos, por ejemplo cada 2-6 meses del péptido LTRMLTFKGYMPKKA (SEQ ID NO:1), para el tratamiento de la AR, SJO, JO-1, EM.

Es por esto que el objeto de la presente invención es también cualquier péptido derivado de IL-2, en el que dicho péptido se reconoce específicamente por anticuerpos anti-IL2 o linfocitos T específicos de IL-2 de DT1, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y pacientes con polimiositis autoinmunitaria y en particular un péptido derivado de IL-2 de fórmula I



en donde

R1 representa la función amino primaria libre o sustituida del aminoácido N-terminal, y
R2 representa el grupo hidroxilo libre o sustituido de la función carboxilo del aminoácido C-terminal,

así como las variantes conservativas de la función de tales péptidos, para su uso en un método de tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunitarias y en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Las enfermedades autoinmunitarias son preferentemente DT1 y LES. Los péptidos de la invención también pueden usarse en el tratamiento de AR, SJO, JO-1 y EM.

Los péptidos preferidos de la invención son

- LTRMLTFKGYMPKKA SEQ ID NO: 1
- EFLNRWITFSQSIIS SEQ ID NO: 2

Los linfocitos B que producen anticuerpos o AutoAb anti-IL2 pueden usarse para la fabricación de anticuerpos anti-IL-2. Dichos anticuerpos anti-IL-2 pueden usarse para investigación, diagnóstico o para aplicaciones clínicas como se explica anteriormente.

Los anticuerpos anti-IL2 pueden fabricarse de acuerdo con métodos convencionales tales como la immortalización de los clones de linfocitos B correspondientes y la recuperación de los anticuerpos anti-IL2 producidos por los hibridomas, o mediante la generación de anticuerpos recombinantes basados en productos de ADN obtenidos de sujetos que tienen linfocitos B que producen anticuerpos anti-IL2 o AutoAb anti-IL-2.

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es el uso de anticuerpos o AutoAb anti-IL-2 obtenidos de acuerdo con los métodos anteriores en una aplicación de diagnóstico o clínica mencionada anteriormente.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

5 Las afecciones preferidas para implementar los métodos descritos anteriormente también se aplican a los otros sujetos de la invención previstos anteriormente.

10 El alcance de la invención puede entenderse mejor haciendo referencia a los ejemplos que se proporcionan a continuación, cuyo objetivo es explicar las ventajas de la invención.

Descripción de las figuras

15 Las Figuras 1a y b representan respectivamente los títulos séricos de autoAb IgG anti-hIL-2 en diferentes grupos de pacientes y el porcentaje de pacientes positivos para hIL-2A en los diferentes grupos de pacientes, medidas mediante ELISA. Las Figuras 1c y d se realizan con un grupo de donantes sanos y un grupo de pacientes con DT1 para establecer el límite de positividad para la determinación ELISA de autoAb anti-IL-2. Los paneles c y d muestran los resultados de ELISA para autoAb anti-IL-2 y la figura d muestra la curva ROC utilizada para determinar el límite en un experimento de cuantificación de AutoAb de IL-2 mediante ELISA.

20 La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo ELISA competitivo realizado con IL-2 humana en donantes sanos, pacientes con DT2 y cinco enfermedades autoinmunitarias. Los resultados se expresan como un porcentaje de inhibición de la señal de ELISA de acuerdo con la cantidad de IL-2 humana

25 Las Figuras 3 a y b respectivamente representan los resultados de los ensayos ELISPOT. El número de puntos de IgG específica de IL-2 por 10^6 células se da de acuerdo con el tipo de ratón (NOD o B6) y de la naturaleza del tejido celular (bazo o médula ósea).

Las Figuras 4 y b representan respectivamente los títulos séricos de autoAb IgG anti-hIL-2 en diferentes grupos de pacientes y el porcentaje de pacientes positivos para hIL-2A en los diferentes grupos de pacientes.

La Figura 5 representa la producción de IFN-g medida por CBA en el sobrenadante de esplenocitos que responden a péptidos derivados de IL-2.

30 La Figura 6 representa los resultados de los ensayos ELISPOT. El número de células formadoras de puntos de IFN- γ (SFC)/ 10^6 PBMC después de la sustracción de fondo se da después de la estimulación de PBMC con diferentes péptidos de IL-2 y otros péptidos de control.

La Figura 7 muestra los resultados de los títulos séricos de los complejos IL-2/IL-2A en diferentes cepas de ratón en un ensayo ELISA.

35 Las Figuras 8 a y b muestran los resultados de una cuantificación de AutoAb de IL-2 por citometría de flujo basada en partículas múltiples. Los resultados se expresan como una intensidad de fluorescencia en diferentes cepas de ratones y en un ensayo competitivo incubando previamente los sueros con diferentes cantidades de IL-2.

La Figura 9 muestra los resultados de la evaluación de la capacidad neutralizante de los AutoAb de IL-2 en un ensayo de neutralización. Los resultados se expresan como % de proliferación de células CTLL-2 en comparación con el control en función de la dilución en suero.

40 La Figura 10 muestra los resultados de una cuantificación de linfocitos T específicos de IL-2 por ensayo de proliferación.

La Figura 11 muestra la fosforilación de STAT5 entre los linfocitos T reguladores estimulados con IL-2 e incubados previamente con suero de DS hIL-2AAb- o con suero de DT1 hIL-2AAb+.

45 Descripción detallada de la invención

DATOS EXPERIMENTALES

50 Las muestras de suero y plasma humano utilizadas se describen, en el presente documento, a continuación.

1. Se obtuvieron muestras de suero de donantes sanos (DS; n = 249) y de pacientes que padecían diabetes tipo 2 (DT2; n = 24), diabetes tipo 1 (DT1; n = 39 en la cohorte 1, n = 15 en la cohorte 2 y n = 21 en la cohorte 3).

55 Se reclutaron adultos donantes sanos, pacientes con DT2 o con DT1 (cohorte 1) en la Unidad de Diabetología del Hospital Pitié Salpêtrière en París (Francia) siguiendo las pautas éticas locales. El programa DASP proporcionó muestras de suero de donantes sanos y pacientes con DT1 (cohorte 2) (http://www.cdc.gov/labstandards/diabetes_dasp.html). Se reclutaron donantes sanos y pacientes con DT1 de la cohorte 3 en el Instituto San Raffaele de Milán (Italia), siguiendo las pautas éticas locales. Solo se incluyeron pacientes adultos con DT1 en el análisis final.

60 2. Se reclutaron donantes sanos emparejados con pacientes que padecían diferentes enfermedades inflamatorias/autoinmunitarias en INSERM U905, Rouen (Francia). Para esta cohorte, los pacientes se clasificaron de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos: criterios revisados ACR para LES con AutoAb anti-ADNbc, criterios ARA para AR con anticuerpos anti-CCP y/o factor reumatoide, criterios europeos revisados para el síndrome de Sjögren primario con anti-SSA y/o AutoAb anti-SSB, criterios de Troyanov para la superposición de miositis con autoanticuerpo anti-ARNt-sintetasa Jo-1, y descritos anteriormente.

65

Los pacientes que padecen EM de acuerdo con los criterios de McDonald de 2005 y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) de acuerdo con los criterios de EFNS, fueron reclutados en el Hospital Henri Mondor/Universidad UPEC, Créteil (Francia). Se recogieron sueros antes del inicio con metilprednisolona en caso de recaída de la EM y antes del inicio del tratamiento con inmunoglobulina intravenosa en caso de CIDP. Este estudio retrospectivo recibió la aprobación del comité de estándares éticos, y los pacientes fueron informados de la recopilación de sus datos anónimos para la investigación de acuerdo con los estándares franceses.

Se obtuvieron sueros de pacientes que padecían diferentes tipos de cáncer (melanoma, cabeza y cuello, pulmón, colorrectal o de mama) del Centre de Ressources Biologiques en el Curie Institut Paris (Dr. S. Saada), de acuerdo con las Pautas Éticas Locales.

Todas las muestras de suero se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Ejemplo 1. Cuantificación de AutoAb anti-IL-2 humana en muestras de suero y plasma humanos - diabetes

Los títulos séricos de hIL-2AAb se evaluaron mediante ELISA. Se incubaron placas de 96 pocillos de microtitulación (Medisorp, Nunc) durante la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con $100\text{ }\mu\text{l}$ /pocillo de tampón de recubrimiento de carbonato que contenía 10^5 UI/ml de hIL-2 ("pocillos recubiertos con IL-2") o tampón solo ("pocillos no recubiertos", en blanco). Después de bloquear con PBS/BSA al 2% durante 2 h, las placas se incubaron con $50\text{ }\mu\text{l}$ de muestras de suero diluidas en serie durante 2 h a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo con PBS/Tween20 al 0,1%, se añadió anti IgG humana conjugada con HRP (1:2.000; Dako) a cada pocillo y las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h. La actividad de peroxidasa se midió con sustrato TMB como antes. La curva patrón se generó utilizando diluciones en serie de dos veces de anti IL-2 humana de rata (clon MQ1-17H12, eBioscience) revelada con una anti Ig de rata de cabra conjugada con HRP. Las unidades arbitrarias para cada muestra se calcularon utilizando el valor de D.O. obtenido después de la resta del blanco. Para los ensayos de competencia en seres humanos, se incubaron previamente sueros de donantes sanos hIL-2AAb o de pacientes hIL-2AAb+ (diluidos 1/100, 1/200 o 1/300) con concentraciones crecientes de hIL-2 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se agregaron muestras a la placa ELISA y la placa se procesó como se indica anteriormente.

Resultados:

Los resultados de los títulos séricos de IgG anti-hIL-2 en los diferentes grupos de pacientes y el porcentaje de pacientes positivos para hIL-2A en los diferentes grupos de pacientes se muestran en las figuras 1a y 1b (Ex Fig. 5a, b). La línea discontinua de los gráficos de la izquierda indica el umbral de positividad. Los símbolos representan sujetos individuales y las barras horizontales son las medianas. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (Prueba exacta de Fisher). Para las pruebas ELISA que cuantifican hIL-2AAb, se fijó el umbral de positividad en un valor de 24,3 UA, lo que permitió la discriminación de donantes sanos y sujetos con DT1 con una especificidad del 95%. Este límite se calculó con una curva ROC con un intervalo de confianza del 95%, utilizando los sujetos con DT1 de las cohortes 1,2 y 3 ($n = 75$), como pacientes; y los donantes sanos procedentes de estas cohortes ($n = 103$), como controles (Fig. 1c-d).

Los porcentajes significativamente mayores de sueros de pacientes con DT1 fueron hIL-2AAb+ (23,1,33,3 y 23,8% en las cohortes 1,2 y 3; respectivamente), en comparación con los bajos porcentajes observados en donantes sanos (4,4%) y pacientes con DT2 (4,2%).

Conclusión

Los resultados del porcentaje de sujetos positivos para anti-hIL-2 entre las diferentes cohortes (gráficos de la derecha) evidencian que los AutoAb de IL-2 están presentes a altas frecuencias en la diabetes tipo 1.

Por lo tanto, los anticuerpos anti-hIL-2 pueden usarse como marcadores de diabetes de tipo 1.

Ejemplo 2. Ensayo ELISA competitivo de IL-2 humana

Se incubaron placas de 96 pocillos de microtitulación (Medisorp, Nunc) durante la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con $100\text{ }\mu\text{l}$ /pocillo de tampón de recubrimiento de carbonato que contenía 10^5 UI/ml de hIL-2 ("pocillos recubiertos con IL-2") o tampón solo ("pocillos no recubiertos", en blanco). Después de bloquear con PBS/BSA al 2% durante 2 h, las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con $50\text{ }\mu\text{l}$ de muestras de suero diluidas en serie incubadas previamente o no con concentraciones crecientes de hIL-2 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo con PBS/Tween20 al 0,1%, se añadió anti IgG humana conjugada con HRP (1:2.000; Dako) a cada pocillo y las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h. La actividad de peroxidasa se midió con sustrato TMB como antes. La curva patrón se generó utilizando diluciones en serie de dos veces de anti IL-2 humana de rata (clon MQ1-17H12, eBioscience) revelada con una anti Ig de rata de cabra conjugada con HRP. Las unidades arbitrarias para cada muestra se calcularon utilizando el valor de D.O. obtenido después de la resta del blanco.

Se muestran los resultados en la figura 2

Los resultados evidencian que la señal ELISA del sustrato coloreado disminuye de acuerdo con un patrón dependiente

de la dosis de hIL-2 para la diabetes de tipo 1, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide. Por lo tanto, los anticuerpos son específicos de IL-2.

Ejemplo 3. Detección de linfocitos B que producen AutoAb anti-IL-2 por ratones - Elispot

5 Después de la activación con etanol al 35 %, las placas de PVDF de 96 pocillos (MAIP4510, Millipore) se revistieron con 70 μ l/pocillo de 5 μ g/ml de mIL-2 (PeproTech) durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo sin proteínas (Thermo) durante 1 hora a temperatura ambiente y después con medio RPMI completo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron células de bazo o médula ósea diluidas en serie (5x10⁴ a 4x10⁵ células por pocillo en medio RPMI completo) de ratones B6 o NOD hembra de 10 a 18 semanas de edad en la placa de ELISPOT. En un conjunto de experimentos, se cultivaron esplenocitos de ratones hembra B6 o NOD de 10 a 18 semanas de edad durante 6 días a 1x10⁶ células/ml en medio RPMI completo con 10 μ g/ml de CpG-ODN 1018 para permitir la expansión de los linfocitos B de memoria. Los esplenocitos preactivados con CpG diluidos en serie (5x10⁴ a 4x10⁵ células por pocillo) se agregaron después en la placa de ELISPOT. Después de un cultivo de 18 h, las placas se lavaron 3 veces con PBS/Tween-20 al 0,25 %, 3 veces con PBS y después se incubaron con fosfatasa alcalina-anti-IgG de ratón (1:1.000; Sigma-Aldrich) diluida en PBS/BSA al 2 % durante 2 h a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas y se midió la actividad de fosfatasa añadiendo 100 μ l/pocillo de sustrato (Bio-Rad). La reacción se bloqueó mediante un lavado extenso con agua corriente después de 15 minutos de incubación. Los puntos se contaron con una cámara AID.

20 Los resultados se muestran en las figuras 3a y 3b
Los linfocitos B que producen anticuerpos anti-IL-2 se detectan solo en ratones NOD.

Conclusión

25 Los resultados anteriores demuestran que técnicas como el Elispot de linfocitos B pueden usarse en seres humanos para la detección de la producción de anticuerpos anti-IL-2 por los linfocitos B.

Ejemplo 4. Cuantificación de AutoAb anti-IL-2 humana en muestras de suero y plasma humanos - Otras enfermedades autoinmunitarias.

30 Se obtuvieron muestras de suero de donantes sanos (DS, n=249), pacientes con DT1 (n=75 en las tres cohortes agrupadas), esclerosis múltiple (EM; n = 33), síndrome de Sjögren (SJO; n = 22), polimiositis anti-JO1 positiva (JO1; n = 16), artritis reumatoide (AR; n = 33), lupus eritematoso sistémico (LES; n = 20), neuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD; n = 51) y con cáncer (Cáncer; n = 128). (a) Títulos de suero de IgG anti-hIL-2 en las diferentes cohortes. La línea discontinua indica el umbral de positividad (establecido como el mismo valor que en el ejemplo 1). (b) porcentaje de sujetos positivos para anti-hIL-2 entre las diferentes cohortes. Los símbolos representan sujetos individuales y las barras horizontales son las medianas. * P < 0,05; *** P < 0,001 (Prueba exacta de Fisher).

40 Se muestran los resultados en la figura 4.

Ambos gráficos muestran que, al igual que los pacientes con DT1, los pacientes con LES, AR, SJO y JO-1 muestran altas frecuencias de hIL-2AAb.

Conclusión

Debido a que los pacientes con LES, AR, SJO y JO-1 muestran altas frecuencias de hIL-2A, los resultados anteriores demuestran que hIL-2A es un biomarcador de tales enfermedades

Ejemplo 5. Cuantificación de linfocitos T específicos de IL-2 mediante CBA

50 La producción de IFN-g por esplenocitos de ratones B6 (n = 3) o NOD prediabéticos hembra (n = 7) de 10-18 semanas se cuantificó en sobrenadantes de cultivo por CBA después de 72 h de estimulación con DMSO, péptidos mIL-2 que dieron una respuesta positiva en el análisis inicial (3 y 10 μ mol/l de cada péptido), péptido P31 (3 y 10 μ mol/l) o perlas recubiertas con CD3-CD28 (relación 1 perla:1 célula). Los símbolos representan ratones individuales. Los datos son acumulativos de dos experimentos independientes.

Se muestran los resultados en la figura 5.

60 Los resultados muestran que solo dos péptidos derivados de la secuencia de mIL-2 pueden inducir la producción de IFN-g por esplenocitos NOD pero no por esplenocitos B6.

Conclusión

65 Debido a que los ratones NOD presentan linfocitos T específicos de IL-2 (reactivos a dos péptidos diferentes), los resultados anteriores evidencian que los linfocitos T específicos de IL-2 (detectados por CBA de IFNg después de la

reestimulación con péptidos de IL-2) podrían usarse como un biomarcador de DT1.

Ejemplo 6. Cuantificación de linfocitos T específicos de IL-2 mediante ESLISPOT

5 Se preparó la siguiente biblioteca de péptidos de IL-2 humana: 21.

ID del péptido	Secuencia
hIL-2 ₁₋₁₅	MYRMQLLSICIALSLA
hIL-2 ₆₋₂₀	LLSCIALSLALVTNS
hIL-2 ₁₁₋₂₅	ALSLALVTNSAPTSS
hIL-2 ₁₆₋₃₀	LVTNSAPTSSSTKKT
hIL-2 ₂₁₋₃₅	APTSSSTKKTQLQLE
Pro ₁₋₁₅	MPTSSSTKKTQLQLE
hIL-2 ₂₆₋₄₀	STKKTQLQLEHLLLD
hIL-2 ₃₁₋₄₅	QLQLEHLLLDLQMIL
hIL-2 ₃₆₋₅₀	HLLLDLQMILNGINN
hIL-2 ₄₁₋₅₅	LQMILNGINNYKNPK
hIL-2 ₄₆₋₆₀	NGINNYKNPKLTRML
hIL-2 ₅₁₋₆₅	YKNPKLTRMLTFKPY
hIL-2 ₅₆₋₇₀	LTRMLTFKPYMPKKA
hIL-2 ₆₁₋₇₅	TFKPYMPKKATELKH
hIL-2 ₆₆₋₈₀	MPKKATELKHLCLE
hIL-2 ₇₁₋₈₅	TEKHLQCLEELKP
hIL-2 ₇₆₋₉₀	LQCLEELKPLEEVL
hIL-2 ₈₁₋₉₅	EELKPLEEVLNLAQS

ID del péptido	Secuencia
hIL-2 ₈₆₋₁₀₀	LEEVLNLAQSKNFHL
hIL-2 ₉₁₋₁₀₅	NLAQSKNFHLRPRDL
hIL-2 ₉₆₋₁₁₀	KNFHLRPRDLISNIN
hIL-2 ₁₀₁₋₁₁₅	RPRDLISNINVIVLE
hIL-2 ₁₀₆₋₁₂₀	ISNINVIVLELKGSE
hIL-2 ₁₁₁₋₁₂₅	VIVLELKGSETTFMC
hIL-2 ₁₁₆₋₁₃₀	LKGSETTFMCEYADE
hIL-2 ₁₂₁₋₁₃₅	TTFMCEYADETATIV
hIL-2 ₁₂₆₋₁₄₀	EYADETATIVEFLNR
hIL-2 ₁₃₁₋₁₄₅	TATIVEFLNRWITFC
Pro ₁₁₁₋₁₂₅	TATIVEFLNRWITFS
hIL-2 ₁₃₆₋₁₅₀	EFLNRWITFCQSIIS
Pro ₁₁₆₋₁₃₀	EFLNRWITFSQSIIS
hIL-2 ₁₄₁₋₁₅₃	WITFCQSIISTLT
Pro ₁₂₁₋₁₃₃	WITFSQSIISTLT
hIL-2 ₁₃₉₋₁₅₃	NRWITFCQSIISTLT
Pro ₁₂₉₋₁₃₃	NRWITFSQSIISTLT

10 La producción de IFN-g por PBMC a partir de DS (n = 14, círculos cerrados) o pacientes con DT1 (n = 13, círculos
 abiertos) se cuantificó mediante ELISPOT después de la estimulación con péptidos de hIL-2 o Proleukin (Pro) (10
 µM/cada uno) que dieron una respuesta positiva en el análisis inicial del grupo, IA-2 intracelular, lisado de adenovirus
 (AdV) o PHA. Se representa el número de células formadoras de puntos de IFN-g (SFC)/10⁶ PBMC, la línea discontinua
 indica el límite positivo y el área sombreada en gris muestra respuestas indetectables (es decir, idénticas a las
 15 respuestas de fondo espontáneas; véase material y métodos para la determinación del umbral). El porcentaje de DT1
 positivos (número superior) y DS (número inferior) se indica para cada afección, con antígenos que producen
 respuestas significativamente diferentes entre DS y pacientes con DT1 en negrita (P <0,03 por la prueba exacta de
 Fisher).

Se muestran los resultados en la figura 6.

Los resultados muestran que solo un péptido derivado de la secuencia de hIL-2 puede inducir la producción de IFN-g por las PBMC de pacientes con DT1 pero no por las PBMC de DS.

5 Los resultados también muestran que el péptido EFLNRWITFSQSIIS abreviado Pro116-130, derivando dicho péptido de la secuencia de hIL-2 de la proteína Proleukin®, puede inducir la producción de IFN-g en una frecuencia significativamente mayor en PBMC de DT1 en comparación con las PBMC de DS.

10 Conclusión

Debido a que los pacientes con DT1 presentan linfocitos T específicos de IL-2 (reactivos a muchos, pero específicamente a un péptido), los resultados anteriores evidencian que los linfocitos T específicos de IL-2 (detectados por ELISPOT de IFN-g después de la reestimulación con péptidos de IL-2) podrían usarse como un biomarcador de DT1.

15 Adicionalmente, se pueden usar péptidos tales como el péptido EFLNRWITFSQSIIS derivado de la secuencia de hIL-2 para detectar una respuesta inmunitaria anti-IL-2 administrada exógenamente, Proleucina en este caso particular.

20 Ejemplo 7. Cuantificación de complejos inmunitarios IL-2/IL-2A por ELISA

Los ratones se desangraron por el seno retroorbital y se cuantificaron mediante ELISA los títulos séricos de los complejos inmunitarios IL-2/IL-2AAb. Se incubaron placas de 96 pocillos de microtitulación (Medisorp, Nunc) durante la noche a 4 °C con 100 µl/pocillo de tampón de recubrimiento de carbonato (pH 9,6) que contenía 0,5 µg/ml de anti-mIL-2 policlonal (PeproTech). Después de bloquear con PBS/BSA al 2% durante 2 h, las placas se incubaron con 50 µl de sueros diluidos en serie durante 2 h a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo con PBS/Tween20 al 0,1%, se añadió anti IgG de ratón marcado con biotina (1:5.000; Southern Biotech) a cada pocillo y las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se incubaron posteriormente con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:2.000; Invitrogen) durante 30 minutos seguido de sustrato TMB (eBioscience o BD Biosciences) durante 10 minutos. La reacción se bloqueó con ácido y las absorbancias se leyeron a 450 nm con un Detector Multimodo DTX 880 (Beckman Coulter).

Los resultados se proporcionan en la figura 7.

35 Leyenda

Se obtuvieron muestras de suero de diferentes cepas de ratones (todas hembras y de la misma edad): B6, NOD de tipo silvestre, NOD.*Idd3*^{B6}, NOD *I12*-hemicigotos: NOD.*Idd3*^{NOD/NOD-IL-2null} (NOD.*I12*^{+/-}). Títulos de suero del complejo IL-2/IL-2AAb (b) en las diferentes cepas de ratón. Los símbolos representan ratones individuales y las barras horizontales son las medianas. ns, no significativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (prueba no paramétrica de Mann-Whitney).

Tal como puede observarse sobre la figura 10, los ratones NOD presentan títulos más altos de complejos inmunitarios IL-2/IL-2A que los ratones B6.

45 Conclusión:

Debido a que NOD muestra altos títulos de complejos inmunitarios IL-2/IL-2A (como se detecta por ELISA), los resultados anteriores evidencian que los complejos inmunitarios IL-2/IL-2A (como se detecta en este caso por ELISA) podrían usarse como un biomarcador de DT1.

50 Ejemplo 8. Cuantificación de AutoAb IL-2 por citometría de flujo basada en partículas múltiples

Se acopló covalentemente mIL-2 recombinante a perlas carboxiladas (Bio-Rad Laboratories). Las perlas se activaron primero con clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida en presencia de N-hidroxisuccinimida (Thermo Fisher), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para formar intermedios reactivos con amina. Las perlas activadas se incubaron con 10 µg/ml de mIL-2 en la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente con rotación. Las perlas se bloquearon y almacenaron después de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El acoplamiento se verificó utilizando un anticuerpo monoclonal comercial anti-mIL-2 (clon JES6-1A12, eBioscience), biotina-anti-Ig de rata (BD Biosciences) y después estreptavidina PE (Invitrogen). Las perlas acopladas a mIL-2 se incubaron con sueros diluidos en serie de ratones B6 o NOD durante 2 h en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente en la oscuridad en un agitador horizontal. Las perlas se lavaron dos veces con PBS/Tween-20 al 0,05% y se incubaron durante 1 h con un anticuerpo anti-IgG murino marcado con biotina (1:250; Southern Biotech), se lavaron, se incubaron 30 minutos con estreptavidina PE (1:125; Invitrogen), se lavaron nuevamente y se resuspendió en 100 µl de PBS/Tween-20 al 0,05%. Después se analizaron las perlas en el citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences) y los datos se analizaron con el software FlowJo. Para los ensayos competitivos de mIL-2AAb, los sueros de ratones B6 o NOD (diluidos 1/10) se incubaron previamente con concentraciones crecientes de mIL-2 durante 2 h a temperatura

ambiente. Después se agregaron perlas recubiertas con mIL-2 y se procesó la citometría de flujo basada en partículas múltiples como se describe anteriormente.

Los resultados se proporcionan en la figura 8.

5 Los títulos de IgG anti-IL-2 murina se cuantificaron mediante FACS con perlas fluorescentes recubiertas con IL-2. (b) Ensayo competitivo: los sueros de un ratón B6 negativo para anti-mIL-2 (círculos cerrados) o de un ratón NOD prediabético positivo para anti-hIL-2 (círculos abiertos) se incubaron previamente durante 1 hora con cantidades crecientes de mIL-2 recombinante libre y después se cuantificaron los títulos de anti-mIL-2 por FACS con perlas fluorescentes recubiertas con IL-2. Los símbolos representan ratones individuales y las barras horizontales son las medianas. Los datos son acumulativos de al menos dos experimentos independientes.

15 Tal como puede observarse sobre la figura 8a, los ratones NOD pero no los ratones B6 presentan títulos más altos de mIL-2AAb detectados por citometría de flujo basada en partículas múltiples.

Tal como puede observarse sobre la figura 8b, los mIL-2AAb detectados por citometría de flujo basada en partículas múltiples en el suero de ratones NOD son específicos.

20 Conclusión:

Debido a que la citometría de flujo basada en partículas múltiples permite la detección de IL-2AAb específicos, los resultados anteriores evidencian que IL-2AAb (detectado por un citómetro de flujo basado en partículas múltiples por citometría de flujo basada en partículas múltiples competitiva) podría usarse como un biomarcador de DT1.

25 Ejemplo 9. Estudio de la capacidad neutralizante de AutoAb de IL-2 mediante ensayo de neutralización

30 Se cultivaron células CTLL-2 (ATCC, sin micoplasma) (104 células/pocillo) en placas de 96 pocillos en medio RPMI completo (Gibco) que no contenía mIL-2, 1 ng/ml de mIL-2 o 3 UI/ml de hIL-2 con o sin suero inactivado por calor (30 min a 56 °C) suero diluido en serie de ratones B6 o NOD. Después de 48 h, se pulsaron los cultivos 18 h con [3H]-timidina (1 µCi/pocillo) y contaron por centelleo líquido.

Los resultados se proporcionan en la figura 9.

35 Leyenda

Proliferación de células CTLL-2 cultivadas durante 3 días con 1 ng/ml de mIL-2 y diferentes concentraciones de sueros B6 (círculos cerrados) o NOD (círculos abiertos). La proliferación se expresa como porcentaje de control (CTLL-2 cultivado durante 3 días con 1 ng/ml de mIL-2 sin suero de ratón). Los símbolos y curvas representan ratones individuales y las barras horizontales son las medianas. Los datos son acumulativos de al menos dos experimentos independientes.

Tal como puede observarse sobre la figura 9, el crecimiento de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2 es inhibido solo por el suero de NOD pero no por el suero de B6; indicando que los ratones NOD presentan IL-2AAb neutralizantes.

45 Conclusión:

50 Debido a que los ensayos de neutralización basados en CTLL-2 permiten la detección de IL-2AAb neutralizantes, los resultados anteriores evidencian que los IL-2AAb neutralizantes (detectados por ensayo de neutralización *in vitro*) podrían usarse como un biomarcador de DT1.

Ejemplo 10 Cuantificación de linfocitos T específicos de IL-2 por ensayo de proliferación

55 Se generó una biblioteca de péptidos de 15 meros solapados por 12 aminoácidos que cubren la secuencia completa de mIL-2 (incluido el péptido señal) (GL-Biochem). Los péptidos (10 mmol/l) se almacenaron en DMSO a -20 °C hasta su uso. Se cultivaron esplenocitos de ratones hembra NOD de 10 a 18 semanas de edad por triplicado (4 x 10⁵ células/150 µl/pocillo) en medio sin suero X-Vivo 15 (Lonza) que contenía DMSO (control negativo), perlas de CD3-CD28 (control positivo, relación 1 perla:1 célula, Life Technologies) o péptidos (10 µmol/l). Después de 96 h, se pulsaron los cultivos 18 h con [3H]-timidina (1 µCi/pocillo) y contaron por centelleo líquido.

60 Los resultados se proporcionan en la figura 10

Leyenda

65 La proliferación (cpm) por esplenocitos prediabéticos femeninos NOD (n = 3) de 10-18 semanas se cuantificó mediante la incorporación de timidina después de 96 h de estimulación con DMSO, péptidos de mIL-2 que dieron una respuesta positiva en el análisis inicial (10 µmol/l) o perlas recubiertas con CD3-CD28 (relación 1 perla:1 célula).

Los resultados muestran que los esplenocitos NOD responden a dos péptidos derivados de la secuencia de mL-2 por proliferación celular.

5 Conclusión

Debido a que los ratones NOD presentan linfocitos T específicos de IL-2 (reactivos a dos péptidos diferentes), los resultados anteriores evidencian que los linfocitos T específicos de IL-2 (detectados por proliferación de timidina de la reestimulación con péptidos de IL-2) podrían usarse como un biomarcador de DT1.

10

Ejemplo 11. Ensayo de neutralización de IL-2 humana

Las PBMC de donantes sanos se cultivaron en placas de 96 pocillos en 75 µl/pocillo en medio RPMI sin SVF (Gibco, Francia) que contenía 1 UI/ml de hIL-2 con o sin suero inactivado por calor (30 minutos a 56 °C) (dilución 1/10) de donantes sanos hIL-2AAb⁻ o de pacientes con DT1 ahIL-2AAb⁺. Después de 5 min de estimulación, los cultivos se fijaron con 225 µl/pocillo de PBS /formaldehído al 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS/BSA al 0,2 %, las células se permeabilizaron con 100 µl/pocillo de metanol enfriado durante 10 minutos en hielo. Las células se lavaron después con PBS/BSA al 0,2% y se tiñeron con anti-CD3 PE-Cy7 (clon UCHT1; 1:200; Beckman-Coulter), CD4 anti-PerCP (clon RPA-T4 1:100; Ozyme), CD25 anti-PE (clon M-A251; 1:5; BD Biosciences y clon 3G10; 1:10; Miltenyi), Foxp3 anti-Alexa488 (clon 236A/E7; 1:20; eBiosciences) y pSTAT5 anti-Alexa647 (clon 47/Stat5(pY694); 1:20; BD Biosciences) durante 45 min a 4 °C. Las células se adquirieron en un citómetro de flujo LSRII o Fortessa y se analizaron con el software FlowJo.

15

20

Se muestran los resultados en la figura 11.

25

Los gráficos muestran que el porcentaje de Treg pSTAT5 disminuye en presencia de sueros de pacientes que contienen AutoAb anti-hIL-2 (gráfico derecho) pero no disminuye en presencia de sueros de pacientes sin AutoAb anti-hIL-2 (gráfico izquierdo).

30 Conclusión

Los resultados anteriores evidencian que los AutoAb anti-IL-2 pueden tener actividad neutralizante *in vitro*.

Ejemplo 12. Vacuna

35

Se fabricó una preparación de vacuna a partir de una emulsión de agua en aceite constituida por 50% de ISA (SEPPIC, París) y 50% de una solución acuosa del péptido sintético LTRMLTFKFKYMPKKA derivado de IL2 humana junto con KLH (100 µg/dosis).

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

<120> Métodos para el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria

45

<130> BIO 14002 Piaggio

<160> 37

50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento

60

<400> 1

Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
1 5 10 15

<210> 2

65

<211> 15

ES 2 746 553 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> fragmento

<400> 2

	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser
	1				5					10					15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> fragmento

<400> 3

	Met	Tyr	Arg	Met	Gln	Leu	Leu	Ser	Cys	Ile	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala
	1				5					10					15

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> fragmento

30 <400> 4

	Leu	Leu	Ser	Cys	Ile	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Val	Thr	Asn	Ser
	1				5					10					15

35 <210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> fragmento

<400> 5

	Ala	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Val	Thr	Asn	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser
	1				5					10					15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> fragmento

<400> 6

	Leu	Val	Thr	Asn	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr
	1				5					10					15

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT

60

ES 2 746 553 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento

5 <400> 7

	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
	1				5					10					15

10 <210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> fragmento

<400> 8

	Met	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
	1				5					10					15

20 <210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> fragmento

30 <400> 9

	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp
	1				5					10					15

35 <210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> fragmento

<400> 10

	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu
	1				5					10					15

45 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> fragmento

<400> 11

55

	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn
	1				5					10					15

60 <210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 746 553 T3

<220>
 <223> fragmento

5 <400> 12

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> fragmento

<400> 13

Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu
 1 5 10 15

20 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> fragmento

<400> 14

30 Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> fragmento

40 <400> 15

Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala
 1 5 10 15

45 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> fragmento

<400> 16

55 Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 746 553 T3

<223> fragmento

<400> 22

5 **Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu**
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento

15 <400> 23

Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> fragmento

<400> 24

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 1 5 10 15

30 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento

<400> 25

40 **Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu**
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento

50 <400> 26

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys
 1 5 10 15

55 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> fragmento

ES 2 746 553 T3

<400> 27

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu
 1 5 10 15

5

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> fragmento

<400> 28

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
 1 5 10 15

15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> fragmento

25

<400> 29

Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg
 1 5 10 15

30

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> fragmento

<400> 30

Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys
 1 5 10 15

40

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> fragmento

<400> 31

Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser
 1 5 10 15

50

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> fragmento

60

ES 2 746 553 T3

<400> 32

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
 1 5 10 15

5 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fragmento

<400> 33

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser
 1 5 10 15

15 <210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> fragmento

25 <400> 34

Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 1 5 10

30 <210> 35
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> fragmento

<400> 35

Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 1 5 10

40 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> fragmento

<400> 36

Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 1 5 10 15

50 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> fragmento

60 <400> 37

ES 2 746 553 T3

Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr
1				5					10					15

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar si un paciente tiene, una enfermedad autoinmunitaria o para evaluar la gravedad o predecir el desenlace de una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo dicho método *in vitro* una etapa de
 5 detectar o cuantificar, en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, una respuesta inmunitaria anti-IL-2, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren (SJO) y polimiositis autoinmunitaria (JO1).
2. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la respuesta inmunitaria anti-IL2 puede evidenciarse
 10 mediante la detección o cuantificación de uno o más de:
- Linfocitos B que producen AutoAb anti-IL-2;
 - anticuerpos anti-IL-2; y
 - Linfocitos T específicos de IL-2.
- 15
3. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la respuesta inmunitaria anti-IL2 puede evidenciarse mediante la detección o cuantificación de linfocitos B que producen AutoAb anti-IL-2 o anticuerpos anti-IL-2, en donde los AutoAb son AutoAb anti-IL-2 neutralizantes.
- 20
4. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método es un método para determinar si un paciente tiene o está en riesgo de tener o desarrollar, la enfermedad autoinmunitaria.
5. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método es un método para evaluar la gravedad de la enfermedad autoinmunitaria.
 25
6. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método es un método para predecir el desenlace de la enfermedad autoinmunitaria.
7. El método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la predicción/ajuste de la respuesta a IL-2 administrada exógenamente con fines terapéuticos.
 30
8. Un péptido específicamente reconocido por anticuerpos anti-IL2 o linfocitos T específicos de IL-2 de pacientes con lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y polimiositis autoinmunitaria, en donde dicho péptido consiste en la secuencia de aminoácidos:
 35
- LTRMLTFKFYMPKKA (SEQ ID NO: 1), o
 - EFLNRWITFSQSIIS (SEQ ID NO: 2).
9. Un método *in vitro* para detectar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T específicos de IL2 en una muestra biológica, en donde se usa un péptido de la reivindicación 8 para la detección.
 40
10. Un péptido como se define en la reivindicación 8 para su uso en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, en donde la enfermedad autoinmunitaria del cuerpo humano o animal se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren (SJO) y polimiositis autoinmunitaria (JO1).
 45
11. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un péptido como se define en la reivindicación 8 y un excipiente farmacéutico para su uso en un método de tratamiento terapéutico de una enfermedad del cuerpo humano o animal, en donde la enfermedad autoinmunitaria del cuerpo humano o animal se selecciona del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren (SJO) y polimiositis autoinmunitaria (JO1).
 50

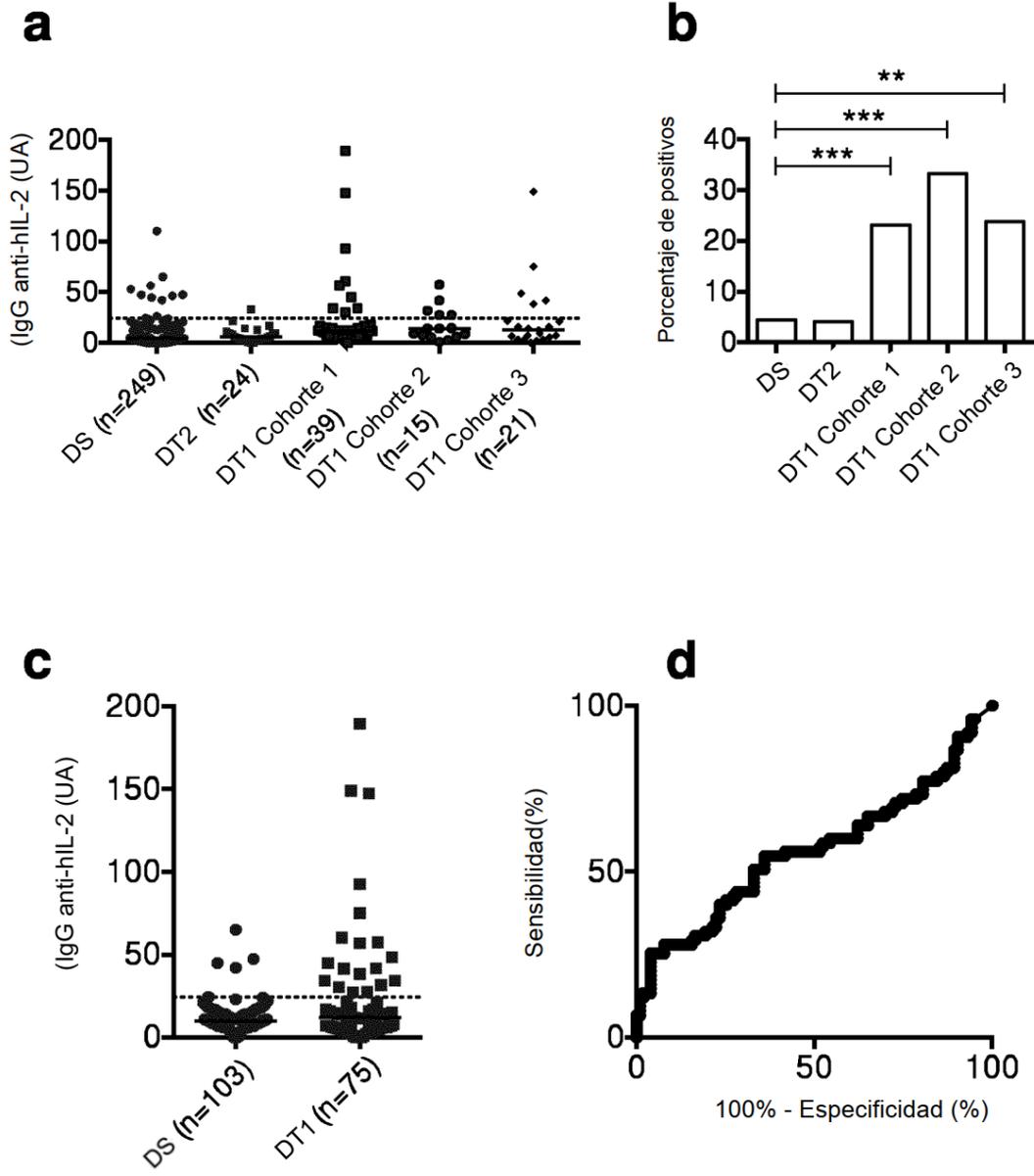


Fig. 1

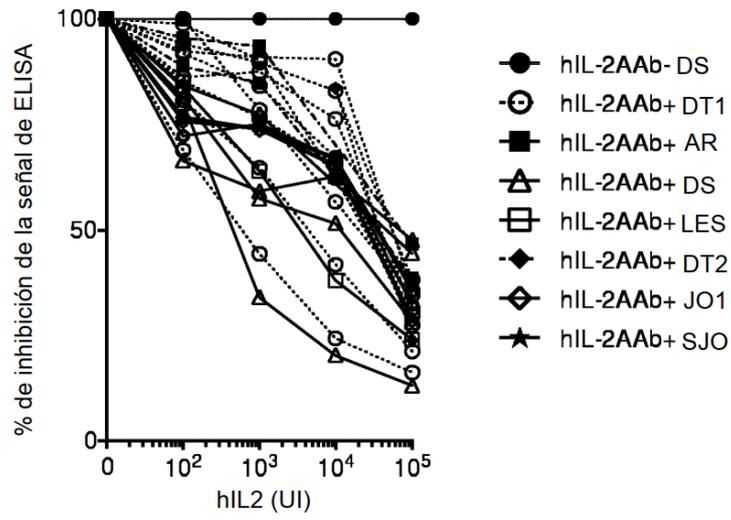


Fig. 2

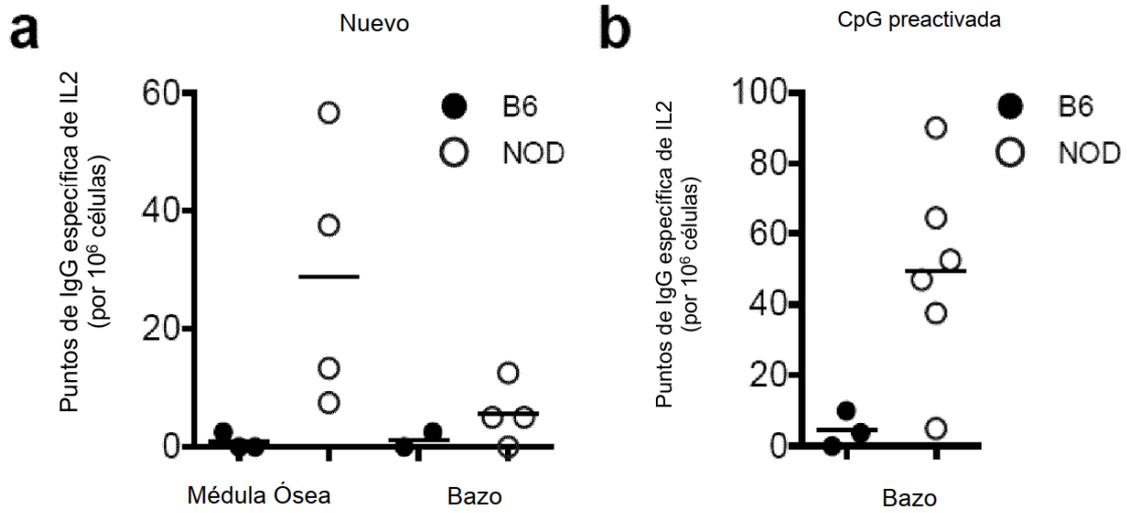
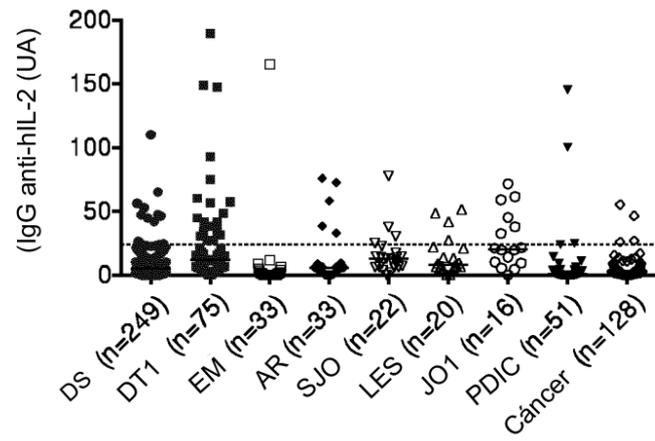


Fig. 3

a



b

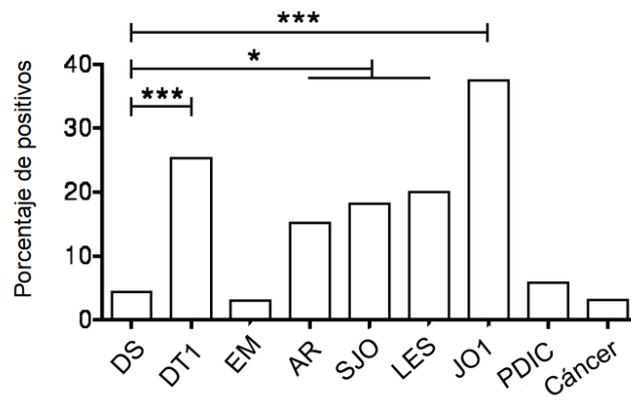


Fig. 4

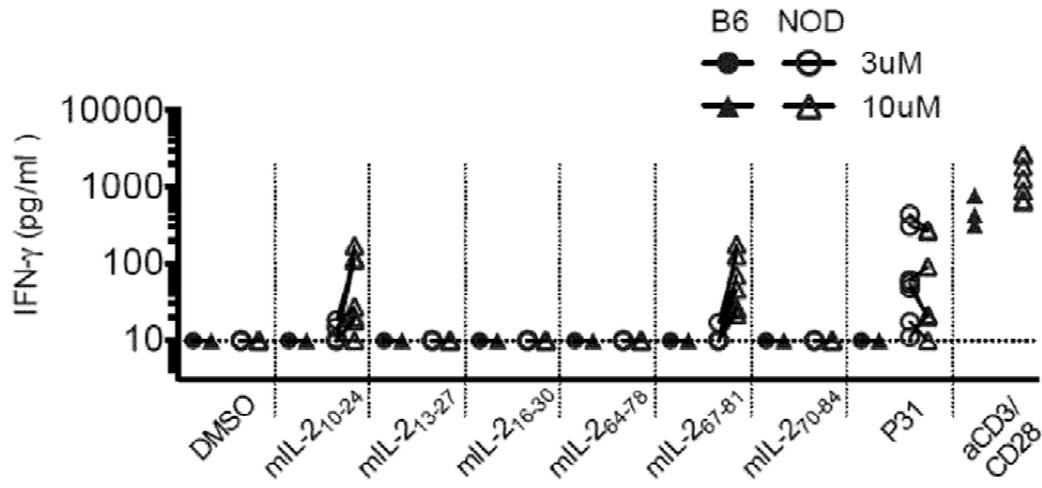


Fig. 5

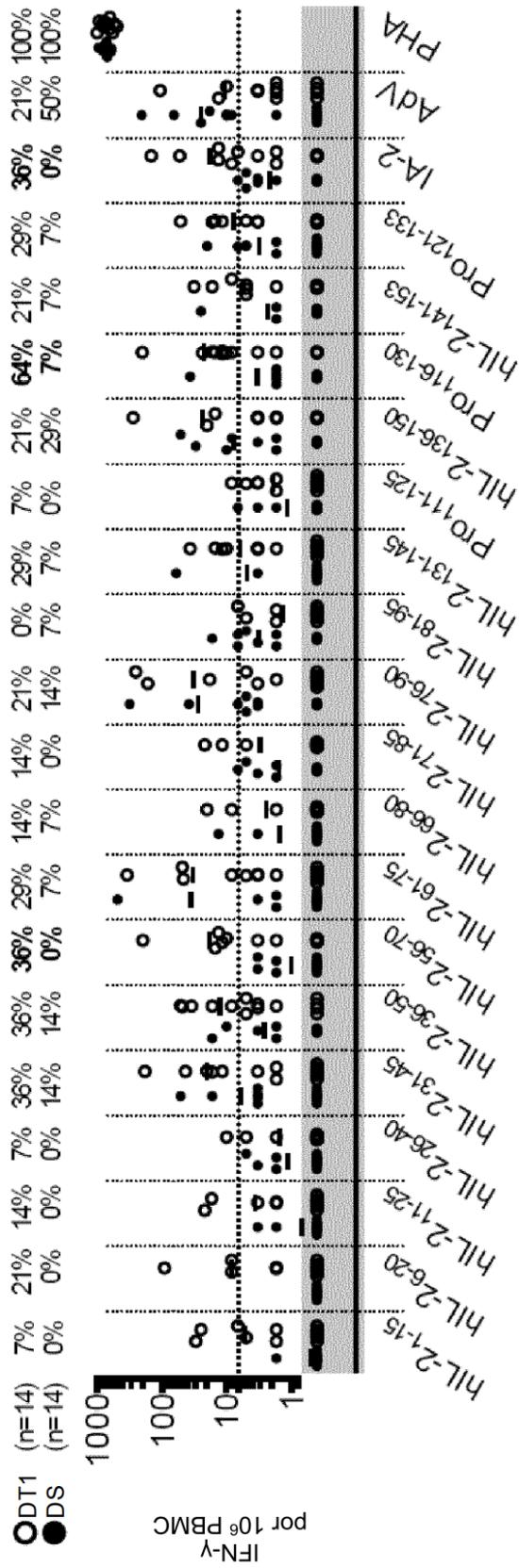


Fig. 6

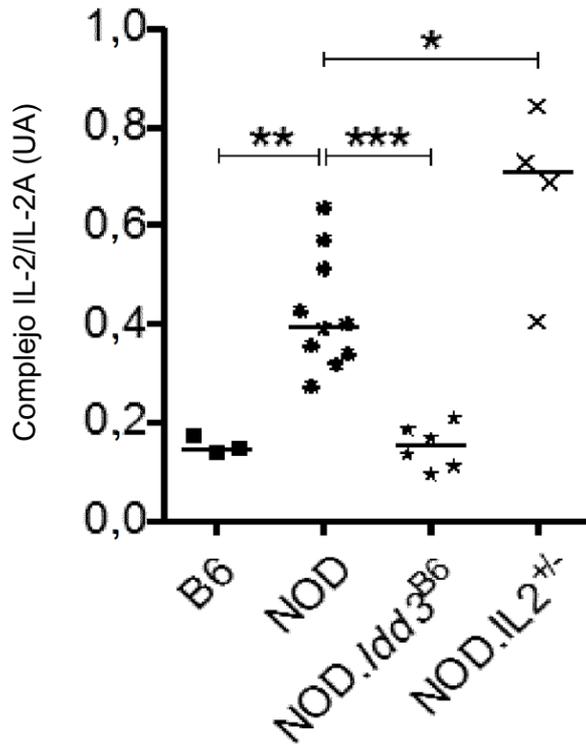
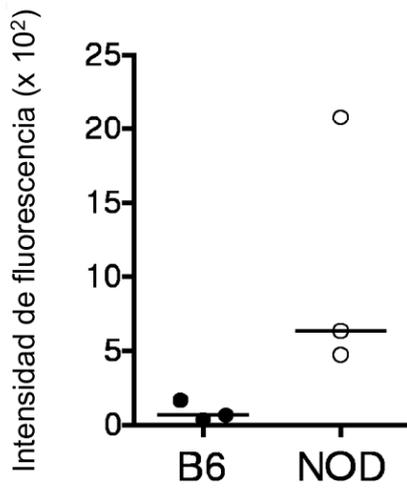


Fig. 7

a



b

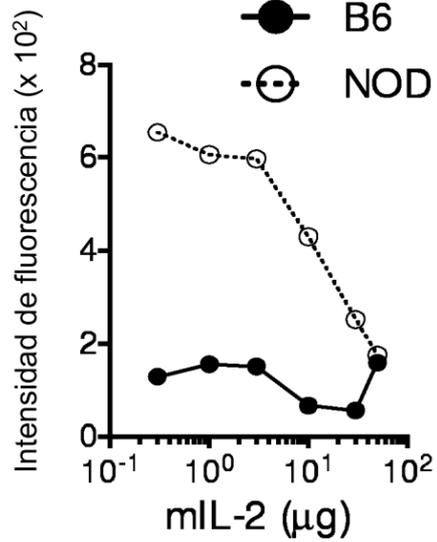


Fig. 8

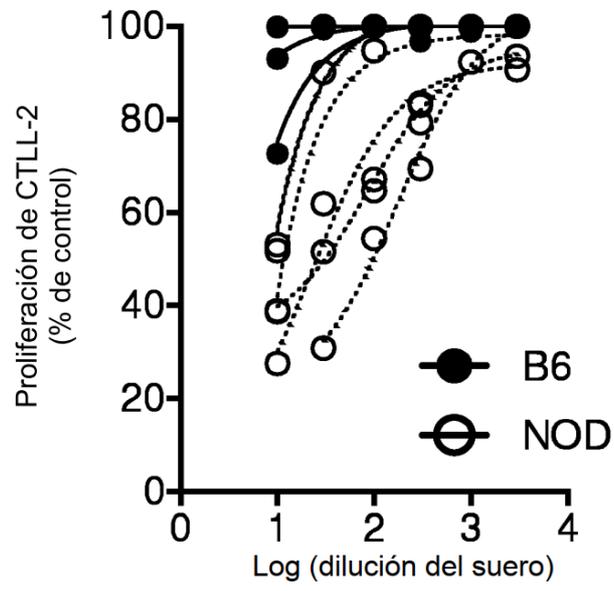


Fig. 9

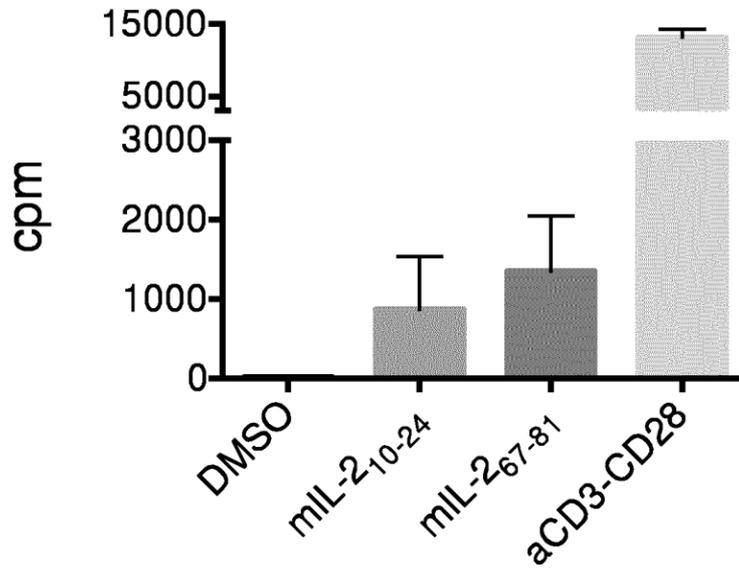


Fig. 10

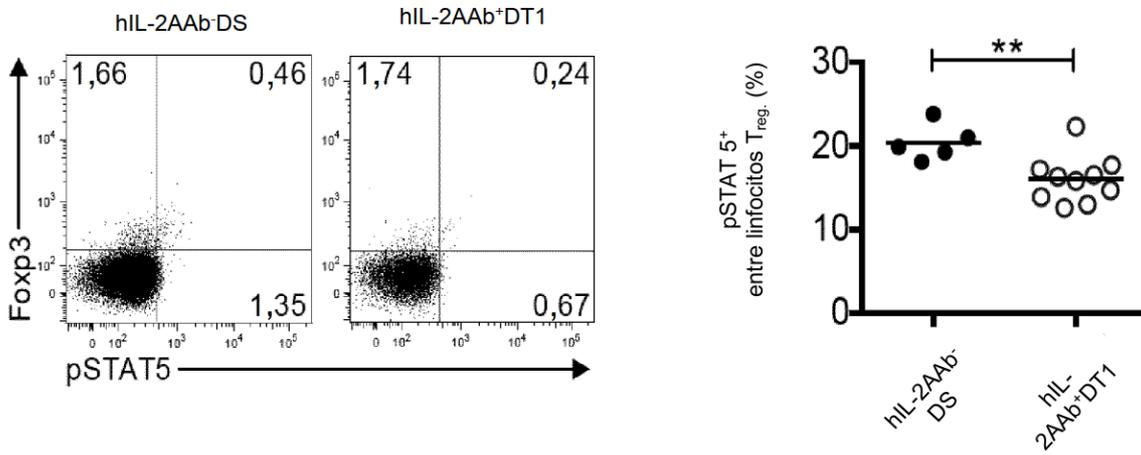


Fig. 11