

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 830**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2009 E 17159235 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3241910**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedad autoinmune como consecuencia de esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

08.10.2008 US 195658 P

24.10.2008 US 197187 P

07.11.2008 US 198631 P

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

01.10.2020

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 2 784 830 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 y tratamiento de enfermedad autoinmune como consecuencia de esclerosis múltiple

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis múltiple ("EM") es un trastorno autoinmune inflamatorio del sistema nervioso central (Compston y Coles, Lancet 372, 1502-17 (2008)). Con una prevalencia de alrededor de uno de cada 1000, la EM es la causa más común de discapacidad neurológica en adultos jóvenes (Polman y Uitdehaag, BMJ 321, 490-4 (2000)). La EM implica la participación del sistema inmune, la lesión inflamatoria aguda de los axones y la glía, la recuperación de la función y la reparación estructural, la gliosis post-inflamatoria y la neurodegeneración (véase, por ejemplo, Compston y Coles, 2008). Estos procesos secuenciales subyacen a un curso clínico caracterizado por episodios con recuperación, episodios que dejan déficits persistentes, y progresión secundaria. Ídem.

El objetivo del tratamiento de la EM es reducir la frecuencia y la gravedad de las recaídas, prevenir la discapacidad derivada de la progresión de la enfermedad, y promover la reparación de los tejidos (Compston y Coles, 2008). El enfoque principal para el tratamiento de la EM es la modulación o supresión del sistema inmune. Los fármacos para la EM disponibles actualmente incluyen interferón beta-la (por ejemplo, AVONEX y REBIF), interferón beta-lb (por ejemplo, BETASERON), acetato de glatiramer (por ejemplo, COPAXONE), mitoxantrona (por ejemplo, NOVANTRONE), y natalizumab (por ejemplo, TYSABRI). Otro nuevo fármaco prometedor para la EM es el alemtuzumab (CAMPATH-1H).

El alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD52, una proteína ampliamente distribuida en la superficie de los linfocitos y monocitos pero con una función desconocida. Alemtuzumab se ha usado para tratar la leucemia linfocítica crónica de células B. Un solo pulso de tratamiento conduce a una linfopenia rápida, profunda y prolongada. Los números de células se recuperan pero a tasas variables; las células T CD4+ son particularmente lentas para recuperarse, permaneciendo agotadas durante al menos cinco años (Coles et al., Journal of Neurology 253, 98-108 (2006)). Un ensayo de fase 2 (grupo de estudio CAMMS-223; Coles et al., N. Engl. J. Med. 359, 1786-1801 (2008)) ha demostrado que alemtuzumab es altamente eficaz en el tratamiento temprano de la esclerosis múltiple recurrente-remitente. Este fármaco reduce el riesgo de actividad de la enfermedad y la acumulación de discapacidad en más del 70% en comparación con el interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente temprana. El principal efecto adverso es la autoinmunidad, que surge en el contexto de la linfopenia de células T meses o años después de la administración. Alrededor del 20%-30% de los pacientes desarrollan autoinmunidad tiroidea, principalmente la enfermedad de Graves (Coles et al., Lancet 354, 1691-1695 (1999)), y el 3% tienen trombocitopenia inmune (TPI) (Coles et al., 2008). También se han observado casos únicos de enfermedad de Goodpasture, neutropenia autoinmune (Coles et al., Journal of Neurology 253, 98-108 (2006)), y anemia hemolítica autoinmune (observación no publicada). Además, otro 5,5% de los pacientes desarrollan autoanticuerpos no tiroideos sostenidos sin enfermedad clínica (Coles et al., 2006). El momento y el espectro de la autoinmunidad después de alemtuzumab es similar al observado en otros ejemplos de "autoinmunidad de reconstitución" en otros contextos clínicos; por ejemplo, la enfermedad tiroidea autoinmune y las citopenias autoinmunes también predominan meses o años después del trasplante de células madre hematopoyéticas o el tratamiento antirretroviral del VIH (Chen et al., Medicine (Baltimore) 84, 98-106 (2005); Daikeler y Tyndall, Best. Pract. Res. Clin. Haematol. 20, 349-360 (2007); Jubault et al., 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)).

Si bien la autoinmunidad que surge en el contexto de la linfopenia es bien reconocida en modelos animales, rara vez se encuentra y, de este modo, es difícil de estudiar en seres humanos. La mayoría de los sujetos linfopénicos no desarrollan autoinmunidad, lo que sugiere que están involucrados factores adicionales (Krupica et al., Clin Immunol 120, 121-128 (2006)). No queda claro cuáles son esos factores adicionales. Krupica et al. (Clinical Immunology 20:1, 121-128 (2006)) se refieren a la sobreproducción de IL-21 como un factor potencial para inducir autoinmunidad durante la linfopenia en ratones NOD. El agotamiento de las células reguladoras T se ha considerado como un factor, como se ve en los modelos de colitis y gastritis murinas (Alderuccio et al., J Exp. Med 178, 419-426 (1993); McHugh et al., J Immunol 168, 5979-5983 (2002); Powrie et al., Int. Immunol 5, 1461-1471 (1993); Sakaguchi et al., J Immunol 155, 1151-1164 (1995)). Sin embargo, se ha observado que las células T reguladoras aumentan después de alemtuzumab en pacientes humanos y, posteriormente, vuelven a los niveles normales (Cox et al., Eur J Immunol 35, 3332-3342 (2005)). Esta observación se ha replicado desde entonces (Bloom et al., Am J Transplant. 8, 793-802 (2008)), y está en consonancia con otros modelos linfopénicos experimentales (de Kleer, I. et al., Blood 107, 1696-1702 (2006); Zhang, H. et al., Nat Med 11, 1238-1243 (2005)).

SUMARIO DE LA INVENCION

Hemos inventado métodos y composiciones nuevas y útiles para mejorar la gestión del riesgo en el tratamiento de la EM. Los métodos y composiciones reducen los efectos secundarios del tratamiento de la EM, tal como la autoinmunidad secundaria, y ayudan a los proveedores de atención médica y a los pacientes a seleccionar

regímenes para el tratamiento de la EM y la monitorización posterior al tratamiento. Los métodos de esta invención se basan en nuestro descubrimiento de que en pacientes con esclerosis múltiple (EM), la IL-21 elevada, detectable incluso antes de la terapia de agotamiento de linfocitos, tal como la terapia con alemtuzumab, se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria después de la terapia. Además, hemos descubierto que el nivel de IL-21 de un individuo puede determinarse genéticamente: los genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, están asociados con IL-21 elevada.

La invención se define según las reivindicaciones. De este modo, la invención proporciona un método para seleccionar un paciente con esclerosis múltiple (EM) para la terapia de agotamiento de linfocitos, que comprende las etapas de:

- a) medir el nivel de IL-21 en una muestra de sangre del paciente, en el que la muestra de sangre se obtiene antes de cualquier terapia de agotamiento de linfocitos;
- b) comparar el nivel de IL-21 con el nivel de IL-21 en una muestra de sangre de control de un sujeto sin una enfermedad autoinmune, y
- c) seleccionar el paciente para la terapia de agotamiento de linfocitos si el nivel de IL-21 en la muestra de sangre del paciente no está elevado en comparación con el nivel de IL-21 en la muestra de sangre de control.

En una realización, la medida es de ARNm que codifica IL-21 en células productoras de IL-21 en la muestra. En una realización, las células productoras de IL-21 son células Th17. En una realización, la medida es de IL-21 intracelular. En una realización, la medida comprende tinción y citometría de flujo. En una realización, la medida es IL-21 de suero. En una realización, la medida comprende el uso de un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA).

En una realización, la terapia de agotamiento de linfocitos comprende administrar un anticuerpo anti-CD52 al paciente. En una realización, el anticuerpo anti-CD52 es alemtuzumab.

La invención también proporciona un método para seleccionar un paciente con esclerosis múltiple (EM) para la terapia de agotamiento de linfocitos, que comprende las etapas de:

- a) genotipar una muestra de ADN del paciente para detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, en el que la muestra de ADN se obtiene antes de cualquier terapia de agotamiento de linfocitos, y
- b) seleccionar el paciente para terapia de agotamiento de linfocitos si dichos genotipos de SNPs no se detectan en la muestra de ADN.

En una realización, la terapia de agotamiento de linfocitos comprende administrar un anticuerpo anti-CD52 al paciente. En una realización, el anticuerpo anti-CD52 es alemtuzumab.

Aquí se describen métodos para identificar a un paciente con EM que tiene una interleucina-21 elevada (IL-21) en comparación con la IL-21 en un sujeto sin una enfermedad autoinmune. Los métodos pueden comprender la etapa de medir IL-21 en una muestra de sangre del paciente con EM, identificando así un paciente con EM que tiene IL-21 elevada en comparación con dicho sujeto. Alternativamente, los métodos pueden comprender la etapa de genotipar el paciente para detectar la presencia o ausencia en el paciente de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, en los que la presencia de uno o más de dichos genotipos está asociada con IL-21 elevada.

También se describen en el presente documento métodos para identificar a un paciente con EM que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del agotamiento de linfocitos. Los métodos pueden comprender la etapa de determinar (por ejemplo, midiendo) el nivel de interleucina-21 (IL-21) en una muestra de sangre del paciente con EM, en el que un nivel elevado de IL-21 en comparación con un sujeto sin una enfermedad autoinmune indica que el paciente tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria en comparación con los pacientes con EM sin IL-21 elevada. Alternativamente, los métodos pueden comprender la etapa de determinar (por ejemplo, mediante genotipado) la presencia o ausencia en el paciente de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, en el que la presencia de uno o más (por ejemplo, dos o tres) de dichos genotipos se asocia con un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria en comparación con pacientes con EM sin dicho uno o más genotipos. Opcionalmente, estos métodos comprenden la etapa de informar al paciente y/o su proveedor de atención médica sobre dicho mayor riesgo, y/o la etapa de registrar el mayor riesgo.

También se describen en el presente documento métodos para seleccionar o identificar a un paciente con EM que necesita una mayor monitorización para el desarrollo de una enfermedad autoinmune secundaria después de la terapia de agotamiento de linfocitos. Estos métodos pueden comprender la etapa de medir IL-21 en una muestra de sangre del paciente con EM, en el que la IL-21 elevada en dicho paciente en comparación con un sujeto sin una enfermedad autoinmune indica que el paciente necesita una mayor monitorización para el desarrollo de una enfermedad autoinmune secundaria en comparación con pacientes con EM sin IL-21 elevada. Alternativamente, los métodos pueden comprender la etapa de genotipar el paciente para detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de SNPs asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, en el que la presencia de uno o más de dichos SNPs indica que el paciente necesita una mayor monitorización para el desarrollo de una enfermedad autoinmune secundaria en comparación con pacientes con EM sin dichos uno o más genotipos. Opcionalmente, estos métodos comprenden la etapa de informar al paciente y/o su proveedor de atención médica sobre la necesidad de una mayor monitorización y/o la etapa de registrar la necesidad.

La invención también proporciona métodos para informar un tratamiento para un paciente con EM, que comprenden medir IL-21 en una muestra de sangre de dicho paciente o genotipar el paciente para detectar la presencia o ausencia de los tres fenotipos de SNPs mencionados anteriormente, y seleccionar un régimen de tratamiento apropiado para la medida de IL-21 o genotipo.

La descripción proporciona métodos para tratar la EM en un paciente que se sabe que los necesita, que comprenden las etapas de (a) obtener o determinar información sobre (i) IL-21 en una muestra de sangre del paciente (por ejemplo, midiendo IL-21 en la muestra); o (ii) la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844 G/G, y C/C en SNP rs6840978 (por ejemplo, genotipando el paciente); (b) administrar un agente terapéutico para la esclerosis múltiple a dicho paciente, y (c) opcionalmente monitorizar el paciente para el desarrollo de una enfermedad autoinmune secundaria. Los métodos de tratamiento se pueden utilizar en pacientes que tienen niveles normales de IL-21 y/o no tienen ninguno de los tres genotipos de SNPs de IL-21 mencionados anteriormente. También se describen anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab o un agente biológicamente similar), o porciones de unión a antígeno de los mismos, que pueden usarse en los métodos de tratamiento de la descripción, y usos de estos anticuerpos o porciones de unión a antígeno en la fabricación de un fármaco para uso en los métodos de tratamiento de la descripción. También se describen regímenes terapéuticos que utilizan los métodos de tratamiento de la descripción.

La descripción proporciona métodos para reducir la aparición o la gravedad de una enfermedad autoinmune secundaria en un paciente con esclerosis múltiple que ha sido o será tratado con una terapia de agotamiento de linfocitos, en el que la enfermedad autoinmune secundaria ocurre después del tratamiento con la terapia de agotamiento de linfocitos, que comprenden la etapa de administrar un antagonista de IL-21, por ejemplo antes, durante o después del tratamiento con la terapia de agotamiento de linfocitos. También se describen antagonistas de IL-21 para uso en estos métodos (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-21 o anti-receptor de IL-21, o una porción de unión a antígeno del mismo; o un receptor soluble de IL-21), y usos de estos antagonistas de IL-21 en la fabricación de un fármaco para uso en los métodos.

La descripción proporciona métodos para evaluar la capacidad de respuesta de las células T al tratamiento con una terapia de agotamiento de linfocitos en un paciente con esclerosis múltiple, que comprenden medir la caspasa-3 en las células T obtenidas de dicho paciente después de dicha terapia, en el que un aumento de la caspasa-3 en dichas células T comparada con células T de un paciente con EM que no recibe dicha terapia es indicativo de la capacidad de respuesta de las células T a dicha terapia. La medida puede implicar determinar la cantidad o concentración de caspasa-3 o ácido nucleico que codifica caspasa-3.

La descripción proporciona métodos para informar a un paciente con EM de un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del agotamiento de linfocitos, que comprenden las etapas para obtener o determinar información sobre la interleucina-21 (IL-21) en una muestra de sangre del paciente con EM, en el que IL-21 elevada en comparación con un sujeto sin una enfermedad autoinmune indica que el paciente tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria en comparación con pacientes con EM sin IL-21 elevada; e informar al paciente de un mayor riesgo o falta del mismo. Alternativamente, los métodos comprenden obtener o determinar información sobre la presencia o ausencia de uno o más de los genotipos de IL-21 mencionados anteriormente, en lugar de información sobre el nivel de IL-21 en sangre. En consecuencia, la descripción también proporciona métodos para informar a un paciente con EM de una necesidad, o falta de una necesidad, para una mayor monitorización para el desarrollo de una enfermedad autoinmune secundaria después de la terapia de agotamiento de linfocitos en función del nivel de IL-21 del paciente o la presencia o ausencia de los genotipos de IL-21 descritos anteriormente.

La descripción proporciona métodos para informar un régimen para monitorizar a un paciente con EM después de una terapia de agotamiento de linfocitos, que comprenden las etapas para obtener o determinar información sobre (i) IL-21 en una muestra de sangre del paciente; o (ii) la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo

que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844 G/G, y C/C en SNP rs6840978; y seleccionar un régimen de monitorización apropiado para el paciente basado en la información. Un régimen de monitorización apropiado puede incluir, por ejemplo, la medida de autoanticuerpos en el paciente.

5 La presente invención proporciona ventajas en la gestión de riesgos en el tratamiento de la EM. Por ejemplo, la descripción proporciona métodos para distribuir un fármaco que agota los linfocitos a un paciente para tratar la esclerosis múltiple, que comprenden las etapas de asesorar al paciente sobre el mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del tratamiento con dicho fármaco, en el que el mayor riesgo está asociado con (i) IL-21 elevada; o (ii) la presencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP
10 rs13151961, G/G en SNP rs6822844 G/G, y C/C en SNP rs6840978; y proporcionar el fármaco al paciente después de dicho asesoramiento, opcionalmente después de obtener la autorización escrita del paciente.

15 La descripción proporciona además métodos para identificar un individuo que es probable que tenga niveles elevados de interleucina-21 (IL-21) en comparación con un sujeto sin ninguna afección inflamatoria conocida, que comprenden la etapa de genotipar el individuo para detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, en el que la presencia de uno o más de dichos genotipos está asociado con IL-21 elevada.

20 En el contexto de esta invención, el agotamiento de linfocitos puede ser inducido por un tratamiento que se dirige a CD52, por ejemplo un tratamiento con un anticuerpo anti-CD52 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o una porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo anti-CD52 puede ser alemtuzumab o un agente biológicamente similar, tal como un anticuerpo que compite por unirse al CD52 con alemtuzumab.

25 En los métodos de esta invención, la medida de IL-21 puede implicar medir (por ejemplo, detectar/cuantificar) la cantidad o concentración de IL-21 o ácido nucleico que codifica IL-21 en una muestra, o la cantidad o concentración de ARNm que codifica IL-21 en células productoras de IL-21 (por ejemplo, células Th17) en la muestra. En algunas realizaciones, la medida es de IL-21 intracelular, usando, por ejemplo, tinción de citocinas y citometría de flujo. En algunas realizaciones, la medida es de IL-21 en suero, usando, por ejemplo, un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA). La descripción abarca los kits de ELISA para detectar niveles de IL-21 en un sujeto humano, que comprenden un anticuerpo anti-IL-21, o una porción de unión a antígeno del mismo, o un receptor de IL-21 soluble. Los kits pueden incluir además una instrucción que indique al usuario que tome una muestra de sangre de un sujeto
30 humano.

La información de IL-21 (incluida la medida o el genotipado) se puede obtener antes, durante o después de la terapia con EM. Los métodos de esta invención se pueden usar en el contexto de cualquier forma de EM, que incluye, pero no se limita a, esclerosis múltiple recurrente-remitente, esclerosis múltiple progresiva primaria, y esclerosis múltiple progresiva secundaria.

35 La descripción también proporciona kits para tratar la esclerosis múltiple, que comprenden un agente terapéutico que agota los linfocitos (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD52 tal como alemtuzumab); y una instrucción escrita para informar a un paciente o proveedor de atención médica sobre el potencial de un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del tratamiento con dicho agente, en el que el aumento del riesgo está indicado por o asociado con (i) IL-21 elevada, o (ii) la presencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con IL-21 elevada, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP
40 rs13151961, G/G en SNP rs6822844 G/G, y C/C en SNP rs6840978.

45 La descripción proporciona además kits para identificar un paciente con EM que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del agotamiento de linfocitos, que comprenden un anticuerpo anti-interleucina-21 (IL-21) y uno o más reactivos para detectar la unión de dicho anticuerpo a IL-21 en una muestra de sangre del paciente con EM. La descripción también proporciona kits para identificar un paciente con EM que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del agotamiento de linfocitos, que comprenden uno o más reactivos adecuados para identificar el genotipo de uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) seleccionados del grupo que consiste de: SNP rs13151961, SNP rs6822844, y SNP rs6840978, en una muestra obtenida de un individuo.

50 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras y descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

55 La FIG. 1A es un gráfico que muestra la frecuencia precursora (PF) de células T de controles sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después de alemtuzumab, no estimulado (Unstim), o después del cultivo con proteína básica de mielina (MBP) o receptor de hormona estimulante de la tiroides (TSHr). (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)

- La FIG. 1B es un gráfico que muestra el índice proliferativo (PI) de células T de controles sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después de alemtuzumab, no estimulado (Unstim), o después del cultivo con proteína básica de mielina (MBP) o receptor de hormona estimulante de la tiroides (TSHr). (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 5 La FIG. 1C es un gráfico que muestra el número total de células T viables después de 10 días en cultivo de controles sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después de alemtuzumab, no estimulado (Unstim), o después del cultivo con proteína básica de mielina (MBP) o receptor de hormona estimulante de la tiroides (TSHr). (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 10 La FIG. 1D es un gráfico que muestra el porcentaje de células T que sufren apoptosis en respuesta a ningún estímulo o después del cultivo con MBP o TSHr en cultivo de controles sanos (HC), pacientes no tratados (Pre) y a intervalos de 3 meses después de alemtuzumab. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- La FIG. 1E son gráficos y un gráfico que muestran la apoptosis pasiva de células T de controles sanos y pacientes antes y después de alemtuzumab a intervalos de 3 meses. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 15 La FIG. 1F son gráficos y un gráfico que muestran la apoptosis de células T mediada por Fas de controles sanos y pacientes antes y después de alemtuzumab a intervalos de 3 meses. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- La FIG. 1G es un gráfico que muestra la apoptosis pasiva de células T CD4+ y CD8+ de controles sanos, pacientes en tratamiento previo y a los 9 meses después de alemtuzumab. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 20 La FIG. 1H es un gráfico que muestra la apoptosis de células T CD4+ y CD8+ mediada por Fas de controles sanos, pacientes pretratados y a los 9 meses después de alemtuzumab. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- Las FIGS. 2A-2C son gráficos que muestran la expresión de ARNm de caspasa 3 en relación con la expresión de ARNm de beta-actina en (A) células T CD3+, (B) monocitos CD14+, y (C) células B CD19+, respectivamente, inmediatamente ex vivo o después de la estimulación con MBP o estimulación policlonal (anticuerpos anti-CD3/28). (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 25 La FIG. 3 son gráficos y un gráfico que muestra que la autoinmunidad después de alemtuzumab está asociada con una apoptosis excesiva de células T. En gráficos separados se muestra el porcentaje de apoptosis de células T que es pasiva (Un), mediada por Fas, o en respuesta a la estimulación de MBP o TSHr en aquellos sin autoinmunidad (Ge et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 3041-3046 (2004)) o aquellos con autoinmunidad secundaria (Ge et al., 2004). (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 30 Las FIGS. 4A y 4B son gráficos que muestran que rhIL-21 induce la apoptosis de células T *in vitro*. Muestran que (A) células T CD4+ y (B) células T CD8+, respectivamente, no estimuladas o estimuladas policlonalmente (anti-CD3/CD28), sufren apoptosis en respuesta a rhIL-21 de una manera dependiente de la dosis. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 35 Las FIGS. 5A-5D son gráficos que muestran que rhIL-21 induce la proliferación de células T *in vitro*. La FIG. 5A es un gráfico que muestra el índice proliferativo de células T CD4+ y CD8+ no estimuladas en respuesta a rhIL-21. La FIG. 5B es un gráfico que muestra el índice proliferativo de células T CD4+ y CD8+ estimuladas policlonalmente (anti-CD3/CD28) en respuesta a rhIL-21. La FIG. 5C es un gráfico que muestra la frecuencia precursora de células T CD4+ y CD8+ no estimuladas en respuesta a rhIL-21. La FIG. 5D es un gráfico que muestra la frecuencia precursora de las células T CD4+ y CD8+ estimuladas policlonalmente en respuesta a rhIL-21. (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001)
- 40 La FIG. 5E son gráficos que muestran el número de células CD4+ o CD8+ no estimuladas o estimuladas policlonalmente (anti-CD3/CD28) en diferentes canales en ausencia de, o en respuesta a, rhIL-21.
- 45 La FIG. 6A es un gráfico que muestra la IL-21 sérica 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)
- La FIG. 6B es un gráfico que muestra los niveles de IL-21 en suero antes del tratamiento (pg/ml) en los pacientes no autoinmunes (aquellos que no tenían autoinmunidad post-alemtuzumab) y los pacientes autoinmunes (aquellos que tenían autoinmunidad post-alemtuzumab).

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta invención se basa en nuestro descubrimiento de que la aparición de autoinmunidad secundaria en un paciente con EM después de una terapia de agotamiento de linfocitos (por ejemplo, después del 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 explicaciones más abajo) incluso antes de la terapia en pacientes con EM que luego desarrollan autoinmunidad secundaria después de la terapia. También hemos descubierto que después de la terapia de agotamiento de linfocitos, la IL-21 se eleva aún más dramáticamente en esos mismos pacientes, en comparación con los pacientes con EM sin signos de autoinmunidad secundaria, cuya IL-21 se eleva en un grado mucho menor. De este modo, los niveles de IL-21 predicen la aparición de autoinmunidad secundaria después de la terapia de agotamiento de linfocitos en un paciente con EM. También hemos descubierto que los genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978 están asociados con IL-21 elevada en un individuo; de este modo, genotipar un paciente con EM para detectar la presencia o ausencia de estos genotipos específicos de SNP también ayuda a predecir el riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria en el paciente después del agotamiento de linfocitos.

Primero describimos la autoinmunidad que complica el tratamiento con alemtuzumab (CAMPATH-1H) en 1999 (Coles et al., 1999), y hemos seguido observando esta complicación de lo que se reconoce cada vez más como una terapia altamente eficaz para la esclerosis múltiple recurrente-remitente (Coles et al., *J Neurology* 253, 98-108 (2006); Coles et al., 1999 y 2008). Nuestros estudios descritos a continuación incluyeron una serie de cohortes de pacientes disponibles y tenían como objetivo comprender este "modelo" sin precedentes de autoinmunidad humana que ocurre en un subconjunto de pacientes con EM tratados con alemtuzumab.

El estado inmunitario se altera radicalmente después de la exposición al alemtuzumab. Las células T que se regeneran en el ambiente linfopénico generado por alemtuzumab son altamente proliferativas y son propensas a la autorreactividad. Sin embargo, estas células son altamente inestables y de corta duración. Si bien su destino no ha sido directamente abordado previamente (King et al., *Cell* 117, 265-277 (2004)), mostramos que estas células están muriendo rápidamente por apoptosis. Los niveles altos y sostenidos de apoptosis de células T pueden explicar por qué una sola dosis de alemtuzumab induce linfopenia de células T que dura varios años, aunque la vida media de alemtuzumab circulante es de solo seis días y los precursores hematológicos no se agotan (Gilleece et al., *Blood* 82, 807-812 (1993)).

En ese contexto, mostramos que los pacientes con autoinmunidad secundaria tienen tasas más altas de apoptosis de células T, pero no mayor linfopenia de células T, que aquellos sin autoinmunidad, lo que sugiere un mayor ciclo celular en este grupo. Estas perturbaciones del ciclo de las células T están asociadas con una expresión de IL-21 en suero significativamente más alta, que hemos encontrado genéticamente determinada en al menos algunos casos. Además, la susceptibilidad a la autoinmunidad asociada a la linfopenia se manifiesta antes del agotamiento de los linfocitos, con niveles de IL-21 previos al tratamiento que predicen con precisión (valor predictivo positivo de más del 70%, por ejemplo 83%, y valor predictivo negativo de más del 62%, por ejemplo 72%) el desarrollo de autoinmunidad de meses a años después de la exposición al alemtuzumab. Sin desear limitarnos a ninguna teoría, creemos que al conducir los ciclos de expansión y muerte de las células T al exceso, IL-21 aumenta las oportunidades estocásticas para que las células T se encuentren con el autoantígeno y rompan la tolerancia, promoviendo así la autoinmunidad.

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

Esta invención proporciona métodos para manejar pacientes con EM cuando se considera la terapia de agotamiento de linfocitos tal como la terapia con alemtuzumab. Por ejemplo, nuestra invención proporciona métodos para identificar un paciente con EM que tiene IL-21 elevada en comparación con la norma (es decir, niveles de IL-21 en los sujetos de control como se describe a continuación), y métodos para identificar un paciente con EM que está con mayor riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria después del agotamiento de linfocitos. Estos métodos comprenden la etapa de medir IL-21 (por ejemplo, niveles de proteína intracelular o extracelular, niveles de transcrito de ARN, o niveles de actividad de IL-21; véanse las explicaciones más abajo) en una muestra de sangre del paciente, y comparar el valor de IL-21 con el valor normal de IL-21. Alternativamente, en lugar de o además del análisis de sangre, se puede genotipar el paciente para detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de SNP de A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, en el que la presencia de uno, dos o los tres genotipos se asocia con IL-21 elevada. Como se discutió anteriormente, la IL-21 elevada se asocia con un mayor riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria en el paciente con EM después del agotamiento de linfocitos, en comparación con los pacientes con EM que no tienen IL-21 elevada.

La identificación de un paciente por los métodos de la invención puede ser seguida por una serie de etapas adicionales. Por ejemplo, se puede informar al paciente sobre el mayor riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria después de la terapia de agotamiento de linfocitos, o la falta de dicho riesgo, en función de su nivel de IL-21 o genotipo. De este modo, la invención permitirá el asesoramiento individualizado de los riesgos de la terapia antes del compromiso con la terapia. El proveedor de atención médica puede considerar opciones terapéuticas en

vista del riesgo de autoinmunidad secundaria, y proporcionar una recomendación, que incluye, por ejemplo, administrar un antagonista de IL-21 antes, durante o después de la terapia de agotamiento de linfocitos, o seleccionar un régimen de tratamiento que no implique el agotamiento de linfocitos.

5 El proveedor de atención médica también puede considerar planes de gestión de riesgos para un paciente que elige someterse a una terapia de agotamiento de linfocitos. Por ejemplo, el proveedor de atención médica puede informar al paciente de la necesidad de una mayor monitorización para el desarrollo de autoinmunidad secundaria después de la terapia de agotamiento de linfocitos en vista de su mayor riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria. El proveedor de atención médica también puede recomendar un régimen de monitorización apropiado después de la terapia de agotamiento de linfocitos. Un régimen de monitorización apropiado para pacientes en riesgo puede incluir, sin limitación, una monitorización más frecuente de la autoinmunidad secundaria después de la 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. Es posible que sea necesario continuar la monitorización durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo más de un año, dos años, tres años, cuatro años, cinco años o más, porque algunos pacientes pueden no presentarse con autoinmunidad secundaria hasta mucho después de un año después de la terapia de agotamiento de linfocitos. La mayor monitorización también puede implicar, por ejemplo, un examen médico más completo (por ejemplo, más análisis de sangre) por parte de un especialista para detectar cualquier signo de autoinmunidad secundaria. Además, los farmacéuticos o el personal clínico que distribuyen un fármaco que agota los linfocitos a un paciente para tratar la EM pueden estar obligados a aconsejar al paciente sobre el mayor riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria después del uso del fármaco, en el caso de que el paciente tenga un nivel elevado de IL-21 y/o tenga los genotipos particulares de IL-21 descritos en este documento que se han asociado con IL-21 sérica elevada. Los farmacéuticos o el personal clínico también pueden estar obligados a obtener la autorización escrita del paciente antes de distribuir el fármaco al paciente.

Pacientes con esclerosis múltiple

25 Los métodos de esta invención pueden usarse en el contexto de cualquier forma de EM, por ejemplo EM recurrente-remitente, EM progresiva primaria, y EM progresiva secundaria. Los pacientes con EM en el contexto de esta invención son aquellos que han sido diagnosticados con una forma de EM por, por ejemplo, el historial de síntomas y el examen neurológico con la ayuda de ensayos tales como imágenes de resonancia magnética (IRM), punciones espinales, ensayos potenciales provocados, y análisis de laboratorio de muestras de sangre.

30 La esclerosis múltiple ("EM"), también conocida como esclerosis diseminada, es una afección autoinmune en la que el sistema inmunitario ataca el sistema nervioso central y conduce a la desmielinización (Compston y Coles, 2008). La EM destruye una capa de grasa llamada vaina de mielina que se envuelve alrededor de y aísla eléctricamente las fibras nerviosas. Casi cualquier síntoma neurológico puede aparecer con la enfermedad, y a menudo progresa a discapacidad física y cognitiva (Compston y Coles, 2008). La EM toma varias formas. Los nuevos síntomas pueden aparecer en ataques discretos (formas recurrentes) o acumularse lentamente con el tiempo (formas progresivas) (Lublin et al., *Neurology* 46 (4), 907-11 (1996)). Entre los ataques, los síntomas pueden desaparecer por completo (remisión), pero a menudo ocurren problemas neurológicos permanentes, especialmente a medida que avanza la enfermedad (Lublin et al., 1996). Se han descrito varios subtipos, o patrones de progresión, que son importantes para el pronóstico y las decisiones terapéuticas. En 1996, la United States National Multiple Sclerosis Society estandarizó cuatro definiciones de subtipo: recurrente-remitente, progresiva secundaria, progresiva primaria, y recurrente progresiva (Lublin et al., 1996).

El subtipo recurrente-remitente se caracteriza por ataques agudos impredecibles, llamados exacerbaciones o recaídas, seguidos de períodos de meses a años de relativa calma (remisión) sin nuevos signos de actividad de la enfermedad. Esto describe el curso inicial de la mayoría de las personas con EM (Lublin et al., 1996).

45 La EM progresiva secundaria comienza con un curso recurrente-remitente, pero posteriormente evoluciona hacia un deterioro neurológico progresivo entre ataques agudos sin períodos definidos de remisión, aunque pueden aparecer recaídas ocasionales y remisiones menores (Lublin et al., 1996).

50 El subtipo progresivo primario se caracteriza por una progresión gradual pero constante de discapacidad sin remisión evidente después de que aparecen sus síntomas iniciales de EM (Miller et al., *Lancet Neurol* 6 (10), 903-12 (2007)). Se caracteriza por la progresión de la discapacidad desde el inicio, sin remisiones y mejoras, o solo ocasionales y menores (Lublin et al., 1996). La edad de inicio del subtipo progresivo primario suele ser posterior a la de otros subtipos (Miller et al., 2007)).

La EM recurrente progresiva se caracteriza por una disminución neurológica constante con ataques agudos que pueden ser seguidos o no por alguna recuperación. Este es el menos común de todos los subtipos descritos anteriormente (Lublin et al., 1996).

55 También se han descrito casos con comportamiento no estándar, a veces denominados formas límite de EM (Fontaine, *Rev. Neurol. (Paris)* 157 (8-9 Pt 2): 929-34 (2001)). Estas formas incluyen la enfermedad de Devic, la

esclerosis concéntrica de Balo, la esclerosis difusa de Schilder, y la esclerosis múltiple de Marburgo (Capello et al., *Neurol. Sci.* 25 Suppl 4: S361-3 (2004); Hainfellner et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 55 (12): 1194-6 (1992)).

Agotamiento de linfocitos en pacientes con esclerosis múltiple

5 Como se usa en el presente documento, el “agotamiento de linfocitos” es un tipo de inmunosupresión por reducción de linfocitos circulantes, por ejemplo células T y/o células B, que da como resultado linfopenia. El agotamiento linfocitario prolongado se observa cuando, por ejemplo, se usa un trasplante autólogo de médula ósea (TMO) o irradiación linfoide total para tratar la esclerosis múltiple. Véase, por ejemplo, Cox et al., *Eur. J. Immunol.* 35, 3332-3342 (2005). Por ejemplo, el agotamiento de linfocitos se puede lograr mediante el uso combinado de timoglobulina, ciclofosfamida e irradiación de todo el cuerpo. El agotamiento de linfocitos en pacientes con EM también se puede
10 lograr mediante una serie de tratamientos farmacológicos. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-CD52 humanizado, CAMPATH-1H (alemtuzumab), se ha utilizado en la terapia de agotamiento de linfocitos para tratar pacientes con EM. Se ha demostrado que la linfopenia inducida por CAMPATH-1H reduce eficazmente la inflamación del sistema nervioso central, tanto clínica como radiológicamente (Coles et al., *Ann. Neurol.* 46, 296-304 (1999); Coles et al., 2008).

15 También se pueden usar otros agentes en la terapia de agotamiento de linfocitos para tratar pacientes con EM. Estos agentes pueden ser aquellos que causan la muerte celular de los linfocitos o inhiben las funciones de los linfocitos. Incluyen, sin limitación, (1) agentes dirigidos a células que portan CD-52, tales como agentes biológicamente similares al alemtuzumab, es decir, otros anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos) que se unen al mismo epítipo o a un epítipo diferente como alemtuzumab o
20 compiten con alemtuzumab para unirse a CD52, y polipéptidos CD52 solubles que compiten con CD52 de superficie celular por la unión a ligando o ligandos de CD52; (2) biomoléculas tales como péptidos, proteínas y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, o humanos) que se dirigen a las moléculas de la superficie celular en los linfocitos, tales como los anticuerpos anti-CD4, los anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, rituximab), anticuerpos anti-TCR y anticuerpos anti-integrina (por ejemplo, natalizumab); (3) citotoxinas (por ejemplo, agentes inductores de apoptosis, ciclofosamida, agentes alquilantes, e intercaladores de ADN) suministrados de forma
25 específica o no específica a los linfocitos; y (4) porciones de unión a antígeno de los anticuerpos mencionados anteriormente. Los anticuerpos pueden incluir, sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos bifuncionales, anticuerpos oligoclonales, y anticuerpos policlonales.

30 La expresión “porción de unión a antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al mismo antígeno que el anticuerpo completo del que se deriva la porción. Los ejemplos de “porción de unión a antígeno” 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 aislada (CDR), scFv, y un diacuerpo. Los anticuerpos y las porciones de
35 unión a antígeno de los mismos útiles en esta invención pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica.

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

Autoinmunidad secundaria en pacientes con EM

40 La autoinmunidad se denomina en el presente documento “autoinmunidad secundaria” cuando surge después del inicio de una primera enfermedad (“primaria”), por ejemplo una enfermedad autoinmune “primaria”. La autoinmunidad secundaria a veces surge en pacientes con EM que tienen o han tenido linfopenia después de, por ejemplo, terapia de agotamiento de linfocitos. En algunos individuos, la autoinmunidad secundaria surge poco después de la terapia de agotamiento de linfocitos (por ejemplo, tratamiento con alemtuzumab). En otros individuos, la autoinmunidad secundaria puede no surgir hasta meses o años después de la terapia de agotamiento de
45 linfocitos; en algunos de esos individuos, para el momento en que desarrollan inmunidad secundaria, es posible que se haya producido una recuperación sustancial de linfocitos (recuento total de linfocitos) de modo que ya no sean linfopénicos.

50 La autoinmunidad secundaria que surge en pacientes con EM linfopénicos puede ser cualquier tipo de afección autoinmune distinta de la EM, incluyendo, pero sin limitarse a, la autoinmunidad tiroidea (por ejemplo, enfermedad de Graves), trombocitopenia inmune (TPI), enfermedad de Goodpasture, neutropenia autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, y linfopenia autoinmune. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para diagnosticar y monitorizar estas enfermedades autoinmunes, que incluyen la evaluación de los síntomas y el examen médico, tal como el análisis de sangre. La invención contempla el uso de cualquier método conocido. Por ejemplo, los niveles de autoanticuerpos en el fluido corporal de un paciente (por ejemplo, sangre) se pueden
55 determinar como un medio para detectar signos de autoinmunidad. Específicamente, se pueden medir los anticuerpos antinucleares, los anticuerpos anti-músculo liso y los anticuerpos anti-mitocondriales. En el caso de que se detecten anticuerpos antinucleares, se pueden realizar ensayos adicionales para medir los anticuerpos anti-ADN de doble cadena, los anticuerpos anti-ribonucleoproteína, y los anticuerpos anti-La. Los anticuerpos anti-tiroide

peroxidasa (TPO) y anti-receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) se pueden medir para detectar enfermedades tiroideas autoinmunes; si se detectan anticuerpos anti-TPO o anti-receptor de TSH, se puede medir si la función tiroidea se ve afectada al medir los niveles de T3 libre, T4 libre y TSH. Los anticuerpos antiplaquetarios se pueden medir para detectar trombocitopenia autoinmune; y una medida de los niveles de plaquetas en sangre puede servir para determinar si la presencia de anticuerpos antiplaquetarios está causando una reducción en el número de plaquetas.

Medida de IL-21

En los métodos de esta invención, la IL-21 se puede medir mediante varias técnicas. IL-21 es miembro de la familia de las citocinas relacionadas con gamma-c, y tiene una potente actividad para promover la proliferación de células T y B y la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK). La IL-21 se expresa principalmente por las células T CD4+ activadas (por ejemplo, células Th17), y es importante en las respuestas inmunes T auxiliares tipo I (Th1) (Weiss et al., *Expert Opin Biol. Ther.* 7, 1705-1721 (2007); Sivakumar et al., *Immunology* 112, 177-182 (2004)). El gen de IL-21 humano codifica un precursor de polipéptido de 162 restos de aminoácidos y una proteína madura completamente procesada de 133 restos de aminoácidos (alrededor de 15 kD); el gen se encuentra en el cromosoma humano 4q26-27 (Sivakumar et al., 2004). El receptor para IL-21 (IL-21R) se ha encontrado en células B periféricas en reposo, células mononucleares de sangre periférica activadas, y en el centro germinal de los ganglios linfáticos humanos (Marleau et al., *J. Leukocyte Biol.* 78, 575-584 (2005)).

Los métodos para medir IL-21 son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se puede obtener una muestra de líquido corporal (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, saliva, o líquido cefalorraquídeo) de un paciente, y el nivel de IL-21 en la muestra se puede medir mediante cualquier ensayo adecuado para la detección de proteínas, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoensayos tales como ensayos de inmunosorción ligados a enzimas (ELISA). Los kits comerciales de ELISA para medir IL-21 humana están disponibles, por ejemplo, en KOMABIOTECH (Seúl, Corea), Bender MedSystems (Burlingame, CA), y eBioscience (San Diego, CA).

Alternativamente, los niveles de transcritos de IL-21 en células productoras de IL-21 (por ejemplo, células Th17) obtenidas del paciente pueden medirse mediante análisis de transferencia Northern y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR). Los métodos para aislar células Th17 son bien conocidos en la técnica, y el aislamiento se puede hacer usando kits comercialmente disponibles, por ejemplo kits de Miltenyi Biotec (Auburn, CA), eBioscience (San Diego, CA). En algunas realizaciones, los niveles de IL-21 se miden mediante tinción de citocinas y citometría de flujo en la que se usa un anticuerpo anti-IL-21 unido a un resto detectable para detectar el nivel intracelular de IL-21 en células productoras de IL-21 del paciente. La IL-21 también se puede medir en términos de actividad en un ensayo biológico, por ejemplo midiendo las respuestas proliferativas de las células T a una combinación de IL-21 e IL-15 utilizando, por ejemplo, CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) (Zeng et al., *Curr. Protoc. Immunol.* 78:6.30.1-6.30.8 (2007)). Otro método para medir IL-21 se basa en la fosforilación de tirosina inducida por IL-21 de Stat3 en células T CD8(+) esplénicas usando un análisis basado en citometría de flujo (Zeng et al., 2007). Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente otros medios adecuados para medir IL-21.

En los métodos de esta invención, el valor de referencia (o índice) para determinar si un paciente tiene IL-21 elevada (anormalmente alta) es el valor de IL-21 de un sujeto de control, o el valor medio de IL-21 de un grupo de sujetos de control, obtenido usando el mismo ensayo que se realiza al mismo tiempo o en otro diferente. El sujeto de control es un sujeto normal o sano, que, en este contexto, es un individuo sin ninguna afección inflamatoria conocida en curso, incluyendo sin una enfermedad autoinmune (sin ningún síntoma detectable de una enfermedad autoinmune). En algunas realizaciones, los sujetos de control no son linfopénicos. Un aumento del nivel de IL-21 en alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, diez veces, veinte veces, treinta veces, cuarenta veces, cincuenta veces, cien veces, o más, puede considerarse un aumento significativo. Se pueden aplicar ciertos análisis estadísticos para determinar si el nivel de IL-21 en una muestra de ensayo es significativamente diferente del nivel de control. Dichos análisis estadísticos son bien conocidos por los expertos en la técnica, y pueden incluir, sin limitación, ensayos paramétricos (por ejemplo, prueba de la t de Student de dos colas) o no paramétricos (por ejemplo, prueba de la U de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Detección de genotipos de SNP de IL-21

En algunos métodos de esta invención, el genotipado se usa para predecir si un paciente es propenso a tener (es decir, en riesgo de tener o probablemente tener) IL-21 elevada y, de este modo, en riesgo de desarrollar autoinmunidad secundaria mientras tiene linfopenia. "Genotipado" se refiere al proceso de determinar el genotipo de un individuo mediante el uso de ensayos biológicos. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de genotipado, e incluyen, sin limitación, PCR, secuenciación de ADN, sondas de oligo específicas de alelo (ASO), e hibridación con micromatrices de ADN o perlas. El genotipado puede ser parcial, es decir, solo se determina una pequeña fracción del genotipo de un individuo. En el contexto de esta invención, solo se necesitan detectar ciertos SNPs. Un SNP es una variación de secuencia de ADN que ocurre cuando un solo nucleótido - A, T, C, o G - en una porción correspondiente del genoma difiere entre los miembros de una especie o entre los cromosomas emparejados en un individuo. A los SNPs humanos conocidos se les asignan números de identificación SNP de

referencia (refSNP o rs) en el archivo de dominio público Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) alojado en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

5 Los presentes inventores han descubierto que los genotipos menores de SNP 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 las personas que no tienen estos genotipos. Los pacientes con EM que tienen uno o más de estos fenotipos de SNP, de este modo, tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar autoinmunidad secundaria después del agotamiento de los linfocitos, en comparación con los pacientes con EM que no tienen estos genotipos.

Momento de obtención de información sobre IL-21

10 Obtener información sobre IL-21 (niveles de IL-21 o genotipos de SNP relacionados con IL-21) de un paciente con EM es útil para seleccionar el tratamiento y los regímenes de monitorización posteriores al tratamiento para el paciente. Cuando se obtiene la información antes de la terapia de EM, se puede informar al paciente sobre el riesgo relativo de desarrollar autoinmunidad secundaria después de la terapia de agotamiento de linfocitos, y se pueden tomar decisiones de tratamiento en consecuencia. El paciente también puede ser informado de la necesidad de una mayor monitorización posterior al tratamiento, por ejemplo un examen más frecuente y más completo por parte de un especialista, si está clasificado como "en riesgo". De este modo, la información de IL-21 mejora la gestión del riesgo (por parte de médicos, farmacéuticos y pacientes) en el tratamiento de la EM.

20 Obtener información de IL-21 durante o después del tratamiento de la EM también será útil para monitorizar el desarrollo y el tratamiento de la autoinmunidad secundaria. Como se señaló anteriormente y se describe más adelante, hemos descubierto que después de la terapia de agotamiento de linfocitos, los pacientes con EM que desarrollan autoinmunidad secundaria tienen un aumento mucho mayor en su IL-21 sérica, en comparación con los pacientes con EM que no desarrollan autoinmunidad secundaria. El último grupo de pacientes con EM produce solo un poco más de IL-21 después del agotamiento de linfocitos. De este modo, al medir la producción de IL-21 después del tratamiento de agotamiento de linfocitos, también se puede predecir el riesgo de autoinmunidad secundaria, que puede no ocurrir hasta meses o años después del tratamiento.

25 Tratamiento de la autoinmunidad secundaria

30 Una enfermedad de autoinmunidad secundaria que surge en pacientes con EM puede tratarse según el tipo de enfermedad. La autoinmunidad secundaria puede tratarse usando una dosis eficaz de un antagonista de IL-21. Un antagonista de IL-21 puede ser un agente terapéutico que inhibe la actividad de IL-21, por ejemplo un agente que inhibe la interacción entre IL-21 e IL-21R. "Una dosis eficaz" se refiere a la cantidad de un agente inhibidor suficiente para inhibir la actividad de IL-21 en un paciente de tal manera que se alivian o previenen los síntomas de la enfermedad autoinmune secundaria. Los antagonistas de IL-21 pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos contra proteínas humanas IL-21 o IL-21R, o IL-21R soluble. Véase también, por ejemplo, la patente U.S. nº 7.410.780 y la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº 20080241098. Las composiciones farmacéuticas que contienen un antagonista de IL-21 pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas que contienen antagonistas de IL-21 se pueden administrar a un paciente usando un método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Kits para tratar y evaluar pacientes con EM

40 La presente descripción proporciona kits para tratar la esclerosis múltiple. Un kit puede contener, entre otros, un fármaco que agota los linfocitos (por ejemplo, alemtuzumab) y una instrucción por escrito para informar a un paciente o un proveedor de atención médica sobre las contraindicaciones del fármaco, por ejemplo, la posibilidad de un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del tratamiento con el fármaco. El aumento del riesgo puede estar asociado o indicado por (i) IL-21 elevada, o (ii) la presencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978.

50 La descripción también proporciona kits para detectar IL-21 en suero en un paciente con EM, y/o para identificar pacientes con EM con mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del agotamiento de linfocitos. Dichos kits pueden comprender un anticuerpo anti-IL-21, o una porción de unión a antígeno del mismo, o un receptor soluble de IL-21, y opcionalmente una instrucción que indique al usuario que tome una muestra de sangre de un paciente, y opcionalmente uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo, porción o receptor soluble de IL-21 a IL-21 en la muestra de sangre del paciente con EM. Dichos kits habrán sido validados o aprobados por una autoridad reguladora apropiada para realizar diagnósticos médicos en pacientes, tales como pacientes con EM.

55 La descripción también proporciona kits para identificar un paciente con EM que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune secundaria después del agotamiento de linfocitos. Los kits pueden comprender uno o más reactivos adecuados para identificar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de SNP seleccionados del

grupo que consiste en: SNP rs13151961, SNP rs6822844, y SNP rs6840978, en una muestra obtenida de un paciente con EM, y una instrucción que dirige a un usuario a tomar una muestra de un paciente con EM.

Evaluación de la capacidad de respuesta de las células T al tratamiento de la EM

5 Esta descripción proporciona métodos para evaluar la capacidad de respuesta de las células T al tratamiento con
 10 terapia de agotamiento de linfocitos en un paciente con EM. Los métodos implican medir la caspasa-3 en células T
 obtenidas del paciente después del tratamiento. Un aumento en caspasa-3 (por ejemplo, proteína caspasa-3,
 transcrito de ARN, y/o niveles de actividad) en las células T en comparación con las células T de un paciente con
 EM que no recibe el tratamiento indica que las células T en el paciente tratado han respondido al tratamiento. Estos
 métodos se basan en nuestro descubrimiento de que las células T de personas con EM no tratada son resistentes a
 la apoptosis, y que esta resistencia está asociada con la subexpresión de caspasa-3. Pero después de la terapia de
 agotamiento de linfocitos, la expresión de caspasa-3 aumenta significativamente en las células T, alcanzando los
 niveles observados en personas sanas.

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

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento
 tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto normal en la técnica a la que pertenece esta
 invención. A continuación se describen métodos y materiales ejemplares, aunque también se pueden usar métodos
 y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o evaluación de la
 presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Aunque
 aquí se citan varios documentos, esta cita no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forme
 parte del conocimiento general común en la técnica. A lo largo de esta memoria descriptiva y realizaciones, se
 entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la
 30 inclusión de un número entero o grupo de números enteros pero no la exclusión de ningún otro número entero o
 grupo de números enteros. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar los métodos y materiales de la presente invención.

EJEMPLOS

35 En los siguientes ejemplos, todos los pacientes tenían esclerosis múltiple recurrente-remite y participaron en uno
 de los dos ensayos clínicos: CAMMS-223 y CAMMS-224 (REC 02/315 y 03/078) en los que se administró
 alemtuzumab por infusión intravenosa de 12-24 mg/día durante cinco días, seguido de un nuevo tratamiento a los 12
 meses. Los pacientes y los controles aceptaron la flebotomía para fines de investigación (LREC 02/263), y todos
 estuvieron libres de exposición a otros agentes modificadores de la enfermedad, incluyendo los esteroides, durante
 al menos un mes en el momento del muestreo de sangre.

40 Los datos de proliferación y apoptosis de linfocitos se generaron mediante un estudio transversal de células
 recientes *ex vivo* de 65 pacientes y 21 controles sanos (7 hombres, edad media 34 años). Esto generó hipótesis
 sobre el ciclo de las células T en la patogénesis de la autoinmunidad secundaria, que se ensayaron en muestras
 disponibles nueve meses después del tratamiento con alemtuzumab, que se eligió como el punto de tiempo más
 temprano en el que la apoptosis de las células T podría analizarse de manera sólida. De las 29 muestras disponibles
 45 en este momento, 10 cumplieron con la definición de autoinmunidad de nuestro estudio (1 hombre, edad media 36
 años) en comparación con 10 sin autoinmunidad (3 hombres, edad media 38 años). La autoinmunidad se definió
 como el desarrollo de una nueva enfermedad autoinmune (con o sin autoanticuerpos), o títulos significativos
 persistentes de autoanticuerpos (presentes en al menos dos ocasiones con al menos tres meses de diferencia) sin
 enfermedad clínica. "Sin autoinmunidad" se definió como la ausencia de una enfermedad autoinmune y
 autoanticuerpos durante al menos 18 meses después de alemtuzumab en este estudio. De los diez pacientes con
 50 autoinmunidad, tres tenían autoanticuerpos únicamente (anticuerpos antinucleares). A continuación, la IL-21 en
 suero se midió en serie en: 15 pacientes seleccionados al azar con autoinmunidad - cinco de los cuales habían sido
 estudiados como anteriormente (tres hombres, edad media 34 años; doce con autoinmunidad tiroidea, uno con
 enfermedad de Goodpasture, uno con TPI, y uno con anticuerpos antinucleares solamente), y quince pacientes
 55 seleccionados al azar sin autoinmunidad - seis de los cuales habían sido estudiados como anteriormente (cinco
 hombres, edad media 31 años) y diecinueve controles sanos (siete hombres, edad media 33 años).

73 sujetos fueron estudiados para el análisis genético. De estos, 23 cumplían la definición de “sin autoinmunidad”, y 27 tenían autoinmunidad secundaria después de alemtuzumab (seis con autoanticuerpos solamente: cuatro con anticuerpos antinucleares y dos con anticuerpos anti-músculo liso; dieciocho con autoinmunidad tiroidea, dos con TPI y uno con enfermedad de Goodpasture). Los 23 sujetos restantes no pudieron clasificarse según la producción transitoria de autoanticuerpos y/o el tiempo insuficiente desde el tratamiento con alemtuzumab.

Para todos los análisis estadísticos descritos en los siguientes ejemplos, los datos se analizaron utilizando SPSS 12.0.1 para Windows. Después de la evaluación de la normalidad, se realizaron ensayos paramétricos (prueba de la t de Student) o no paramétricos (Wilcoxon-Mann-Whitney). Los valores de P se expresan en todo el texto, en el que un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo, modificado por una corrección de Bonferroni cuando se indica.

Ejemplo 1: Alemtuzumab induce una linfopenia de células T.

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

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

Para varios ensayos realizados en este Ejemplo, se usaron diferentes muestras transversales y longitudinales de acuerdo con la disponibilidad. Como preludeo para medir el ciclo celular de los linfocitos después de alemtuzumab, examinamos la respuesta proliferativa de las células T, no estimuladas o en cultivo con proteína básica de mielina (MBP) o el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHr), entre pacientes no tratados con esclerosis múltiple y controles normales (FIGS. 1A y 1B).

A. Cultivos de células mononucleares periféricas

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de sangre heparinizada mediante centrifugación en un gradiente de densidad Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech). Las PBMCs enteras se suspendieron inmediatamente en medio de cultivo (RPMI) que contenía 1% de penicilina, 1% de estreptomina y 10% de suero de ternera fetal (Sigma S5394), y se ajustaron a una concentración de 10^6 /ml de células viables (determinado por exclusión con azul de tripano). Para inducir la muerte celular pasiva, las PBMCs se incubaron durante 72 horas en medios solos, sin factores de crecimiento adicionales. La apoptosis mediada por Fas se indujo cultivando PBMCs durante 48 horas con anti-CD28 soluble (1 μ g/ml: amablemente donado por M. Frewin, Universidad de Oxford) en placas pre-recubiertas con mAb anti-CD3 (1 μ g/ml -BD Pharmingen), seguido de 18 horas de incubación con anti-Fas humana activante (clon CH11, 1 μ g/ml - Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY).

B. Detección de apoptosis

Las células T apoptóticas se detectaron mediante tinción de células con: anticuerpos monoclonales antihumanos de ratón conjugados con alofocianina contra CD3 (Serotec MCA463APC), CD4 (Serotec MCA1267APC) y CD8 (Serotec MCA1226APC), anexina V conjugada con FITC y yoduro de propidio (BD Pharmingen). La fluorescencia se detectó por citometría de flujo (FACSCALIBUR: Becton Dickinson, Mountain View, CA). Basado en la dispersión frontal y lateral, se dibujó una puerta de linfocitos amplia para incluir linfocitos vivos y apoptóticos (que tienen FSc reducido y SSc aumentado). Se recopilaron y analizaron al menos 15.000 sucesos dentro de la puerta utilizando el software WinMDI 2.8. Las células apoptóticas tempranas se definieron como anexinaV⁺PI⁻, y las células apoptóticas tardías o necróticas como anexinaV⁺PI⁺ (Aubry et al., Cytometry 37, 197-204 (1999)). La muerte celular apoptótica se definió como la muerte celular total (anexinaV⁺PI⁻ más anexinaV⁺PI⁺) bloqueada por la inhibición de la pancaspasa con Q-VD-OPh (RnD Systems OPH001).

C. Ensayos de proliferación

Las PBMCs se cargaron con el colorante de seguimiento de división celular CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína) (Lyons et al. Methods Cell Biol. 63, 375-398 (2001)), y se cultivaron con 50 μ g/ml de proteína básica de mielina (MBP: RDI-TRK8M79/LYO) o 1 μ g/ml de dominio extracelular del receptor de la hormona estimulante de la tiroides unido a una proteína de unión a la matriz (TSHr: amablemente donado por M. Ludgate, Universidad de Cardiff). Después de 10 días, la tinción de CFSE en células, identificada por marcadores de superficie específicos (CD4, CD8), se analizó por citometría de flujo. Las frecuencias precursoras (definidas como la proporción de linfocitos que dejó a la población parental sufrir al menos dos divisiones celulares) y el índice de proliferación (definido como la suma de las células en todas las generaciones dividido entre el número calculado de células parentales) se calcularon utilizando Modfit LT 3.0 (Verity Software). El número absoluto de células supervivientes se midió en comparación con un número fijo de perlas inertes (BD CALIBRITE, BD Biosciences), incluidas en cultivos.

D. Resultados

No hubo diferencias en la respuesta proliferativa de las células T, no estimuladas o en cultivo con proteína básica de mielina (MBP) o el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHr), entre pacientes no tratados con esclerosis múltiple y controles normales (FIGS. 1A y 1B). Por el contrario, la supervivencia de las células T de pacientes no tratados con esclerosis múltiple fue ≥ 4 veces mayor que la de los controles ($p < 0,005$; FIG. 1C), lo que sugiere que la muerte reducida de las células T es una característica de la esclerosis múltiple no tratada. Confirmamos esto demostrando que las células T de pacientes no tratados son resistentes tanto a la apoptosis pasiva como a la mediada por Fas en comparación con los controles 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 alemtuzumab son altamente proliferativas, propensas a la autorreactividad y susceptibles a la apoptosis

Usando los ensayos descritos en el Ejemplo 2, encontramos que después de alemtuzumab, la proporción de células T que responden a los autoantígenos (frecuencias precursoras) y el grado de proliferación (índice proliferativo) aumentaron significativamente en comparación con los pacientes no tratados y los controles sanos. Por ejemplo, en el mes 3, la proliferación de células T no estimuladas fue $>6,5$ veces la de los pacientes no tratados, y la proliferación en respuesta a la estimulación con MBP y TSHr se incrementó en 900% y 700% respectivamente (todos $p < 0,01$; FIGS. 1A y 1B). La apoptosis de células T también aumentó significativamente después de alemtuzumab. En respuesta a la estimulación antigénica, la proporción de células T que experimentaron apoptosis a los seis meses fue 10 veces mayor que al inicio (FIG. 1D; $p < 0,001$ para todos los antígenos), lo que dio como resultado menos células T viables al final del cultivo (FIG. 1C). La apoptosis pasiva y mediada por Fas también aumentó después de alemtuzumab, con tasas al menos el doble de las observadas en el grupo de control sano (pasiva: 24,5%, 22,2% y 17,9% a los 6, 9 y 12 meses, respectivamente, en comparación con 6,7% en controles, todos $p < 0,001$; mediada por Fas 37,8%, 35,8% y 29,9% a los 6, 9 y 12 meses, respectivamente, en comparación con 15,5% en controles, todos $p < 0,01$; FIGS. 1E y 1F). Se observó un aumento de la apoptosis de linfocitos después de alemtuzumab en las subpoblaciones CD4+ y CD8+ (FIGS. 1G y 1H), y persistió durante al menos 18 meses después del tratamiento con alemtuzumab (datos no mostrados).

Ejemplo 4: Células T de pacientes no tratados con esclerosis múltiple subexpresan caspasa 3

A. análisis de ARNm

Las PBMCs, inmediatamente *ex vivo* o después del cultivo con MBP o estimulación policlonal, se separaron positivamente, usando 20 μ l de perlas magnéticas (Miltenyi Biotec; CD19 Microbeads, CD3 Microbeads, CD14 Microbeads) por 1×10^7 células cargadas en una columna MACS® LS. Las células retenidas magnéticamente se eluyeron, se lavaron y se almacenaron en RNA^{later}™ a -70°C (pureza celular consistente 95-98%, datos no mostrados).

La expresión de Fas, FasL, Bcl-2, Bcl-X1, Bad, Bax, Bid, Bim, Survivina, c-FLIP, y Caspasa 3, 8 y 9 se determinó por RT-PCR semicuantitativa. El ARNm se extrajo de las células almacenadas en RNA^{later}™ usando el RNEASY Mini Kit (QIAGEN), y se transcribió inversamente a ADNc usando el PRO-STAR First Strand RT-PCR Kit (Stratagene). Los cebadores y las sondas de PCR se diseñaron utilizando PRIMER EXPRESS (PE Biosystems, Foster City, CA, USA), y se adquirieron de Oswel DNA service. La información de la secuencia de ARNm se obtuvo de GenBank. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900HT (Perkin Elmer) usando PCR Mastermix que contiene ROX (Eurogentec RT-QP2X-03). Las secuencias de los cebadores y las sondas fueron: Bcl-2 para 5'-CCT GTG GAT GAC TGA GTA CCT GAA-3' (SEQ ID NO:1), Rev 5'-CAC CTA CCC AGC CTC CGT TA-3' (SEQ ID NO:2), sonda marcada con JOE 5'-CGG CAC CTG CAC ACC TGG ATC-3' (SEQ ID NO:3); Bcl-X1 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), sonda marcada con FAM 5'-TGA CCA TCC ACT CTA CCC TCC CAC CC-3' (SEQ ID NO:6); Fas para 5'- AAA AGC ATT TTG AGC AGG AGA GTA TT-3' (SEQ ID NO:7), Rev 5'- GGC CAT TAA GAT GAG CAC CAA-3' (SEQ ID NO:8), sonda marcada 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); Survivina 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

La expresión de ARNm de células T de la caspasa 3, la caspasa efectora común a ambas rutas apoptóticas, de pacientes con esclerosis múltiple no tratada se redujo en comparación con los controles; esto fue significativo para PBMCs no estimuladas y estimuladas con MBP (en 78% y 87% respectivamente, ambos $p < 0,05$, después de la corrección para comparaciones múltiples), pero no para cultivos estimulados policlonales (FIG. 2A). Se observó una tendencia similar en las células CD14+ (pero no en las células CD19+), aunque esta diferencia no sobrevivió a la corrección para comparaciones múltiples (FIG. 2B). Después de alemtuzumab, la expresión de caspasa 3 aumentó significativamente en células T y monocitos, alcanzando niveles observados en controles sanos ($p < 0,05$; FIGS. 2A y 2B). La expresión de todos los demás genes ensayados (enumerados en los métodos) no cambió después de alemtuzumab.

De este modo, nuestros estudios muestran que las células T de personas con esclerosis múltiple no tratada son resistentes a la apoptosis, y esta resistencia está asociada con la subexpresión de caspasa 3. De acuerdo con la posición de esta caspasa efectora en el punto de convergencia de las rutas apoptóticas extrínsecas e intrínsecas, hemos demostrado resistencia de células T tanto a la apoptosis pasiva como a la mediada por Fas en nuestros pacientes. La subexpresión de caspasa 3 se ha descrito en algunas enfermedades autoinmunes, incluyendo la diabetes tipo I (Vendrame et al., Eur J Endocrinol 152, 119-125 (2005)), tiroiditis de Hashimoto y síndrome poliendocrino autoinmune 2 (Vendrame et al., J Clin Endocrinol Metab 92 (2006)). Sin embargo, este es un hallazgo novedoso en la esclerosis múltiple.

Ejemplo 5: La autoinmunidad secundaria después de alemtuzumab se asocia con una apoptosis excesiva de células T

Después de haber demostrado una mayor proliferación de linfocitos y apoptosis como respuesta genérica al tratamiento, ensayamos la relación entre la apoptosis de células T y el desarrollo de autoinmunidad después de alemtuzumab, definido como el desarrollo de una nueva enfermedad autoinmune y/o autoanticuerpos persistentes por encima del intervalo normal, después de alemtuzumab, sostenido durante al menos 3 meses. Usando esta definición, las células T derivadas de pacientes con autoinmunidad ($n = 10$) mostraron niveles significativamente más altos de muerte celular apoptótica en todas las condiciones de cultivo a los 9 meses después del tratamiento, en comparación con las células T de pacientes no autoinmunes ($n = 10$) estudiadas en el mismo punto de tiempo (no estimulada 4,7% frente a 14,4%, mediada 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 aplicó una definición más estricta de autoinmunidad, definida como el desarrollo de una enfermedad autoinmune, excluyendo la producción de anticuerpos no patógenos, la diferencia se mantuvo, a pesar de reducir el número en el grupo autoinmune a 7 (no estimulada, 4,7% frente a 15,4%; mediada 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).

No hubo diferencia en la tasa de reconstitución de células T entre los dos grupos (por ejemplo, a los 6 meses, los recuentos de CD4 son $0,15 \times 10^9/l$ frente a $0,19 \times 10^9/l$; y recuentos de CD8 $0,11 \times 10^9/l$ frente a $0,11 \times 10^9/l$ en aquellos con y sin autoinmunidad, respectivamente), lo que sugiere un mayor ciclo de las células T en el grupo autoinmune (datos no mostrados).

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

A. Ensayos de IL-21 y enriquecimiento

La IL-21 en suero se midió usando el kit EBIOSCIENCE (88-7216-86) según las instrucciones. Las placas se leyeron usando un lector de microplacas (modelo 680, BioRad) a 450 nm. Las PBMCs no estimuladas y estimuladas policlonalmente (anti-CD3 unido a placa de $1 \mu g/ml$ y anti-CD28 soluble de $1 \mu g/ml$) se añadieron con 5 pg/ml y 20 pg/ml de rhIL-21 (EBIOSCIENCE 14-8219). La apoptosis y proliferación de CD4+ y CD8+ se evaluaron como se describió anteriormente.

B. Resultados

Evaluamos el efecto de la IL-21 exógena sobre la apoptosis y la proliferación de células T humanas *in vitro*. La adición de PBMCs de controles sanos con rhIL-21 condujo a un aumento en la muerte apoptótica de las 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). La adición de células no estimuladas con rhIL-21 condujo a un aumento pequeño pero significativo en la proliferación de las células T CD4+ y CD8+; con un aumento tanto en el índice

proliferativo (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) y frecuencia precursora (CD4+ 0,007 frente a 0,014, $p = 0,016$; CD8+ 0,007 frente a 0,015, $p = 0,026$; FIG. 5C). IL-21 no afectó la proporción de células T CD4+ o CD8+ que proliferan en respuesta a la estimulación policlonal (FIG. 5D), lo que sugiere que ya estaban estimuladas al máximo. IL-21, sin embargo, condujo a un aumento significativo en el grado de proliferación de células CD8+ (índice proliferativo 11,59 frente a 19,39, $p = 0,012$; FIG. 5B).

Ejemplo 7: IL-21 predice el desarrollo de autoinmunidad secundaria después de alemtuzumab

En todos los puntos temporales en el Ejemplo 6, la concentración de IL-21 en suero fue significativamente mayor en pacientes que desarrollaron autoinmunidad secundaria en comparación con el grupo no autoinmune (para todas las comparaciones $p < 0,05$; FIG. 6A). Examinamos todas las muestras de suero previas al tratamiento de 84 pacientes que posteriormente recibieron alemtuzumab. Después de al menos dos años de seguimiento con estos pacientes, los categorizamos como pertenecientes al grupo "autoinmune" ($n = 35$: 32 pacientes con enfermedades de la tiroides, uno con TPI, uno con enfermedad de Goodpasture, y uno con alopecia) o grupo "no autoinmune" ($n = 49$: pacientes sin o con solamente autoanticuerpos transitorios (no sostenidos durante seis meses)). Estos sueros de pretratamiento tenían una concentración media estadísticamente mayor de IL-21 que los controles; sin embargo, esto fue explicado por los altos niveles de IL-21 en aquellos pacientes que desarrollaron autoinmunidad secundaria. Hubo una diferencia muy significativa en los niveles medios de IL-21 previos al tratamiento entre los que desarrollaron autoinmunidad (464 pg/ml) y los que no (229 pg/ml; $p = 0,0002$) (FIG. 6B).

La asociación entre linfopenia inducida y autoinmunidad se ha observado en modelos animales. Bajo condiciones linfopénicas, las células T restantes experimentan una extensa expansión compensatoria para reconstituir el sistema inmune. Este proceso, denominado proliferación homeostática, se basa en la estimulación a través del complejo TCR-auto-péptido-MHC (Ge et al., P.N.A.S. 101, 3041-3046 (2004); Ge et al., P.N.A.S. 98, 1728-1733 (2001); Kassiotis et al., J Exp. Med. 197, 1007-1016 (2003)) y da como resultado una población propensa a un mayor reconocimiento del autoantígeno, como se observa en nuestros estudios. Además, las células T que se expanden rápidamente adquieren el fenotipo y las características funcionales de las células de memoria, que incluyen: menor dependencia de la coestimulación, la capacidad de responder a dosis más bajas de antígeno que las células vírgenes, y la rápida secreción de citocinas inflamatorias en la reestimulación, de este modo promoviendo la ruptura de la autotolerancia (Cho et al., J Exp. Med. 192, 549-556 (2000); Goldrath et al. J Exp. Med. 192, 557-564 (2000); Murali-Krishna et al., J Immunol 165, 1733-1737 (2000); Wu et al., Nat Med. 10, 87-92 (2004)). Sin embargo, a pesar de estos cambios, la autoinmunidad no es una consecuencia inevitable de la linfopenia. De hecho, como con nuestros pacientes, la mayoría de los sujetos linfopénicos no desarrollaron autoinmunidad, lo que sugiere que se requieren "cofactores" adicionales.

Hemos demostrado aquí por primera vez en el hombre que la sobreproducción de IL-21 es la "segunda diana" requerida en el desarrollo de la autoinmunidad secundaria después del tratamiento de otro modo exitoso de la esclerosis múltiple con un agente de agotamiento de linfocitos tal como alemtuzumab. Nuestros estudios muestran que la autoinmunidad surge en pacientes con agotamiento de linfocitos, con una mayor apoptosis de células T y un ciclo celular impulsado por niveles más altos genéticamente influidos de IL-21 que son detectables incluso antes del tratamiento. Incluso antes del tratamiento, los pacientes que desarrollaron autoinmunidad secundaria tenían niveles de IL-21 en suero más del doble que el grupo no autoinmune, lo que sugiere que la IL-21 en suero puede servir como biomarcador para el riesgo de desarrollar autoinmunidad meses a años después del tratamiento con alemtuzumab. Sin desear limitarnos a ninguna teoría, creemos que, al conducir los ciclos de expansión y muerte de las células T al exceso, IL-21 aumenta la probabilidad de generar células T autorreactivas y, de este modo, de autoinmunidad. De este modo, el ciclo anormal de células T inducido por citocinas es un principio general de la autoinmunidad asociada a linfopenia.

Ejemplo 8: El genotipo de IL-21 influye en la expresión de IL-21 y se asocia con la autoinmunidad

A. Genotipado de IL-21

En total, se ensayaron cuatro SNPs, rs13151961, rs6822844, rs4833837 y rs6840978, que se encuentran en una región de desequilibrio de enlace fuerte que contiene cuatro genes, *KIAA1109-ADAD1-IL2-IL21*, en el cromosoma 4q27. Los cuatro SNPs estaban disponibles como productos Assay-On-Demand (AoD) de Applied Biosystems. El genotipado de los SNPs se realizó utilizando la metodología TaqMan de Applied Biosystems de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en máquinas de PCR de Applied Biosystems de 384 pocillos 9700 Viper, después de lo cual los genotipos se localizaron en un sistema de detección de secuencia de alto rendimiento (SDS) 7900 utilizando el software SDS Versión 2.1. Cada individuo fue genotipado por duplicado. Todos los individuos fueron genotipados adicionalmente para los factores genéticos asociados a la esclerosis múltiple: *HLA-DRB1*1501*, rs2104286 (*IL2RA*) y rs6897932 (*IL7R*).

B. Resultados

Para determinar si existe una asociación entre la variación genética y la producción de IL-21, genotipamos a 73 sujetos, en quienes se determinó la concentración de IL-21 en suero pre-alemtuzumab, para cuatro polimorfismos de

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 2
 cacctacca gcctccgta 20
 <210> 3
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 3
 15 cggcacctgc acacctggat c 21
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 4
 ttcagtcgga aatgaccaga ca 22
 <210> 5
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 30 <400> 5
 gaggatgtgg tggagcagag a 21
 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 6
 tgaccatcca ctctaccctc ccaccc 26
 <210> 7
 5 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 10 <400> 7
 aaaagcatt tgagcaggag agtatt 26
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 8
 ggccattaag atgagcacca a 21
 20 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 9
 ctagagctct gccacctctc catt 24
 <210> 10
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 10
 35 aagaaagtg cccattaac ag 22
 <210> 11

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 11
 agaaagcagg acaattccat aggt 24
 <210> 12
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 12
 15 caactcaagg tccatgctc tgg 23
 <210> 13
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 13
 ctgctggca gccctt 17
 <210> 14
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 30 <400> 14
 ctccaagaag ggccagtct t 21
 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 15
 tcaaggacca cgcactctct acatt 25
 <210> 16
 5 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 10 <400> 16
 gtggagaccc acctgctc 18
 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 17
 ggacacatca gattatcca aatcc 25
 20 <210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 18
 ctgccatcag cactctatag tccgaaaca 30
 <210> 19
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 19
 35 aggaggagat ggaaagggaa ctt 23
 <210> 20

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 20
 acctcaattc tgatctgctc acttct 26
 <210> 21
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 21
 15 ctccctacag ggtcatgctc tatcagattt cag 33
 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 22
 aagatcatac atggaagcga atca 24
 <210> 23
 25 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 30 <400> 23
 cgagatgtca ttccagtgtc tta 24
 <210> 24
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 24
 ctggaatc cctggacaac agttataa 29
 <210> 25
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 10 <400> 25
 tgccaactaa caggcaagca 20
 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 26
 gaacctctgg ttgccaatc tc 22
 20 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 27
 caaagttgtc gaagccaacc ctagaaaacc tta 33
 <210> 28
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 28
 35 cagtgcactt cgctccacat c 21
 <210> 29

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 29
 acggatcctc ttttgcata g 21
 <210> 30
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 30
 15 actccaccgg ttcccactgc cc 22
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 31
 tttctgacgg caactcaac t 21
 <210> 32
 25 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 30 <400> 32
 ggtgcacagg gccttgag 18
 <210> 33
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 33
 tgtcgccctt ttctacttg ccagca 26
 <210> 34
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 10 <400> 34
 gctgtatagc tgctccagt gtag 24
 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 35
 gctatcttcc agcctgtctt ctct 24
 20 <210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
 <400> 36
 agccctggca tgcaacagc gttc 24
 <210> 37
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 37
 35 accacaagga ttctcatga tacc 24
 <210> 38

<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
<400> 38
ccatatgaca aaatgctcaa ggaa 24
<210> 39
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética
<400> 39
15 tagccacagc cacctctctc cct 23

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar un paciente con esclerosis múltiple (EM) para la terapia de agotamiento de linfocitos, que comprende las etapas de:
- 5 a) medir el nivel de IL-21 en una muestra de sangre del paciente, en el que la muestra de sangre se obtiene antes de cualquier terapia de agotamiento de linfocitos,
- b) comparar el nivel de IL-21 con el nivel de IL-21 en una muestra de sangre de control de un sujeto sin una enfermedad autoinmune, y
- c) seleccionar el paciente para la terapia de agotamiento de linfocitos si el nivel de IL-21 en la muestra de sangre del paciente no está elevado en comparación con el nivel de IL-21 en la muestra de sangre de control.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la medida es de ARNm que codifica IL-21 en células productoras de IL-21 en la muestra.
3. El método de la reivindicación 2, en el que las células productoras de IL-21 son células Th17.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la medida es de IL-21 intracelular.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la medida comprende tinción y citometría de flujo.
- 15 6. El método de la reivindicación 1, en el que la medida es de IL-21 sérica.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la medida comprende el uso de un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA).
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la terapia de agotamiento de linfocitos comprende administrar un anticuerpo anti-CD52 al paciente.
- 20 9. El método de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo anti-CD52 es alemtuzumab.
10. Un método para seleccionar un paciente con esclerosis múltiple (EM) para la terapia de agotamiento de linfocitos, que comprende las etapas de:
- 25 a) genotipar una muestra de ADN del paciente para detectar la presencia o ausencia de uno o más genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) seleccionados del grupo que consiste en: A/A en SNP rs13151961, G/G en SNP rs6822844, y C/C en SNP rs6840978, en el que la muestra de ADN se obtiene antes de cualquier terapia de agotamiento de linfocitos, y
- b) seleccionar el paciente para terapia de agotamiento de linfocitos si dichos genotipos de SNPs no se detectan en la muestra de ADN.
- 30 11. El método de la reivindicación 10, en el que la terapia de agotamiento de linfocitos comprende administrar un anticuerpo anti-CD52 al paciente.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo anti-CD52 es alemtuzumab.

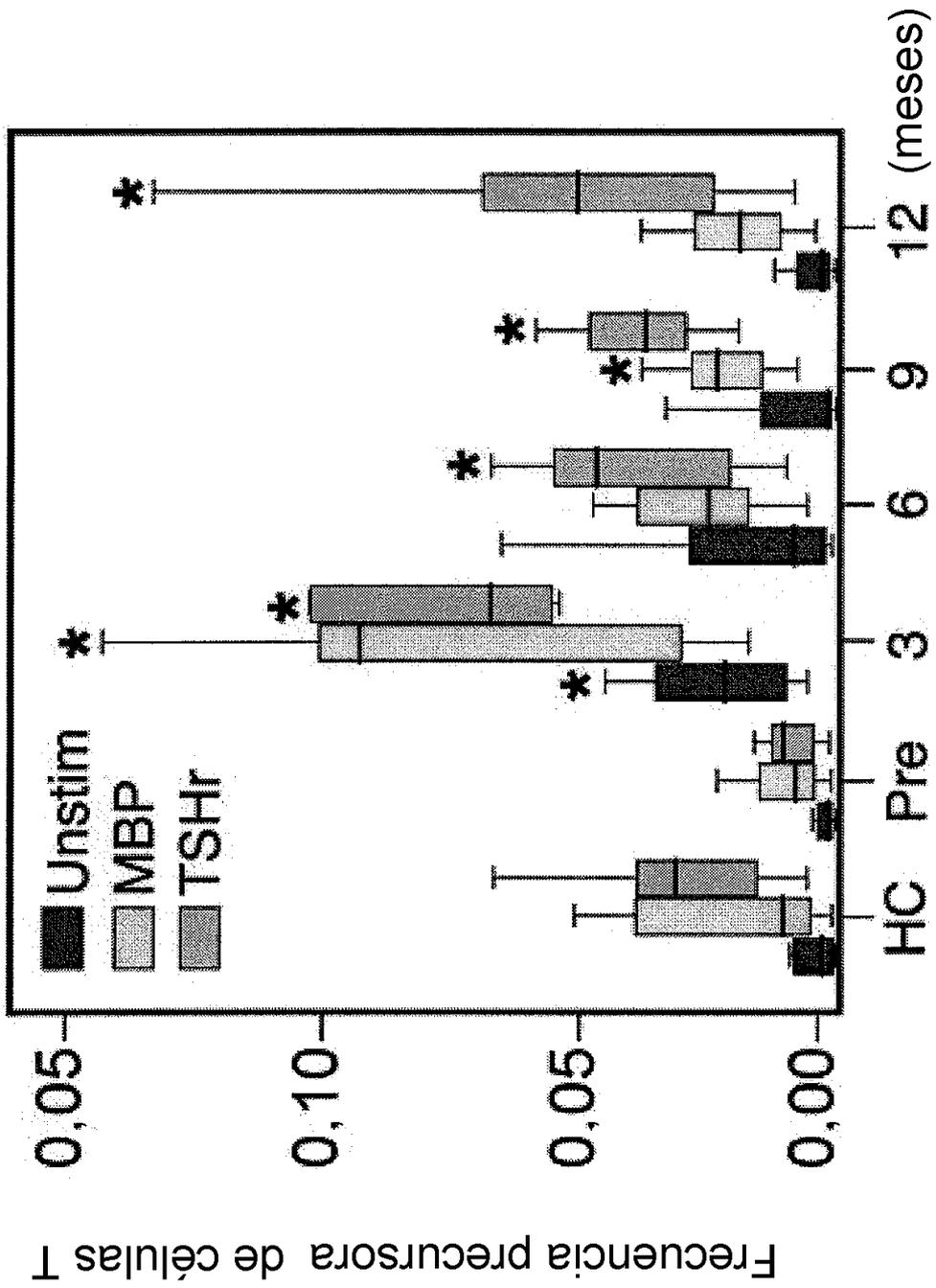


FIG. 1A

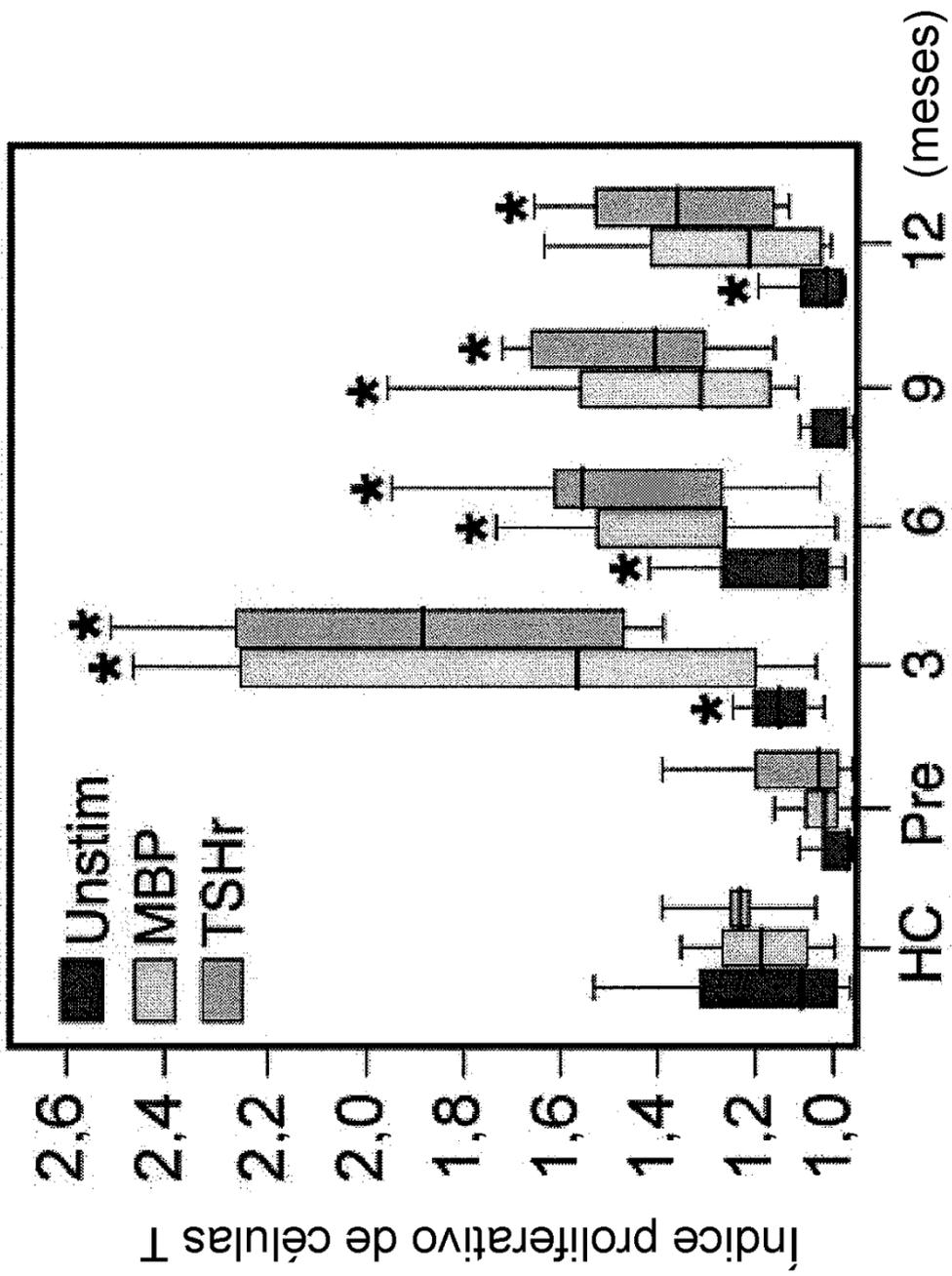


FIG. 1B

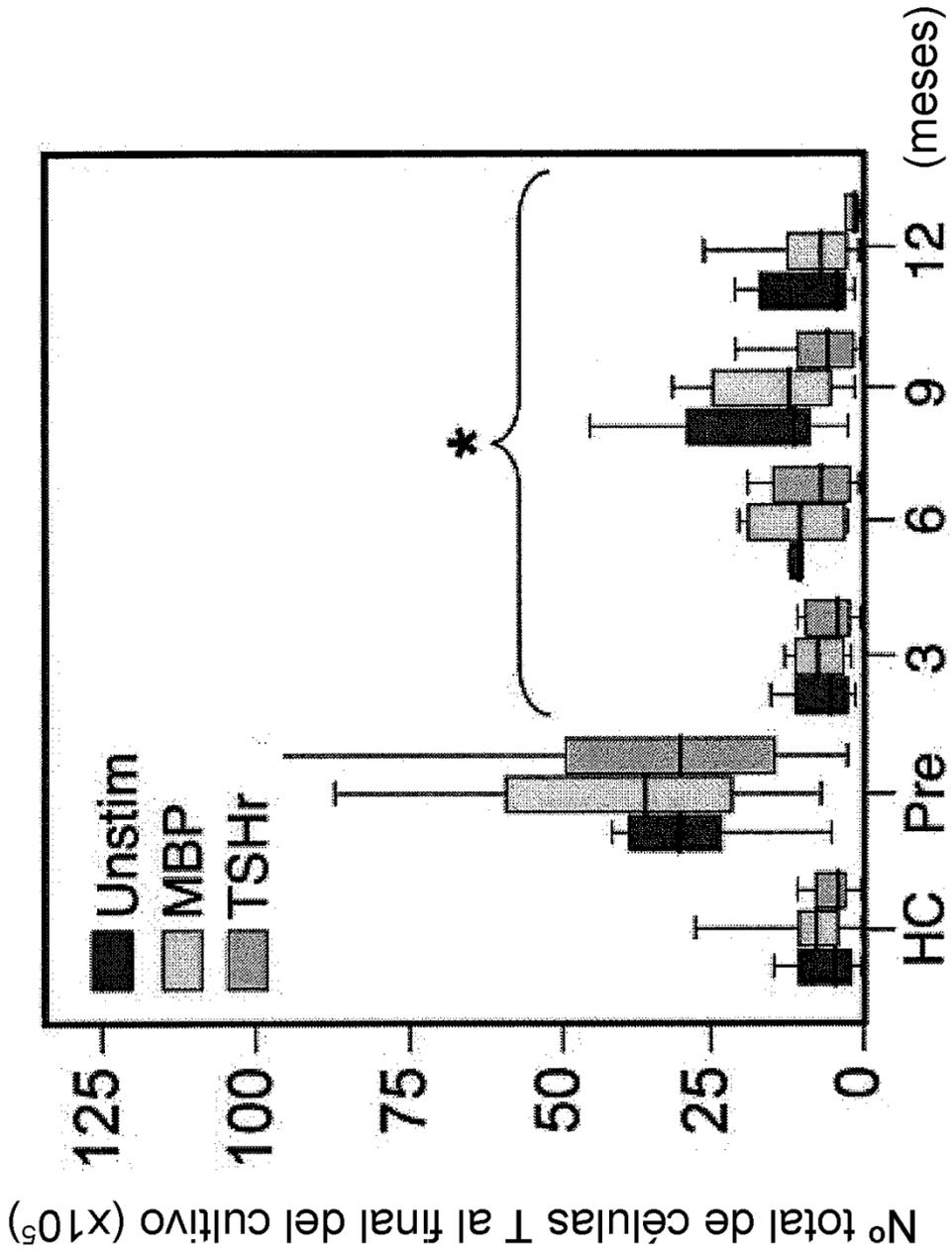


FIG. 1C

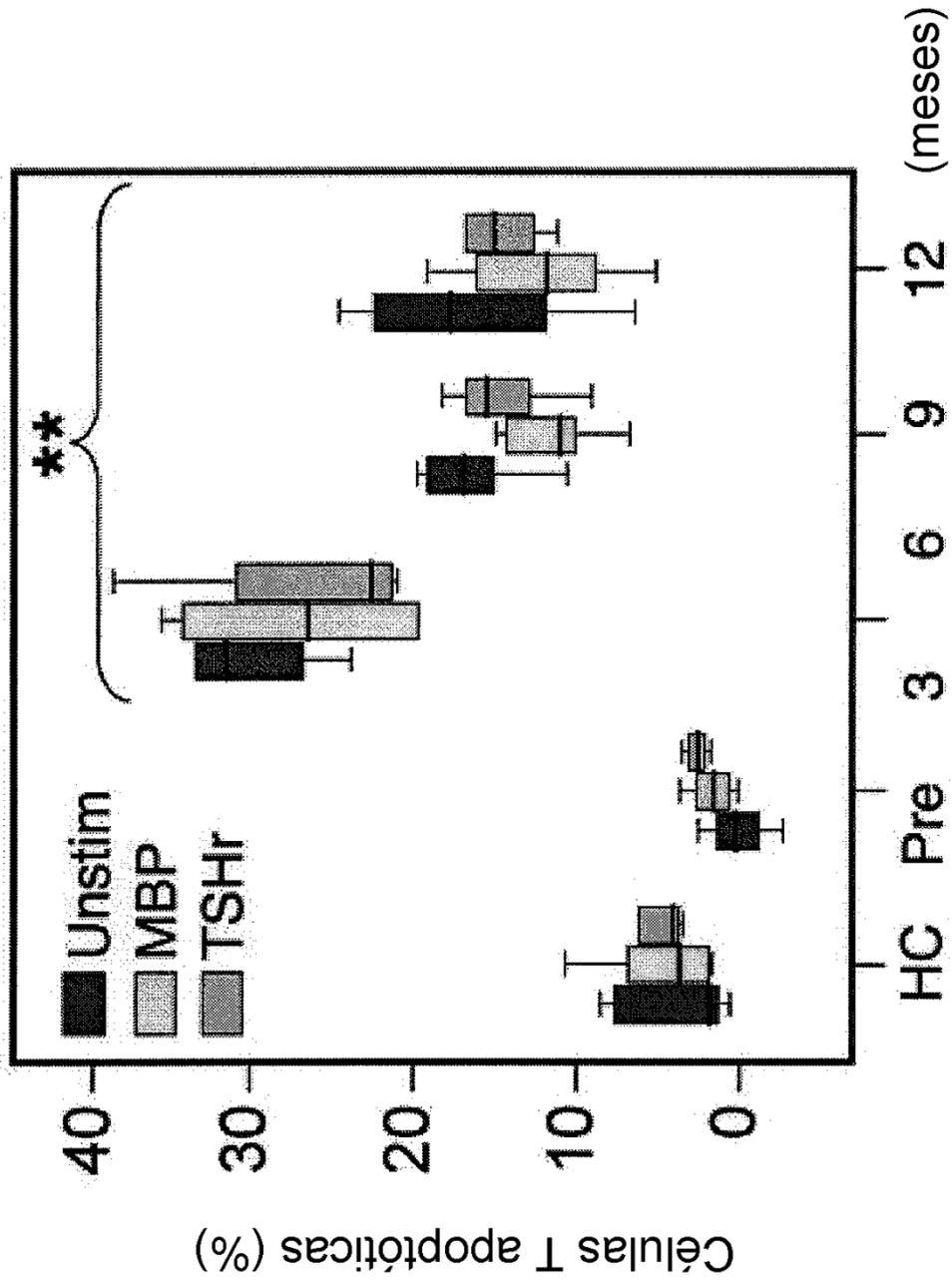


FIG. 1D

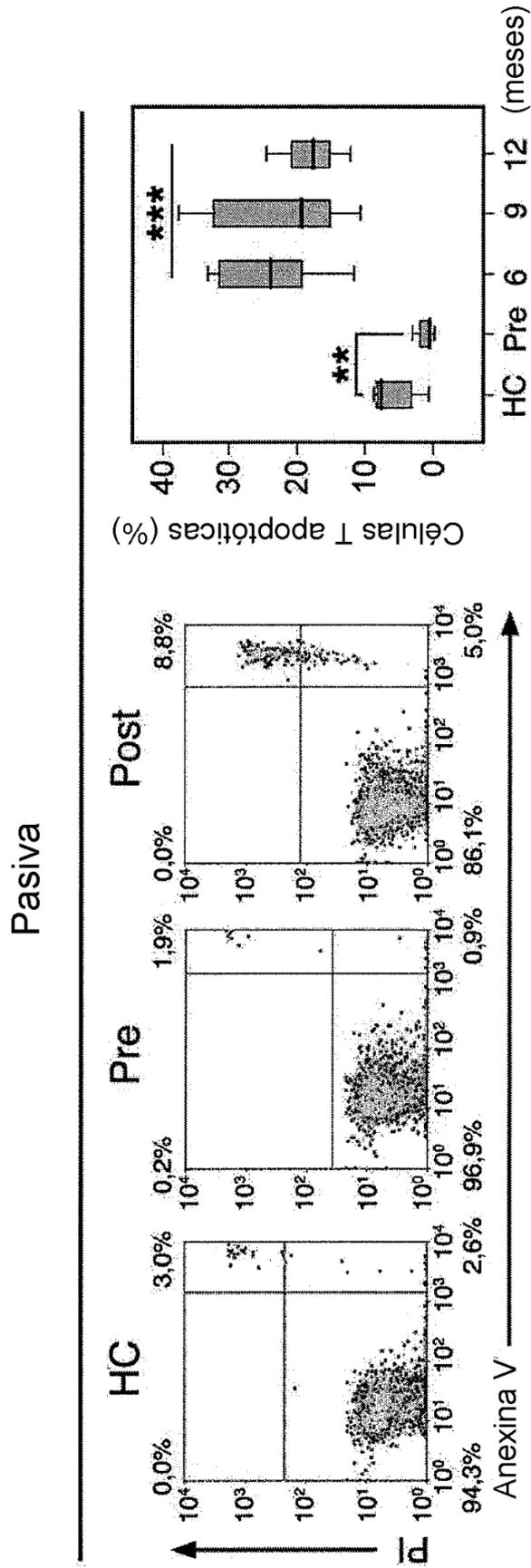


FIG. 1E

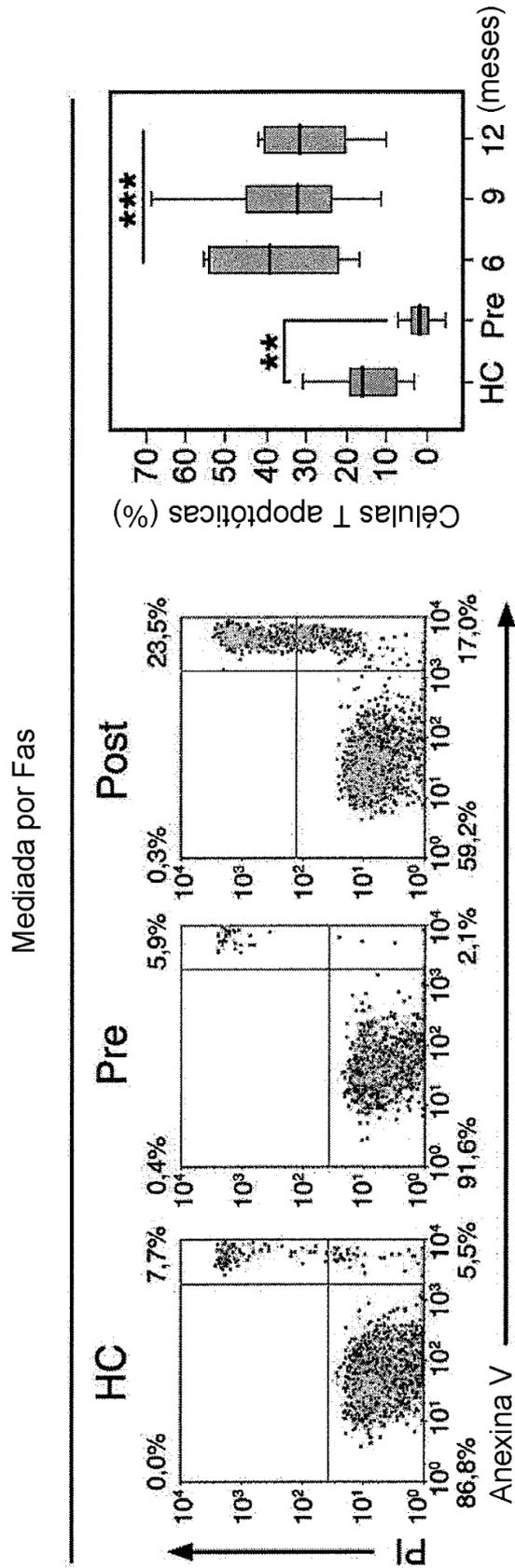


FIG. 1F

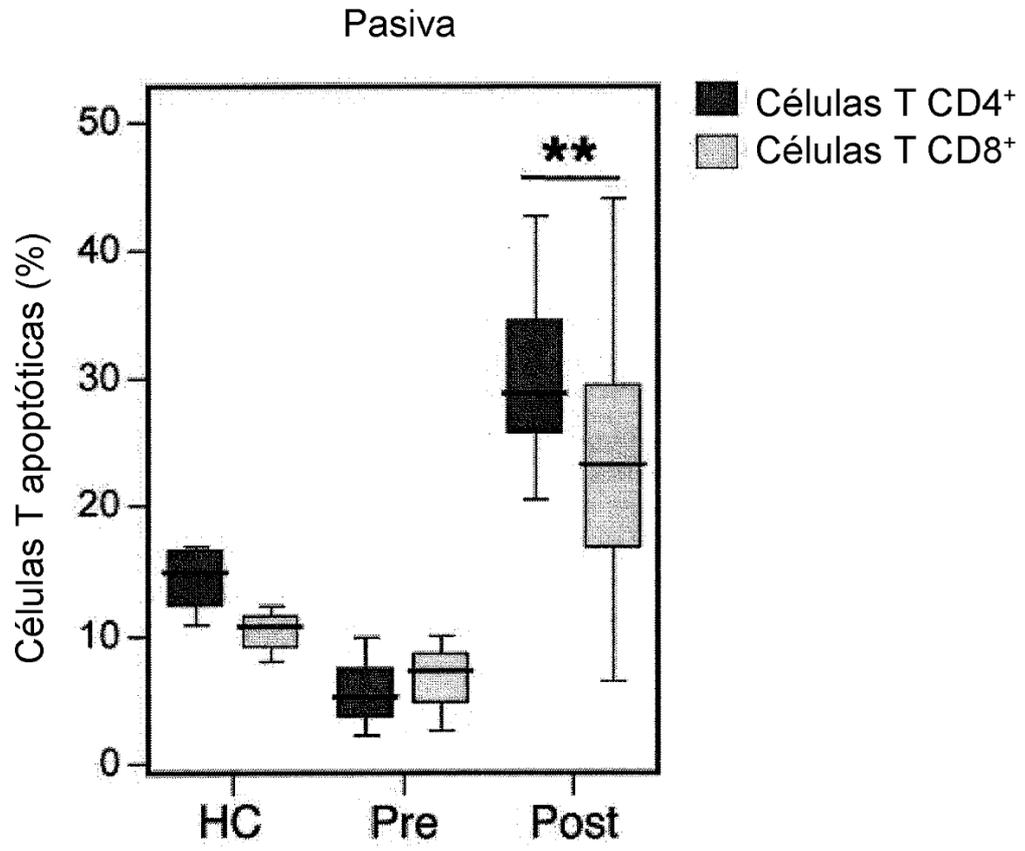


FIG. 1G

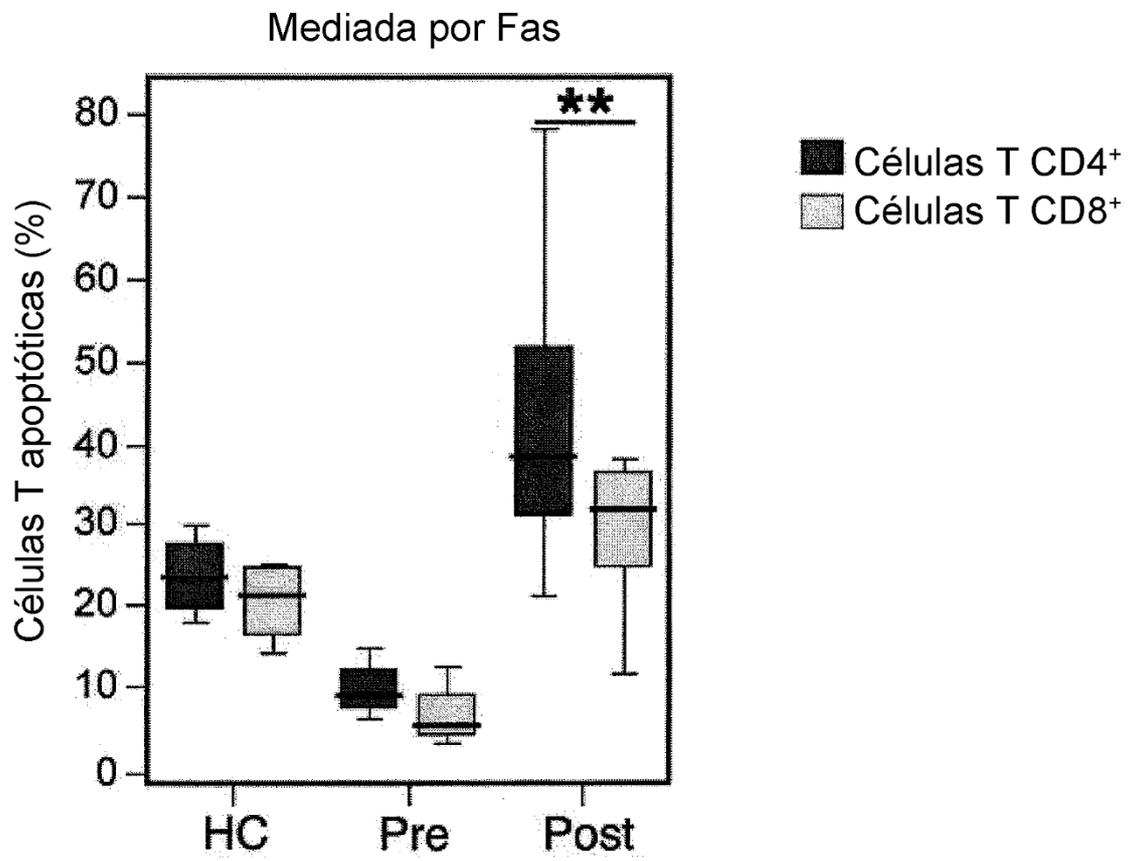


FIG. 1H

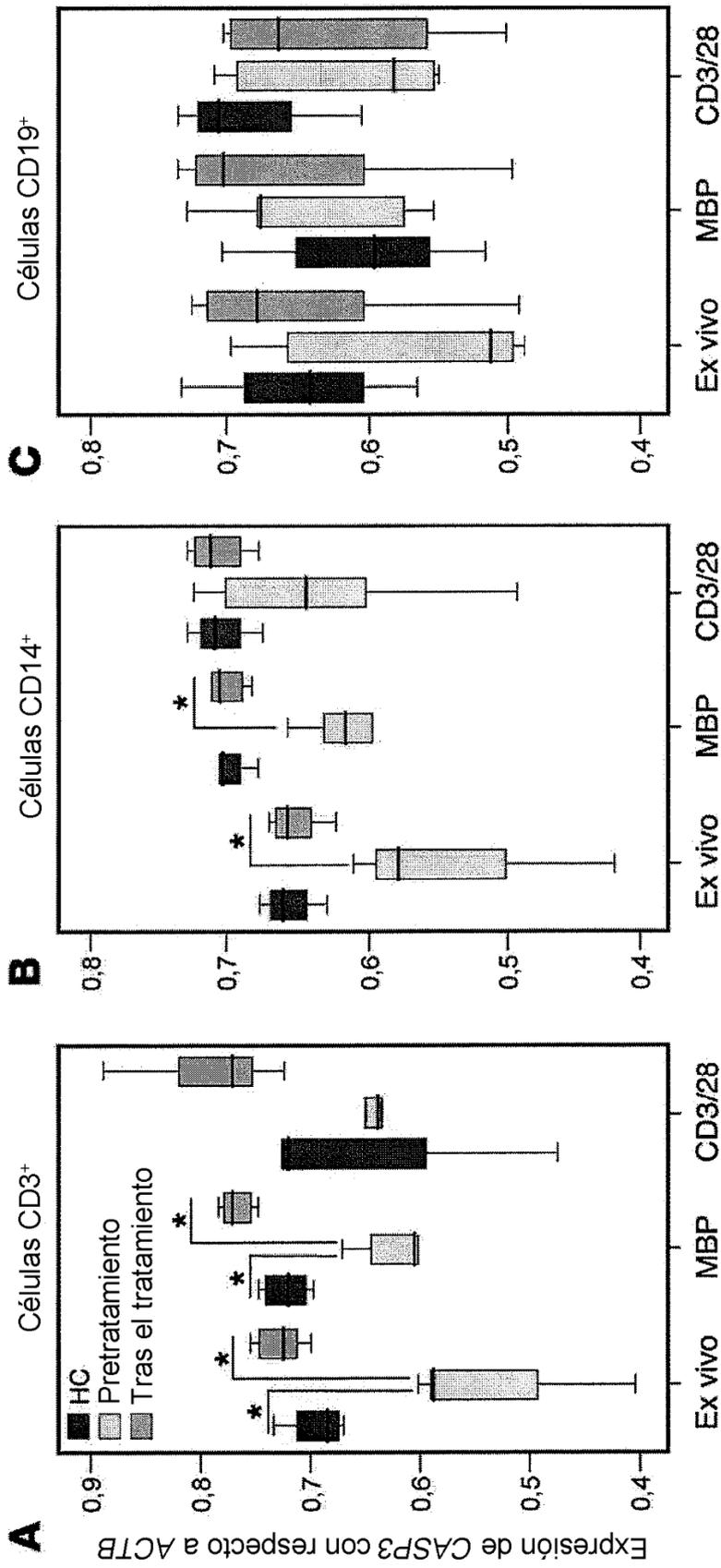


FIG. 2

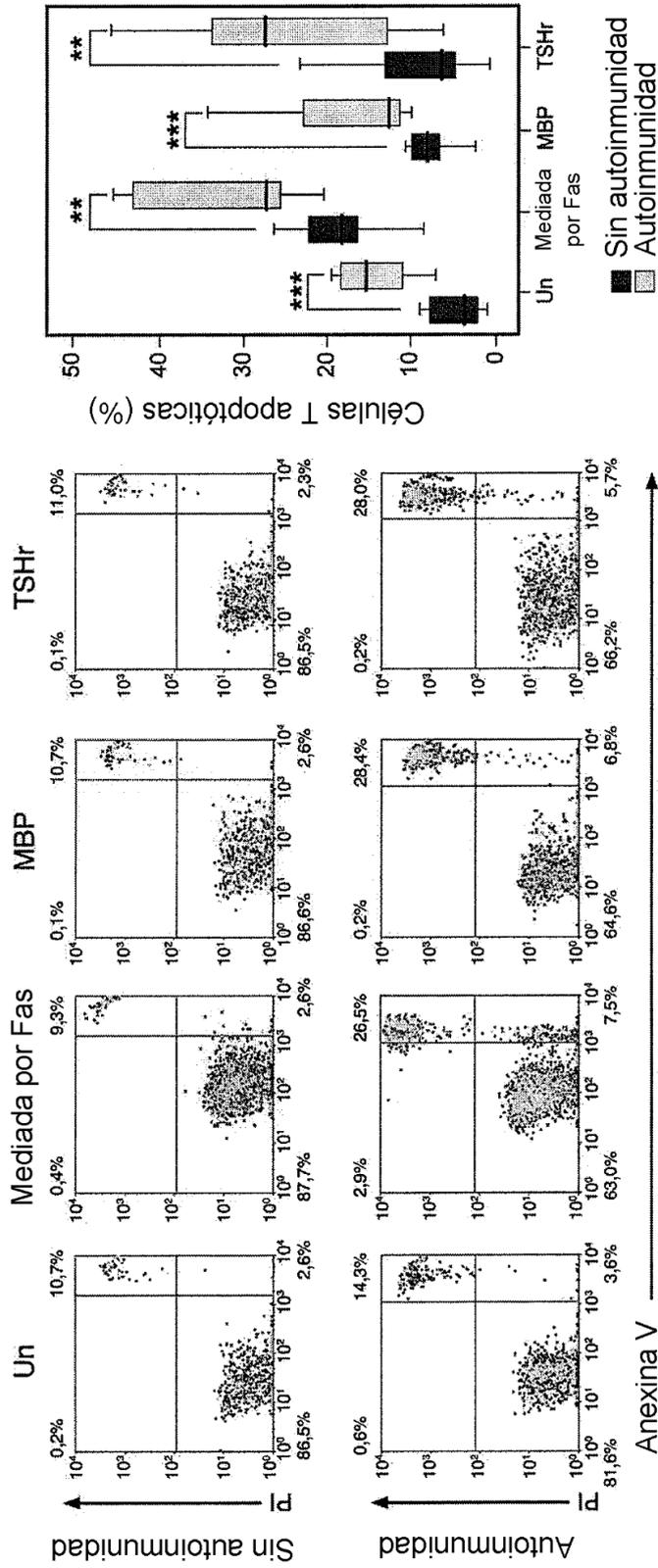


FIG. 3

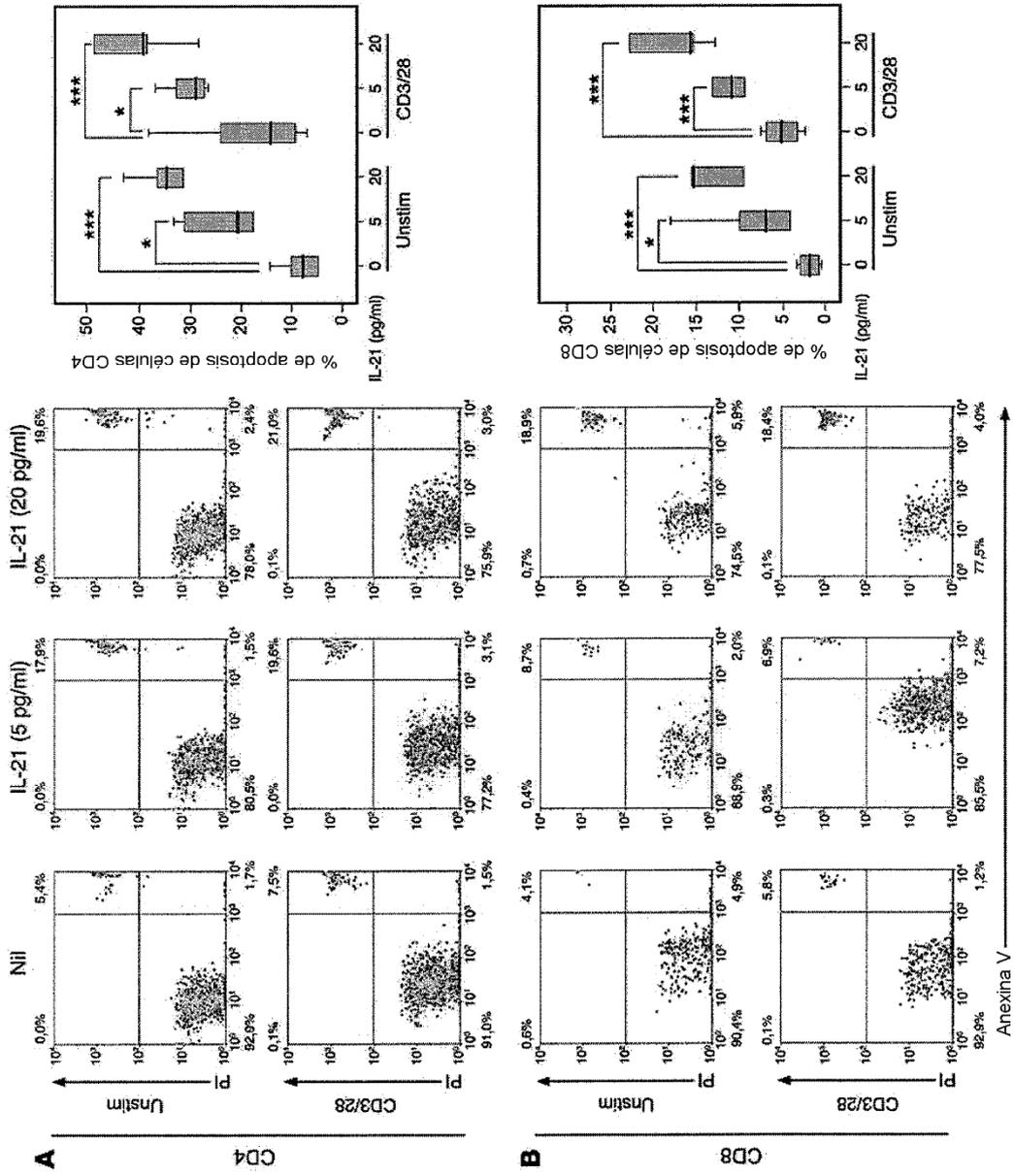


FIG. 4

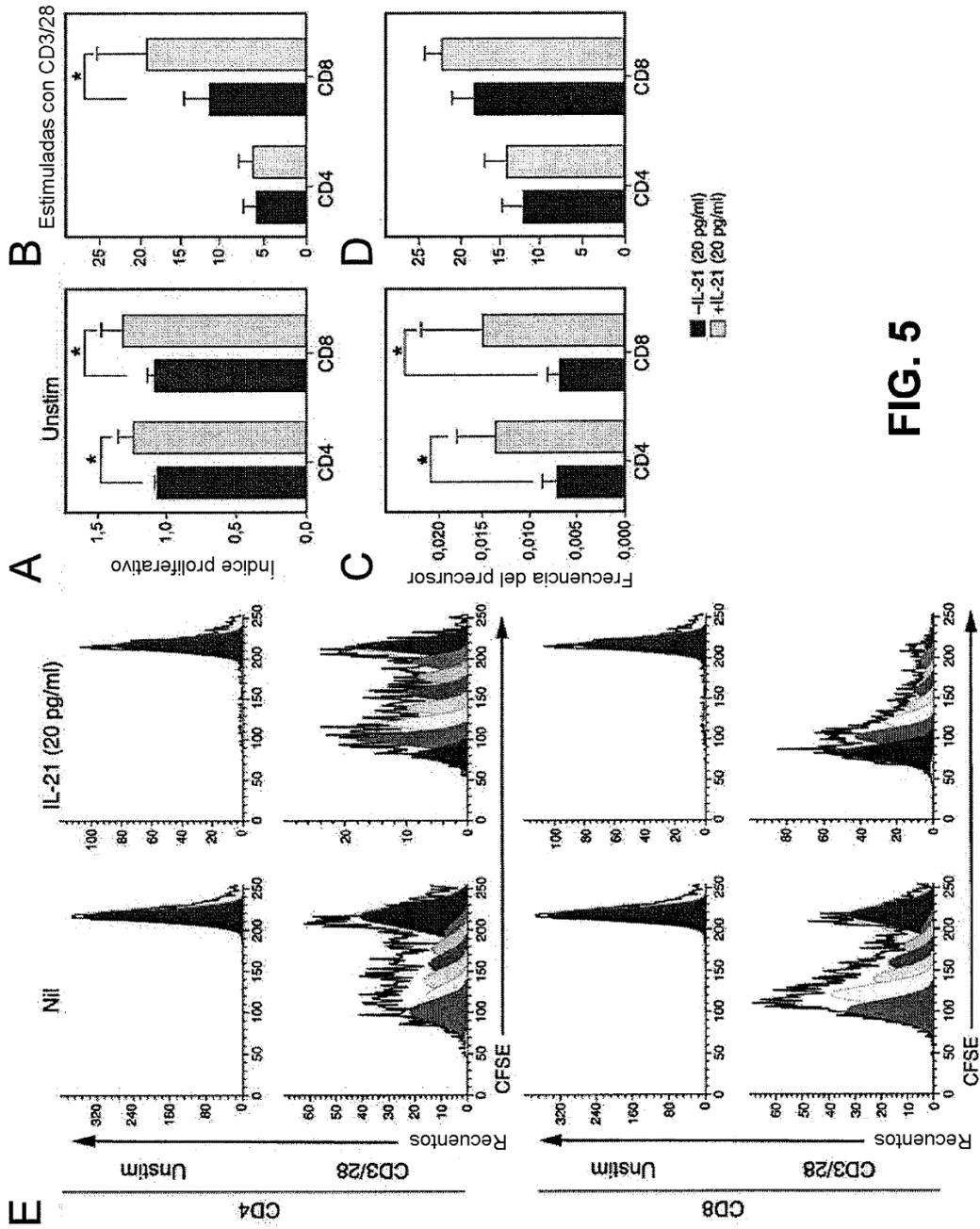


FIG. 5

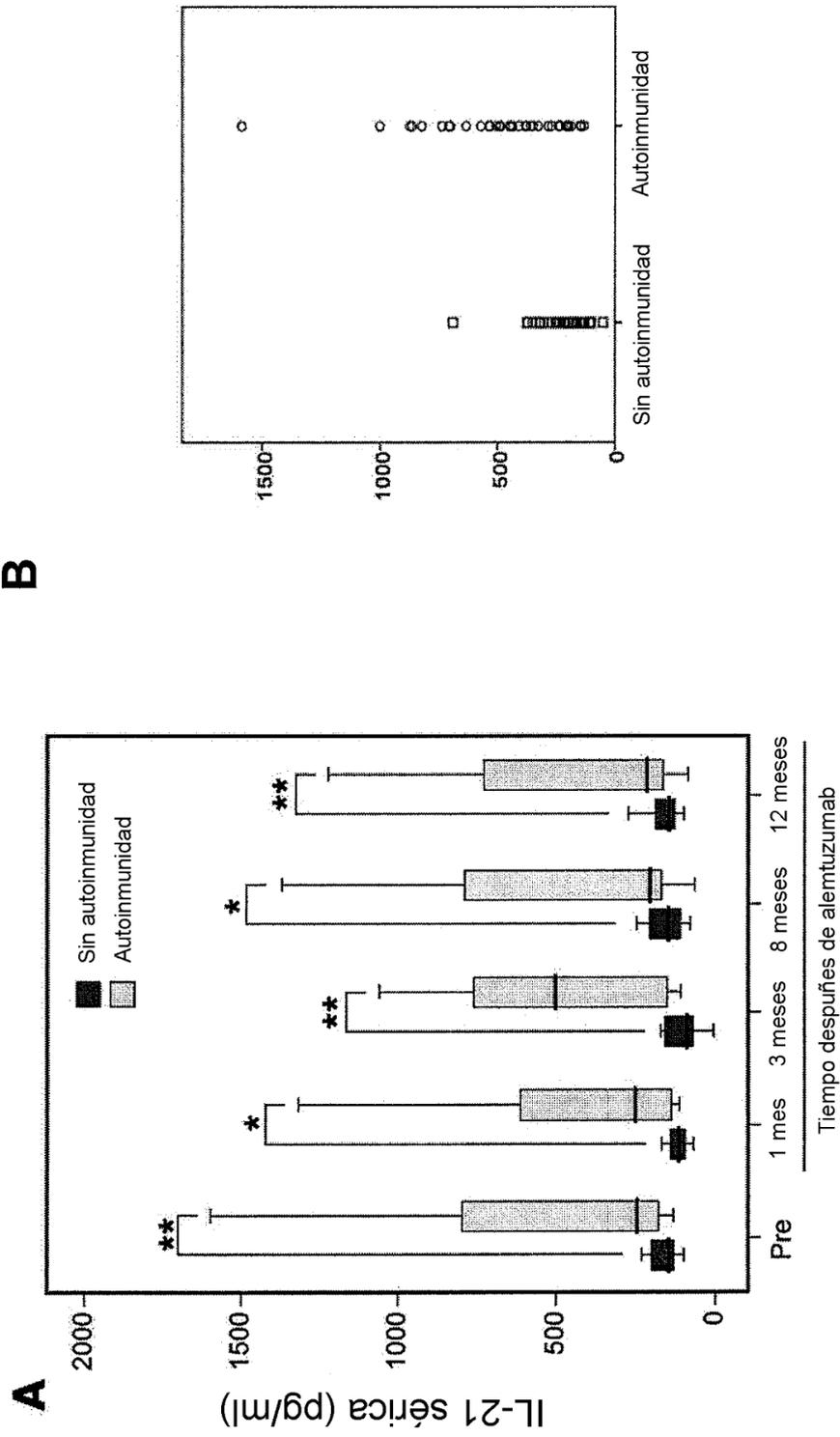


FIG. 6