

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 227**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2013** **PCT/US2013/042627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013** **WO13177505**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013** **E 13794110 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020** **EP 2856149**

54 Título: **Biomarcadores de diabetes**

30 Prioridad:

**24.05.2012 US 201261651144 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.03.2021**

73 Titular/es:

**PHAIM PHARMA LTD (100.0%)**  
**One Bartholomew Close**  
**London EC1A 7BL, GB**

72 Inventor/es:

**ORBAN, TIHAMER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 810 227 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

Biomarcadores de diabetes

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente US nº de serie 61/651.144, presentada el 24 de mayo de 2012, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al campo de la autoinmunidad, la diabetes y, más particularmente, a la diabetes de tipo 1 y los marcados inmunitarios.

15 Antecedentes

La forma más común de diabetes mellitus de tipo 1 (DMT1) es una enfermedad mediada inmunitariamente en la que las células  $\beta$  secretoras de insulina resultan destruidas por una respuesta autoinmune. Existen varios factores genéticos y ambientales asociados a la aparición de la enfermedad, que implica la infiltración inflamatoria progresiva de los islotes pancreáticos por inmunocitos con diana específicamente en células  $\beta$  secretoras de insulina. Dicha patología se desarrolla durante un periodo indeterminado de tiempo (meses a años) previo a la aparición clínica (prediabetes) y continúa después del diagnóstico del paciente con la enfermedad.

Actualmente existe un método para el cribado y diagnóstico de la T1DM utilizando anticuerpos. En el caso de la presencia de anticuerpos específicos, durante el tiempo con frecuencia se desarrolla diabetes manifiesta. La expresión de uno o más de: autoanticuerpos GAD65 (GAA), autoanticuerpos ICA512 (ICA512AA) o autoanticuerpos antiinsulina (AAI), está asociada a un riesgo de progresión a T1DM. La expresión de dos o más de: autoanticuerpos GAD65 (GAA), autoanticuerpos ICA512 (ICA512AA) o autoanticuerpos antiinsulina (AAI) está asociada a un riesgo elevado de progresión a T1DM. (Liping Yu et al., Diabetes, vol. 50, nº 8, 1735-1740, agosto de 2001; Verge CF et al., Diabetes 45:926-933, 199; Verge CF. et al., Diabetes 47:1857-1866, 1998; y Bingley PJ, et al., Diabetes 43:1304-1310, 1994).

Sin embargo, dicho cribado presenta una utilidad limitada para el paciente individual. Aunque el cribado de anticuerpos puede detectar un nivel incrementado de T1DM, el riesgo se basa en la población en general y no puede informar al paciente individual de si la enfermedad aparecerá, por ejemplo, dentro de los siguientes pocos meses o si el individuo probablemente estará libre de diabetes durante los próximos 5 a 10 años. La intensidad de la destrucción autoinmune varía de paciente a paciente. De esta manera, existe una necesidad de un método diagnóstico que informará al individuo del riesgo personal de desarrollar T1DM y puede indicar el marco temporal de aparición de la enfermedad.

También existe la necesidad de mejores variables principales para el análisis de terapias para la autoinmunidad de T1DM. Para que una terapia reciba la autorización preceptiva de la FDA, los ensayos clínicos deben mostrar un efecto estadísticamente significativo en una variable principal apropiada. Dicho efecto de tratamiento preferentemente demuestra algún beneficio evidente y clínicamente significativo. En el caso del tratamiento para prevenir la T1DM, el retraso o ausencia de desarrollo de la enfermedad clínica (esto provoca que estos ensayos duren 5 o 10 años). En el caso de intervención en pacientes con enfermedad clínica, las variables principales apropiadas están relacionadas con el control metabólico y las complicaciones de la diabetes. La variable principal metabólica aplicada más comúnmente, aparte de la curación, es la medición de la producción propia de insulina (péptido C estimulado como marcador sustitutivo para la conservación de la función de las células  $\beta$ ); otros son HbA<sub>1c</sub> y la utilización de insulina. Una función mejorada de las células  $\beta$  en pacientes de T1DM, que puede ser predictiva de un resultado clínico mejor a corto y largo plazo, puede requerir varios años para la evaluación. Para el tratamiento de la T1DM y las complicaciones, pueden monitorizarse los niveles de azúcar en la sangre directamente y puede monitorizarse un control glucémico mejorado a través de los niveles de hemoglobina glucosilado (p.ej., HbA<sub>1c</sub>), que se ha demostrado que está directamente relacionado con el riesgo de complicaciones diabéticas a corto y largo plazo.

Para las terapias destinadas a conservar la función de las células  $\beta$  en una etapa postclínica, se ha utilizado la concentración de péptido C estimulada para medir la progresión de la T1DM (Palmer JP, et al., Diabetes 53:250-264, 2004). Sin embargo, la utilización de la concentración de péptido C requiere un ensayo invasivo repetido (denominado prueba de tolerancia a comidas mixtas) durante un periodo de tiempo prolongado; de esta manera, la prueba tarda un tiempo prolongado para permitir la evaluación de la progresión de la enfermedad, que reduce la función de las células  $\beta$  y, de esta manera, la concentración de péptido C.

Por lo tanto, existe una necesidad de mejores marcadores que sirvan como variables principales para los ensayos (ensayos tanto preventivos como de intervención), así como mejores marcadores que puedan indicar rápida y fiablemente la progresividad de la autoinmunidad de la T1DM; de esta manera, estadificar la condición prediabética y diabética. También existe una necesidad de mejores ensayos que puedan medir la eficacia de terapias para el tratamiento de la T1DM y/o la detección de complicaciones.

Descripción resumida

Se ha encontrado un nuevo marcador para el declive de la autoproducción de insulina en la diabetes de tipo 1 en la proporción de niveles de subpoblaciones de células T CD4 novatas (CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) a subpoblaciones de células T de memoria central (CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>). La presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de una terapia para conservar la función de las células  $\beta$  en un sujeto (que presenta diabetes mellitus de tipo 1 que comprende:

seleccionar un sujeto que presenta diabetes mellitus de tipo 1 sometido a dicha terapia, y

(i) medir la subpoblación de células T CD4 de memoria central (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) en una muestra de dicho sujeto y evaluar la eficacia de la terapia, en la que un nivel bajo o en reducción de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz, o

(ii) medir la subpoblación de células T CD4 de memoria central (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) y medir la subpoblación de células T CD4 novatas (CD45RO<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>) en una muestra procedente de dicho sujeto y evaluar la eficacia de la terapia, en la que una proporción elevada o creciente de subpoblación de células T CD4 novatas a la subpoblación de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz.

Preferentemente, el método comprende además determinar la presencia de un autoanticuerpo relacionado con la diabetes.

En el contexto prediabético, la presencia de autoanticuerpo específico de T1DM indica la presencia de autoinmunidad de T1DM misma. De esta manera, en un aspecto de la presente invención, el método tal como se indica en la presente memoria se combina con determinar si los autoanticuerpos de la diabetes se encuentran presentes.

Preferentemente, la muestra se incuba con un anticuerpo anti-CD45RO marcado y un anticuerpo anti-CD62L marcado, antes de la etapa de medición.

Preferentemente, la medición comprende someter dicha muestra a citometría de flujo.

Preferentemente, dicha muestra es una muestra de sangre.

Preferentemente, el nivel en reducción de células T CD4 de memoria central o la proporción creciente es respecto al nivel o proporción de dicha muestra extraída en diferentes puntos temporales.

Preferentemente, el nivel decreciente de células T CD4 de memoria central o la proporción creciente es respecto a un nivel o proporción estandarizado, o respecto a un nivel o proporción obtenido de una muestra extraída antes de iniciar la terapia.

Preferentemente, un nivel bajo o decreciente de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz.

Preferentemente, la medición comprende medir tanto la subpoblación de células T CD4 de memoria central como la subpoblación de células T CD4 novatas, y en la que una proporción elevada o creciente de subpoblación de células T CD4 novatas a subpoblación de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz.

Estas y otras características de las realizaciones tal como resultarán evidentes se proporcionan y describen en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos siguientes forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la invención. La invención podrá entenderse mejor en referencia a uno más de dichos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentada en la presente memoria.

La FIG. 1 es un gráfico que muestra la reducción de la pérdida de péptido C por unidad de cambio en células T en una vista previa en comparación con la línea base. Se muestra tanto la reducción de la memoria central como el incremento de la proporción novatas/central.

Las FIGS. 2A-2D muestran el porcentaje de cambio respecto de la línea base de subgrupos de células T CD4 identificadas como representativas de poblaciones de (FIG. 2A) novatas y (FIG. 2B) y de memoria central, así como (FIG. 2C) la proporción de poblaciones de novatas:de memoria central y (FIG. 2D) poblaciones de T<sub>reg</sub>, todas medidas a intervalos especificados después del inicio del tratamiento ('0 meses'). El último tratamiento fue el mes 24. Los círculos negros se refieren al tratamiento con abatacept y los círculos blancos, con placebo; los símbolos representan medias y las barras de error representan intervalos de confianza al 95%. Los valores de P y las líneas discontinuas indican que los dos grupos difieren significativamente en los puntos temporales indicados.

## Descripción detallada

La forma más común de diabetes mellitus de tipo 1 (T1DM) es una enfermedad de tipo inmunitario en la que las células  $\beta$  secretoras de insulina resultan destruidas por una respuesta autoinmune. Las células T desempeñan un papel crucial en la autoinmunidad asociada a la T1DM. Para activarse por completo, se cree que dichas células requieren por lo menos dos señales cruciales (Marelli-Berg FM, Okkenhaug K, Mirenda V. A Trends Immunol. 28: 267-73, 2007). La primera señal es una interacción entre un antígeno en el surco de la molécula de CMH sobre las células presentadoras de antígenos y el receptor de células T. La segunda señal es la interacción entre CD80 y CD86 sobre las células presentadoras de antígenos y CD28 sobre las células T. Dicha segunda señal coestimuladora resulta necesaria para la activación total de las células, y sin ella no pueden funcionar. Por lo tanto, el bloqueo de la coestimulación se ha propuesto como modalidad terapéutica de autoinmunidad y trasplante (Bluestone JA, St Clair EW, Turka LA. Immunity 24: 233-38, 2006).

Los linfocitos T novatos viajan a zonas de células T de órganos linfoides secundarios en busca de antígenos presentados por células presentadoras de antígenos (CPA). Una vez activados, proliferan vigorosamente, generando células efectoras que pueden migrar a los tejidos inflamados para combatir la infección o, en el caso de la autoinmunidad, para destruir tejidos. Tras la eliminación del antígeno, persiste una fracción de linfocitos T expuestos/activados como células de memoria circulantes que normalmente puede conferir protección y proporcionar, tras un reto secundario, una respuesta potenciada. Se conservan dos tipos principales de células T de memoria: las células de memoria central, que patrullan en órganos linfoides, y las células de memoria efectoras, que actúan como centinelas en tejidos periféricos, tales como la piel y el tracto digestivo.

La autoinmunidad de la diabetes de tipo 1 (T1DM) está controlada por los linfocitos T activados. El abatacept es un modulador de la coestimulación y bloquea la activación total de los linfocitos T. Se evaluó el efecto de la administración durante dos años de abatacept en un ensayo de doble ciego aleatorizado en paciente de T1DM recientemente diagnosticados. El abatacept retrasó la caída de la función de las células beta significativamente durante dos años. Los resultados preliminares de este ensayo se han publicado en forma de un artículo titulado "Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset Type 1 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial", en The Lancet (publicado en internet de 28 de junio de 2011). Dicho artículo se ha incluido en el Apéndice A y es parte de la solicitud actualmente presentada.

Se han analizado múltiples marcadores de células T para cualquier correlación con la progresión de la diabetes (destrucción de células  $\beta$  secretoras de insulina restantes). Para los pacientes tratados con un compuesto que retrasa la destrucción autoinmune en pacientes con uno o más biomarcadores humorales de diabetes (GAA, ICA512AA, IAA), se encontró que las proporciones de subpoblaciones de células T CD4 novatas ( $CD45RO^-CD62L^+$ ) a subpoblaciones de células T de memoria central ( $CD45RO^+CD62L^+$ ) se incrementaban significativamente respecto de la línea base durante el tratamiento y después volvían a la línea base después de concluir la terapia. También se observó que el tratamiento con abatacept retrasaba significativamente la caída del péptido C mediante la reducción de los niveles de las células T CD4 de memoria central ( $CD45RO^+CD62L^+$ ).

Para pacientes no tratados para retrasar la progresión de la diabetes (destrucción de células  $\beta$  secretoras de insulina restantes), se encontró que los niveles más elevados de células T de memoria central estaban significativamente asociados a la posterior caída de péptido C. De esta manera, una reducción de dichas células T en el grupo tratado se asociaba significativamente a una tasa más lenta de caída de péptido C y dicha subpoblación de células inmunitarias T (células T de memoria central) puede utilizarse como un marcador inmunitario sustitutivo para la caída de la autoproducción de insulina.

De esta manera, se plantea la hipótesis de que el abatacept bloquea la activación de las células novatas y la presencia de una concentración más elevada de células T CD4 novatas en comparación con las células T de memoria CD4 indica que el compuesto resulta eficaz en el retraso de la aparición de TDM en sujetos prediabéticos y resulta eficaz en el retraso de la caída de la producción de insulina en pacientes de T1DM. El abatacept ejerce su efecto sobre la autoinmunidad mediante la reducción de los niveles de células T CD4 de memoria central, al bloquear el proceso de activación de células CD4 novatas a células T CD4 de memoria central. Dicho biomarcador también puede utilizarse en ausencia de un compuesto tal como abatacept para el diagnóstico de la progresividad de la diabetes o prediabetes (junto con anticuerpos de la diabetes), así como para determinar la susceptibilidad a diabetes mellitus de progresión rápida. Dicho marcador puede monitorizar la intensidad y agresividad de la destrucción autoinmune, la velocidad de pérdida de las células  $\beta$  secretoras de insulina.

El análisis de biomarcadores tal como se indica en la presente memoria puede proporcionarse junto con ensayos de anticuerpos conocidos. Dicha combinación proporciona tanto una determinación de la susceptibilidad a la diabetes, como un marco temporal para la aparición. La aparición postclínica puede predecir el tiempo hasta la pérdida total de autoproducción de insulina-tiempo hasta "diabetes total".

El péptido C es un péptido de 31 aminoácidos que actúa como una conexión estructural en la proinsulina. Se libera a la circulación junto con insulina al cortarse enzimáticamente la proinsulina. De esta manera, se observan niveles bajos a indetectables de péptido C en la T1DM, mientras que los pacientes de T2DM antes en la enfermedad con frecuencia

presentan un nivel más alto de lo normal de insulina/péptido C. Sin embargo, pueden existir varios intervalos de referencia para los niveles de péptido C dependiendo de factores tales como el tipo de ensayo utilizado, la edad del paciente y si el paciente se ha sometido a ayuno o no antes del ensayo. Puede utilizarse cualquier ensayo conocido para cuantificar el péptido C, tal como el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo inmunoquimioluminométrico (ICMA).

En el método RIA, puede medirse péptido C utilizando anti-péptido C de cabra. El anticuerpo, que también reconoce la proinsulina, no presenta reactividad cruzada con la insulina. La sensibilidad analítica del ensayo es generalmente de 0,125 ng/ml y se requiere un ayuno durante la noche. El método RIA proporciona un intervalo de referencia para adultos normales de 0,5 a 2 ng/ml. En el método de ICMA, se utiliza un inmunoensayo competitivo con dos ciclos de incubación para proporcionar una sensibilidad analítica de aproximadamente 0,3 ng/ml. El método de ICMA proporciona un intervalo de referencia para adultos normales de 0,9 a 4 ng/ml y el paciente debe encontrarse en ayuno. Para niños de menos de 12 años, el intervalo de referencia es de 0,0 a 0,3 ng/ml. Para niños de 10 a 12 años, el intervalo de referencia es de 0,4 a 3,3 ng/ml y para individuos de 17 o más años (LABCORP). Con el fin de evaluar la capacidad de las células  $\beta$  secretoras de insulina de producir insulina, se utilizan ensayos de reto alimentario; el ensayo más comúnmente utilizado se denomina ensayo de tolerancia a comidas mixtas (MMTT) en el que se recogen varias muestras de sangre durante 2 o 4 horas para la medición del péptido C.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” es un ser humano u otro animal, que presenta o que se espera que presente un trastorno autoinmune. En realizaciones de la invención, los “sujetos” son pacientes humanos que presentan diabetes mellitus de tipo 1. De esta manera, en realizaciones, el sujeto requerirá el tratamiento terapéutico tal como se proporciona en la presente memoria. Los sujetos preferentes son mamíferos. Entre los ejemplos de sujetos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, seres humanos, caballos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, cerdos, cabras y ovejas. En algunas realizaciones, los “sujetos” son pacientes humanos que han sido diagnosticados con diabetes en los últimos 200, 100 o 50 días. En algunas realizaciones, los “sujetos” son pacientes humanos que han sido diagnosticados recientemente con diabetes mellitus, aunque todavía presentan una función de células beta residual.

Un sujeto con diabetes de tipo 1 puede seleccionarse mediante la evaluación de sujetos basada en criterios diagnósticos de diabetes de tipo 1. Alternativamente, o adicionalmente, dicha población de pacientes puede seleccionarse mediante la evaluación de cualesquiera marcadores genéticos o autoanticuerpos u otros biomarcadores que es conocido que están correlacionados con la diabetes de tipo 1.

El término “tratamiento” o “tratando” tal como se utiliza en la presente memoria se define como la aplicación o la administración de un agente terapéutico en un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico en un tejido o línea celular aislada de un paciente, que presenta una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad. El tratamiento pretende comprender la prevención de la aparición, el enlentecimiento de la progresión, la reversión o, de otro modo, alivio, mejora o afección de la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento de un sujeto, p.ej., un sujeto humano, con una composición indicada en la presente memoria, puede retrasar, mejorar o detener la autoinmunidad continua, p.ej., una reacción contra células  $\beta$  pancreáticas, en un sujeto antes, durante o después de la aparición clínica de diabetes de tipo 1.

La expresión “condición diabética” tal como se utiliza en la presente memoria pretende comprender diabetes, prediabetes o una susceptibilidad a la diabetes.

El tratamiento puede ser el tratamiento con un ingrediente farmacéutico autorizado para el ensayo clínico o puede ser que el tratamiento se produzca durante un ensayo clínico o un ensayo preclínico.

La expresión “retrasar la progresión” tal como se utiliza en la presente memoria en el contexto de retrasar la progresión de la diabetes mellitus se refiere a que se retrasa la pérdida de masa funcional residual de células  $\beta$  antes o después de la aparición clínica de diabetes de tipo 1. El retraso, por ejemplo, puede ser un retraso de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 o más meses, o puede ser un retraso de 2, 3, 4 o más años.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos “administrando” o “administración” pretenden comprender todos los medios para administrar directa e indirectamente una composición farmacéutica en su sitio de acción pretendido.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la composición farmacéutica de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del agente farmacológico resultan compensados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

## Ejemplos

Podrán entenderse adicionalmente aspectos de las enseñanzas del solicitante a la luz de los ejemplos siguientes, que no deberían interpretarse como limitativos del alcance de las enseñanzas del solicitante en modo alguno.

#### Ejemplo 1. Ensayo

Tal como se ha indicado en el artículo en The Lancet anteriormente referenciado, se llevó a cabo un ensayo clínico de fase 2 de la utilización de abatacept para pacientes diagnosticados con diabetes de tipo 1. Se han diagnosticado pacientes elegibles con diabetes de tipo 1 en los últimos 100 días y presentaban por lo menos un autoanticuerpo relacionado con diabetes (anticuerpos de insulina sometidos a microensayo; anticuerpos de ácido glutámico descarboxilasa-65 [GAD-65]; anticuerpos del antígeno 512 de las células de los islotes [ICA-512] o autoanticuerpos de células de los islotes) y presentaban concentraciones de péptido C estimuladas de 0,2 nmoles/l o superiores.

Los pacientes fueron asignados aleatoriamente en una proporción 2:1, estratificados según sitio de participación, para recibir el tratamiento experimental con abatacept o placebo utilizando un protocolo de doble ciego. Se administró abatacept (Orencia, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, EE.UU.) los días 1, 14 y 28, y después cada 28 días, con la última dosis el día 700 (total: 27 dosis) en forma de una infusión intravenosa de 30 min a una dosis de 10 mg/kg (máximo de 1000 mg por dosis) en una infusión de 100 ml de cloruro sódico al 0,9%. Se utilizó una infusión de solución salina normal como placebo. Los pacientes no recibieron ninguna premedicación.

Las muestras de sangre se analizaron centralmente. Se midieron las concentraciones de péptido C a partir de plasma congelado con un ensayo inmunoenzimométrico de dos sitios (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA, EE.UU.). Las muestras de sangre se obtuvieron a los 3, 6, 12, 18 y 24 meses, así como a los 30 meses, seis meses después del final de la administración.

De los 112 pacientes incluidos en el estudio, 77 fueron asignados aleatoriamente a la recepción del tratamiento experimental con abatacept y 35 fueron asignados a la recepción de placebo. Los resultados mostraron que durante 2 años, la modulación de la coestimulación con abatacept retrasó la reducción de la función de las células  $\beta$  en diabetes de tipo 1 de aparición reciente en 9,6 meses. A los dos años, el grupo tratado con abatacept presentaba una producción propia de insulina más elevada que el grupo de placebo. El grupo tratado con abatacept también presentaba una HbA1c (medición del nivel de control del azúcar en sangre) significativamente mejor durante el ensayo (con el mismo uso de insulina). El efecto beneficioso de intervención temprana sugiere que la activación de las células T todavía se produce en torno al tiempo de diagnóstico clínico de diabetes de tipo 1, aunque el curso de la enfermedad presumiblemente haya estado avanzando durante varios años.

#### Ejemplo 2. Citometría de flujo

Se llevó a cabo un análisis de citometría de flujo en muestras de sangre procedentes de sujetos del ensayo clínico en el Ejemplo 1 para los brazos tanto de abatacept como de placebo a los 0, 3, 6, 12 y 24 meses y se realizó un análisis adicional seis meses después del final del ensayo (30 meses). La citometría de flujo es una técnica rutinaria para el recuento y examen de partículas microscópicas, tales como células, mediante su suspensión en una corriente de fluido, pasándolas célula a célula por un láser y aparato de detección electrónica. Los instrumentos modernos habitualmente poseen múltiples láseres y detectores fluorescentes. El incremento del número de láseres y detectores permite un marcaje con múltiples anticuerpos y puede identificar con mayor precisión una población diana a partir de sus marcadores fenotípicos.

En el análisis se utilizó la separación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), un tipo especializado de citometría de flujo. FACS proporciona un método para separar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, célula a célula, basándose en la dispersión lumínica y características fluorescentes específicas de cada célula, caracterizándolas. Es un instrumento científico útil ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de las señales fluorescentes de células individuales, así como la separación física de células de interés particular. La señal fluorescente procede de los anticuerpos marcados fluorescentemente con los que se han sido incubadas las células antes del FACS. Con el marcaje múltiple, se acopla cada anticuerpo a un fluoróforo diferente. Los anticuerpos utilizados son específicos para el marcador celular de interés. Para detectar las células CD4<sup>+</sup>, se marcó un anticuerpo anti-CD4 con un fluoróforo. Para la detección simultánea de CD45RO, también se utilizó un anticuerpo anti-CD45RO específico con otro fluoróforo. (Se encuentran disponibles anticuerpos anti-CD4 y anti-CD45RO marcados fluorescentemente de diversas fuentes, tales como BD Biosciences of San José, CA). Cada fluoróforo presenta una longitud de onda pico de excitación y de emisión característica, permitiendo de esta manera distinguir entre ellas, p.ej. mediante la utilización de instrumentos de separación celular activados por fluorescencia, tales como el sistema FACSalibur de Becton-Dickinson o FACSAria.

En tres ensayos de 5-colores, se estudiaron siete marcadores de células T. No se observaron cambios respecto a la línea base en el grupo de placebo para ninguno de dichos marcadores. En el grupo tratado, los presentes inventores no observaron ningún cambio en las células CD4 y CD8 o en subgrupos de células T CD8 novatas y de memoria.

Sin embargo, la proporción de subpoblación de células T CD4 novatas (CD45RO<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>) a subpoblación de células T CD4 de memoria central (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) se incrementó significativamente respecto a la línea base en el grupo

de abatacept durante el tratamiento y después volvieron a la línea base después de la terapia. Durante el ensayo para el grupo de placebo, un número más elevado de células T CD4 de memoria central estaba significativamente asociado a la posterior caída del péptido C. Una reducción de dichas células T en el grupo de abatacept estaba significativamente asociado a una tasa más lenta de caída del péptido C.

El estudio encontró además que la población de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>) se redujo respecto a la línea base en el grupo de abatacept y después volvió a la línea base al terminar la terapia. Sin embargo, la reducción de dichas células T reguladoras no mostró ninguna correlación con los cambios en las poblaciones novatas/de memoria o con los cambios en los niveles de péptido C.

La Tabla 1 proporciona el cambio medio de los cuadrados mínimos respecto de la línea base como log de la proporción entre las células T CD4 novatas y las células T CD4 de memoria central y los valores de desviación estándar y de p para 3, 6, 12 y 24 meses respecto de la línea base. Los 30 meses respecto de la línea base, en la que los sujetos ya no estaban sometidos a terapia, se proporciona como datos de 30 meses. Los valores de p entre los grupos de fármaco y de placebo son entre grupos en la misma visita.

TABLA 1

LOG (CÉLULAS T NOVATAS/CÉLULAS T DE MEMORIA CENTRAL)				
	Mes, respecto a la línea base	Cambio medio	Error estándar	Valor de p
Abatacept	3	2,137	0,1318	p=NS
Placebo	3	1,753	0,1927	
Abatacept	6	2,517	0,1305	p=0,0002
Placebo	6	1,636	0,1949	
Abatacept	12	2,698	0,1305	p=0,0002
Placebo	12	1,793	0,1951	
Abatacept	24	2,656	0,1328	p=0,0001
Placebo	24	1,698	0,1954	
Abatacept	30	1,731	0,1323	p=NS
Placebo	30	1,623	0,2075	

También se midió la concentración de péptido C para dichas muestras y puntos temporales. En el análisis de ambos grupos de datos, los cambios previos tanto en proporciones de células T CD4 nativas a de memoria central y en los niveles de células T CD4 de memoria central fueron predictivos de la posterior pérdida de péptido C en T1DM (FIG. 1), mientras que las mediciones contemporáneas de células T no estaban asociadas significativamente al cambio del péptido C respecto de la línea base. Se ha encontrado que un incremento de las células T de memoria central está significativamente asociado a posteriores caídas del péptido C (autoproducción de insulina). Específicamente, por cada unidad de incremento respecto de la línea base en el Log de la proporción de memoria central se estima que se reduce el péptido C de media en -0,178 ng/ml. La FIG. 1 proporciona la reducción del nivel de células T CD4 de memoria central y el incremento de la proporción de células T CD4 novatas/memoria central resultante en una reducción de la pérdida de péptido C. El número del cambio unitario puede compararse y expresarse cuantitativamente, proporcionando una medida que indica la agresividad de los procesos autoinmunes y también el nivel de eficacia de las diferentes modalidades de intervención. El nivel de eficacia de las diferentes modalidades de intervención a continuación puede ordenarse basándose en el número de unidades.

Los retardos temporales analizados por los presentes inventores fueron 3 o 6 meses. Por lo tanto, para los fines de los presentes inventores, se requieren dos mediciones diferentes de dicha población celular para evaluar la posterior pérdida, o falta de ella, de péptido C. Los cambios en dichas poblaciones de células T (tanto proporciones celulares de CD4 novatas/de memoria central como los niveles de células T CD4 de memoria central) predicen la posterior pérdida de péptido C. Las FIGS. 2A a 2D muestran el cambio en las células T novatas, de memoria y novatas/de memoria durante el tiempo respecto a los valores de línea base. Lo anterior muestra los cambios que se producen durante 30 meses. Aunque los presentes inventores analizaron los 3 y 6 meses, tal como puede observarse en la FIG. 2, otros tiempos e intervalos temporales también podrían funcionar y pueden incluir una medición de línea base obtenida antes del tratamiento y/o mediciones a los 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 o más meses.

Los títulos de sección utilizados en la presente memoria presentan fines organizativos únicamente y no deben interpretarse como limitativos de la materia objeto de la invención descrita en modo alguno. Aunque se describen las enseñanzas del solicitante junto con diversas realizaciones, no se pretende que las enseñanzas del solicitante se encuentren limitadas a dichas realizaciones.

# REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la eficacia de una terapia para conservar la función de las células  $\beta$  en un sujeto que presenta diabetes mellitus de tipo 1, que comprende:  
5  
seleccionar un sujeto que presenta diabetes mellitus de tipo 1 sometido a dicha terapia, y:  
(i) medir la subpoblación de células T CD4 de memoria central (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) en una muestra de dicho sujeto y evaluar la eficacia de la terapia, en la que un nivel bajo o en reducción de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz, o  
10  
(ii) medir la subpoblación de células T CD4 de memoria central (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) y medir la subpoblación de células T CD4 novatas (CD45RO<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>) en una muestra procedente de dicho sujeto y evaluar la eficacia de la terapia, en la que una proporción elevada o en incremento de la subpoblación de células T CD4 novatas a la subpoblación de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz.  
15
2. Método según la reivindicación 1, que comprende, además:  
determinar la presencia de un autoanticuerpo relacionado con la diabetes.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha muestra se incuba con un anticuerpo anti-CD45RO  
20  
marcado y un anticuerpo anti-CD62L marcado antes de la etapa de medición.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición comprende someter dicha muestra a citometría de flujo.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra es una muestra de  
25  
sangre.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la reducción del nivel de células T CD4 de memoria central o el incremento de la proporción es respecto al nivel o proporción de dicha muestra  
30  
extraída en diferentes puntos temporales.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la reducción del nivel de células T CD4 de memoria central o el incremento de la proporción es respecto a un nivel o proporción estandarizado, o  
35  
respecto a un nivel o proporción obtenido de una muestra extraída antes de iniciar la terapia.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un nivel bajo o decreciente de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición comprende medir tanto la  
40  
subpoblación de células T CD4 de memoria central como la subpoblación de células T CD4 novatas, y en el que una proporción elevada o creciente de la subpoblación de células T CD4 novatas a subpoblación de células T CD4 de memoria central durante dicha terapia indica terapia eficaz.  
45



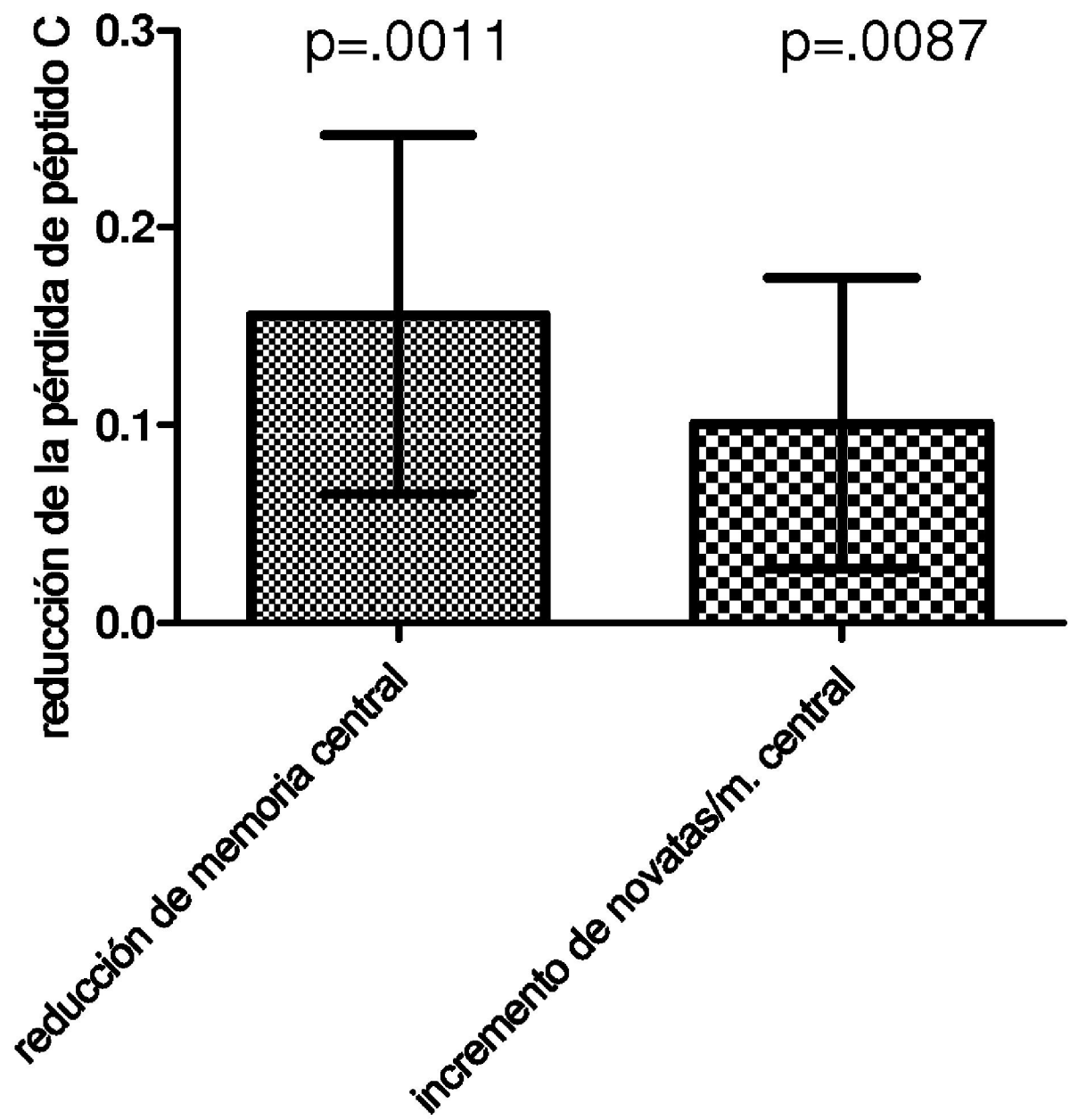
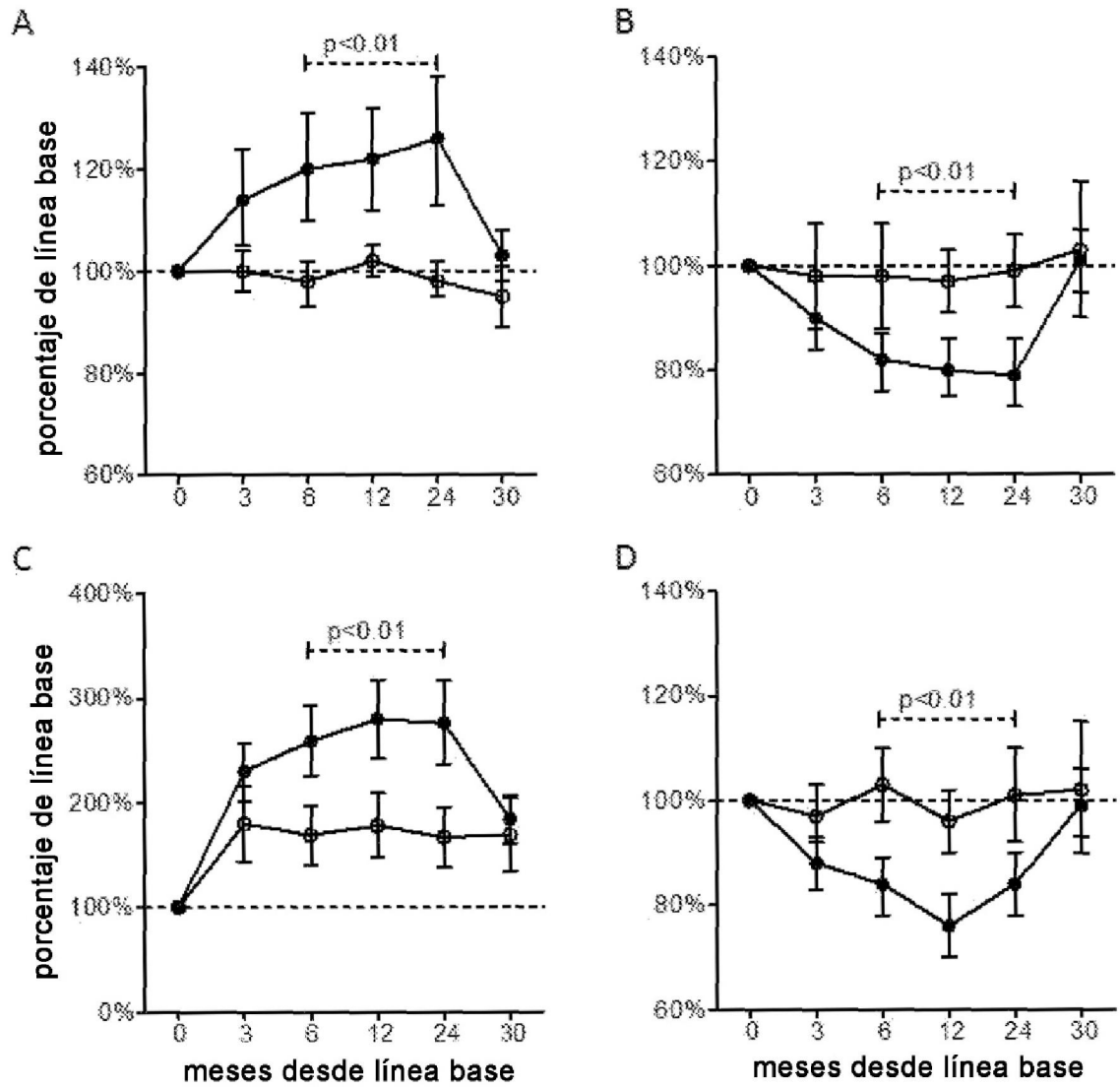


FIG. 1



FIGS. 2A – 2D