

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 412**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2015 PCT/EP2015/077360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16079339**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2015 E 15798420 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3221703**

54 Título: **Fetuína-A sialilada como marcador de eficacia de la inmunoterapia**

30 Prioridad:

21.11.2014 EP 14306857

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

23.03.2021

73 Titular/es:

**STALLERGENES (100.0%)
6, rue Alexis de Tocqueville
92160 Antony, FR**

72 Inventor/es:

**LOMBARDI, VINCENT;
CAILLOT, NOÉMIE;
NONY, EMMANUEL;
MOINGEON, PHILIPPE;
BODO, VÉRONIQUE y
BOULEY, JULIEN**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 813 412 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

Fetuína-A sialilada como marcador de eficacia de la inmunoterapia

- 5 **[0001]** La invención se refiere a nuevos marcadores para la eficacia de la inmunoterapia, en particular para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a la inmunoterapia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** La alergia es un problema de salud importante y creciente en todo el mundo. A medida que las sociedades se vuelven más ricas y reducen la incidencia de enfermedades contagiosas, aumenta la prevalencia de enfermedades alérgicas. Encontrar tratamientos eficaces para la alergia, tanto preventivos como terapéuticos, es un reto creciente para la industria de la salud actual. Tradicionalmente, el manejo de la alergia se ha concentrado en el alivio de los síntomas, utilizando antihistamínicos y medicamentos que alivian los síntomas alérgicos incluyendo la congestión nasal, la dermatitis y el asma, tales como descongestionantes, cremas, antiinflamatorios y broncodilatadores. La evitación de alérgenos es otra estrategia para el manejo de la alergia, pero esto a menudo es difícil o imposible, particularmente en el caso de alérgenos generalizados tal como el polen. Una tercera alternativa es la vacunación específica contra la alergia, en la que a los pacientes se les administra el alérgeno que causa la alergia para obtener una mejora en el estado inmunitario del paciente. Este tipo de tratamiento tiene la ventaja de alterar el curso de la enfermedad para prevenir la manifestación de los síntomas, en lugar de simplemente aliviarlos.

- 25 **[0003]** La inmunoterapia con alérgenos (AIT) es una terapia eficaz para las alergias o alergias respiratorias de tipo I. La inmunoterapia inyectiva (inmunoterapia subcutánea o SCIT) se informó por primera vez en 1911 y se ha utilizado en la práctica clínica desde la década de 1970. También se ha explorado la inmunoterapia a través de la administración de alérgenos a la mucosa, tal como la mucosa oral de la boca y el intestino. La inmunoterapia sublingual (SLIT), en la que la vacuna se administra debajo de la lengua y se absorbe a través de la mucosa sublingual, es una alternativa bien establecida a la inmunoterapia inyectiva. La inmunoterapia con alérgenos realizada por vía subcutánea o sublingual se establece actualmente como un tratamiento seguro y eficaz para las alergias, con un efecto modificador de la enfermedad. Sin embargo, no todos los pacientes tratados con inmunoterapia experimentarán una reducción de los síntomas. Por lo tanto, es de interés identificar los procedimientos de selección de pacientes que probablemente respondan bien a la inmunoterapia.

- 35 **[0004]** La solicitud de patente WO2012/137180 describe una lista de biomarcadores de eficacia de la inmunoterapia, entre los que se encuentra la Fetuína-A. Se observan diferentes isoformas de la Fetuína-A, sin embargo, este documento indica que la proporción de ácido siálico con respecto a los azúcares neutros no parece explicar la separación de las isoformas. Por el contrario, este documento sugiere que el polipéptido de Fetuína-A que comprende una serina fosforilada 330 puede ser un biomarcador de eficacia de la inmunoterapia de particular interés.

- 40 **[0005]** Huang y col., Journal of Proteome research, 2014, 13, 681-691 describen los patrones de glucosilación de la Fetuína-A. Sin embargo, se desconoce la función o funciones en las que están involucradas estas glucosilaciones.

- 45 **[0006]** Saroha y col., PlosOne, 2012, 7 describen que los pacientes con artritis reumatoide han reducido la sialilación de N-glucanos de Fetuína-A en plasma. Sin embargo, no se hace correlación con respecto a los sitios de O-glucanos.

- 50 **[0007]** Los inventores han demostrado que los polipéptidos de Fetuína-A, o fragmentos de los mismos, que llevan modificaciones postraduccionales específicas se expresan a un nivel más alto en pacientes que respondieron bien a la inmunoterapia con alérgenos para la alergia al polen de gramíneas que en pacientes que respondieron peor. Por lo tanto, estos polipéptidos tienen potencial como marcadores para la eficacia de la inmunoterapia, en particular como marcadores predictivos para su uso en la selección de pacientes que responderán a la inmunoterapia.

- 55 **[0008]** Los inventores también han demostrado que la Fetuína-A sialilada aumenta la inflamación alérgica mediada por TLR4, mejorando así las respuestas inflamatorias Th2 al polen de gramíneas o los ácaros del polvo doméstico. Un alto grado de sialilación de Fetuína-A reflejará una susceptibilidad de mayor respuesta alérgica. Sin embargo, se sabe que una mayor gravedad de los síntomas se correlaciona con la mejoría clínica durante la inmunoterapia.

- 60 **[0009]** Se describe el uso de polipéptidos de Fetuína-A, o fragmentos de los mismos, que llevan modificaciones postraduccionales específicas, como marcadores para la eficacia de la inmunoterapia. En un aspecto preferido, la proteína marcadora se usa para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a la inmunoterapia. En otro aspecto, la proteína marcadora se usa para seleccionar pacientes como candidatos adecuados para inmunoterapia.

RESUMEN DE LA INVENCION

65

[0010] La invención es como se define por las reivindicaciones.

[0011] Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a la inmunoterapia, cuyo procedimiento comprende detectar el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A o un fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica de dicho paciente, en el que dicha muestra biológica se toma antes del comienzo de y/o durante la inmunoterapia, y en el que dicha inmunoterapia comprende la administración de un alérgeno o autoantígeno a dicho paciente para tratar una alergia o una enfermedad autoinmune.

[0012] La invención proporciona además un procedimiento para seleccionar un paciente para inmunoterapia, cuyo procedimiento comprende las etapas de:

- 15 a) detectar el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica de dicho paciente;
- 20 b) comparar dicho nivel de expresión con un control;
- c) seleccionar o rechazar a dicho paciente para inmunoterapia basándose en la comparación con el control;

en el que dicha muestra biológica se toma antes del comienzo de la inmunoterapia, y en el que dicha inmunoterapia comprende la administración de un alérgeno o autoantígeno a dicho paciente para tratar una alergia o una enfermedad autoinmune.

[0013] Se describe adicionalmente un alérgeno o autoantígeno para su uso para inmunoterapia en un paciente seleccionado para inmunoterapia, que comprende seleccionar al paciente para inmunoterapia implementando el procedimiento para seleccionar a un paciente para inmunoterapia según la invención.

[0014] También se describe en esta invención un procedimiento para tratar a un paciente mediante inmunoterapia que comprende las etapas de:

- 1) seleccionar a un paciente para inmunoterapia:
 - 35 a) detectando el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y/o que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica de dicho paciente;
 - 40 b) comparando dicho nivel de expresión con un control;
 - c) seleccionando o rechazando a dicho paciente para inmunoterapia basándose en la comparación con el control;
- 45 en el que dicha muestra biológica se toma antes del comienzo de la inmunoterapia, y en el que dicha inmunoterapia comprende la administración de un alérgeno o autoantígeno a dicho paciente para tratar una alergia o una enfermedad autoinmune; y
- 2) administrar dicho alérgeno o autoantígeno a dicho paciente si el paciente se selecciona en la etapa c).

[0015] Se describe adicionalmente un procedimiento para tratar a un paciente mediante inmunoterapia que comprende las etapas de:

- 1) seleccionar a un paciente para inmunoterapia:
 - 55 a) detectando el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva uno o dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, por referencia a las posiciones aminoacídicas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica de dicho paciente;
 - 60 b) comparando dicho nivel de expresión con un control;
 - c) seleccionando o rechazando a dicho paciente para inmunoterapia basándose en la comparación con el control;

en el que dicha muestra biológica se toma antes del comienzo de la inmunoterapia, y en el que dicha inmunoterapia comprende la administración de un alérgeno o autoantígeno a dicho paciente para tratar una alergia o una

enfermedad autoinmune; y

2) administrar dicho alérgeno o autoantígeno a dicho paciente si el paciente se selecciona en la etapa c).

5 **[0016]** Según una realización específica, la inmunoterapia comprende la administración de un alérgeno a una superficie mucosa, opcionalmente una superficie sublingual, oral, bucal, ocular, rectal, urinaria, pulmonar o del oído, o la administración de un alérgeno a través de una vía subcutánea, intranasal, transdérmica, intralinfática o epicutánea.

[0017] Según otra realización, dicha inmunoterapia comprende la administración de un extracto de alérgeno.

10 **[0018]** Se describe adicionalmente un anticuerpo aislado, una lectina o un aptámero, que se une específicamente a un polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, como se define en la presente solicitud.

[0019] También se describe un péptido de la secuencia SEQ ID NO: 2 que lleva una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O asociada con dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoácidas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1.

20 **[0020]** Se describe adicionalmente un péptido de la secuencia SEQ ID NO: 2 que lleva una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O asociada con dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoácidas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1.

25 **[0021]** Se describe adicionalmente el uso de una proteína estándar de calibración de la secuencia SEQ ID NO: 1, de un péptido de la secuencia SEQ ID NO: 2, de un péptido de la secuencia SEQ ID NO: 3, o de un péptido de la secuencia SEQ ID NO: 4, opcionalmente marcada con uno o más agentes de marcaje de modificación de masa, para la cuantificación de la cantidad absoluta de, respectivamente, la proteína de la secuencia SEQ ID NO: 1, el péptido de la secuencia SEQ ID NO: 2, el péptido de la secuencia SEQ ID NO: 3, o el péptido de la secuencia SEQ ID NO: 4.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

Polipéptidos de Fetuína-A, o fragmentos de los mismos

35 **[0022]** La Fetuína-A también se conoce como glucoproteína alfa-2-HS, globulina alfa-2-Z, o glucoproteína Ba-alfa-2. Como se usa en esta invención, la Fetuína-A se refiere a la proteína que tiene el número de acceso Swiss-Prot FETUA_HUMAN, y/o con la referencia P02765 en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot del 20 de octubre de 2014, y/o el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos a continuación:

1MKSLVLLLCLAQLWGCHSAPHGPGLIYRQPNCDDEPETEEAALVAIDYINQNLPGWKHT
LNQIDEVKVWPQQPSGELFEIEIDTLETTCHVLDPTPVARCSVRQLKEHAVEGDCDFQLL
KLDGKFSVYAKCDSSPDSAEDVRKVCQDCPLLAPLNDTRVVHAAKAALAAFNAQNNG
SNFQLEEISRAQLVPLPPSTYVEFTVSGTDCVAKEATEAAKCNLLAEKQYGFCATLSEK
LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSQPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSPP
DSHVLLAAPPQHQLHRAHYDLRHTFMGVVSLGSPSGEVSHPRKTRTVVQPSVGAAAGP
VPPCPGRIRHFKV₃₆₇ (SEQ ID NO: 1).

40 **[0023]** El término "polipéptido de Fetuína-A" incluye el polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y todas las variantes de la misma.

45 **[0024]** El término "Variantes", o "isoformas" que pueden usarse indistintamente, se refiere a todas las formas alternativas de un polipéptido, por ejemplo, variantes de origen natural, variantes alélicas, SNP (polimorfismos mononucleotídicos), variantes de corte y empalme alternativas, formas truncadas o secretadas del polipéptido, y formas modificadas postraduccionalmente.

50 **[0025]** La variante puede diferir de la SEQ ID NO: 1 en una o más modificaciones, tales como, por ejemplo, adición, delección y/o sustitución, de uno o más aminoácidos. El polipéptido de la invención puede diferir, por ejemplo, de la SEQ ID NO: 1 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, o 30 aminoácidos.

[0026] Preferentemente, la variante comprende, o consiste en, una secuencia al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 1, y tiene preferentemente la misma actividad biológica que el polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 1. Por un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a la secuencia SEQ ID NO: 1, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido, después del alineamiento global por pares con la secuencia SEQ ID NO: 1, la secuencia de polipéptidos puede incluir hasta cinco modificaciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia SEQ ID NO: 1. En otras palabras, para obtener un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 1, hasta el 5 % (5 de 100) de los residuos de aminoácidos en la secuencia objeto puede insertarse, eliminarse o sustituirse con otro aminoácido. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse mediante un alineamiento global por pares utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch. El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar fácilmente, por ejemplo, utilizando el programa Needle, con la matriz BLOSUM62, y los siguientes parámetros hueco-apertura = 10, hueco-extensión = 0,5. Una "misma actividad biológica" puede representar una misma función biológica. Por lo tanto, en el contexto de la invención, un polipéptido que tiene una misma actividad biológica que el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 1 puede ser, por ejemplo, un polipéptido que exhibe una función pro o antiinflamatoria, o que inhibe la señalización de insulina o TGF- β , o que inhibe las calcificaciones patológicas. El experto en la materia puede evaluar fácilmente la actividad de un polipéptido *in vitro* o *in vivo*.

[0027] Las variantes modificadas postraduccionalmente pueden incluir formas acetiladas, formiladas, lipoiladas, miristoiladas, palmitoiladas, alquiladas, metiladas, amidadas, glucosiladas, hidroxiladas, nitrosiladas, fosforiladas, sulfatadas, polisialiladas y sialiladas.

[0028] Las variantes o isoformas de polipéptidos de Fetuína-A conocidas se describen en www.uniprot.org/uniprot/P02765. Incluyen modificaciones postraduccionales tales como isoformas que incluyen fosfoserina en los residuos 134, 138, 325, 328, 330 y/o 334; GlcNAc unida a N en los residuos 156 y/o 176; GlcNAc unida a O en las posiciones 256, 270 y/o 346; enlaces disulfuro entre las posiciones 32 y 358, 89 y 100, 114 y 132, 146 y 149, 208 y 219, 230 y 247; variantes naturales tales como los mutantes de sustitución V142L, T248M, T256S, D276N, R317C; formas pre y procesadas que comprenden o carecen de uno o más de: el péptido señal (residuos 1-18), la cadena A (residuos 19-300), la cadena B (residuos 341-367) y el péptido de conexión (residuos 301-340).

[0029] En el contexto de la invención, la numeración de las posiciones aminoacídicas en un polipéptido de Fetuína-A se determina mediante el alineamiento global por pares de dicho polipéptido con la secuencia SEQ ID NO: 1, y tomando la SEQ ID NO: 1 como secuencia de referencia para la numeración de las posiciones aminoacídicas. Por lo tanto, un aminoácido situado en dicha secuencia de polipéptidos en una posición correspondiente a la posición aminoacídica N en la secuencia SEQ ID NO: 1, como se determina por el alineamiento global por pares de dicho polipéptido con la secuencia SEQ ID NO: 1, se considera que está en la posición N en dicha secuencia de polipéptidos. Mientras se toma la SEQ ID NO: 1 como una secuencia de referencia para la numeración de las posiciones aminoacídicas, como se describe en esta invención, el polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que tiene dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256. En una realización preferida, el polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, comprende además una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

[0030] Un "fragmento" de una secuencia de polipéptidos de Fetuína-A se refiere a un tramo de aminoácidos contiguos de dicha secuencia de polipéptidos que es más corto que la secuencia de polipéptidos completa. En particular, un fragmento puede consistir en al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de polipéptidos. Preferentemente, un fragmento contiene no más de 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 o 25 aminoácidos consecutivos de dicha secuencia de polipéptidos.

[0031] En una realización preferida, el fragmento de Fetuína-A es un polipéptido que comprende o que consiste en la siguiente secuencia: ²³⁸LGGAEVAVTCTVFQTQPVTSPQPEGANEAVPTPVVDPDAPPSPPLGAPGLPPAGSP PDSHVLLAAPPQHQLHR₃₁₁ (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma.

[0032] Se describe adicionalmente que el fragmento de Fetuína-A es un polipéptido que comprende o que consiste en la siguiente secuencia: ²⁵⁵VTSQP₂₅₉ (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma.

[0033] Se describe adicionalmente que el fragmento de Fetuína-A es un polipéptido que comprende o que consiste en la siguiente secuencia: ²⁶⁸VPTPV₂₇₂ (SEQ ID NO: 4), o una variante de la misma.

[0034] La "cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales" comprende preferentemente una O-glucosilación de tipo mucina, que en esta invención se refiere a un glucano unido a través de N-acetilgalactosamina (GalNAc) unida a O, a un residuo de treonina o serina. Más preferentemente, la "cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales" comprende un glucano que comprende una N-acetilgalactosamina (GalNAc) unida a O, unido a una galactosa (Gal), estando tanto la N-acetilgalactosamina (GalNAc) como la galactosa (Gal) sialiladas, cada una con un ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac o NeuAc) (véanse la figura 4 y la tabla 2).

[0035] La "cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal" comprende preferentemente una O-glucosilación de tipo mucina, que en esta invención se refiere a un glucano unido a través de N-acetilgalactosamina (GalNAc) unida a O, a un residuo de treonina o serina. Más preferentemente, la "cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal" comprende un glucano que comprende una

5 N-acetilgalactosamina (GalNAc) unida a O, unido a una galactosa (Gal), estando la galactosa (Gal) sialilada con un ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac o NeuAc) (véanse la figura 4 y la tabla 2).

[0036] La presencia de modificaciones postraduccionales en proteínas purificadas puede determinarse mediante nanoLC-MS/MS, como se describe en el Ejemplo 1. Típicamente, las proteínas purificadas Fetuína A o

10 asialo-Fetuína A pueden solubilizarse en un tampón que contiene urea 8 M, Tris 75 mM pH 8,5 y TCEP 5 mM. A continuación, las proteínas pueden alquilarse con yodoacetamida (10 mM) durante 20 minutos y someterse a una solución de digestión con tripsina (relación en masa de 50/1 de proteína/proteasa) durante 3 h a 37 °C en presencia del 0,018 % de tensioactivo ProteaseMax (Promega, Charbonnières, Francia). Por ejemplo, se puede añadir FA al 2,5 % a la mezcla para inactivar la actividad enzimática, y los péptidos se pueden almacenar a -80 °C hasta el día del

15 análisis. Típicamente, las muestras de péptidos se pueden centrifugar a continuación a 18000 g y la mezcla de péptidos se puede separar usando una columna C₁₈ (Acclaim® PepMap RSLC 75 µm de D.I., 25 cm, partículas de 2 µm y tamaño de poro a 100 Å, Thermo Scientific). Los N y O-glucopéptidos pueden identificarse, por ejemplo, manualmente por la presencia de fragmentos de iones de oxonio específicos de glucano.

20 **[0037]** La "muestra biológica" puede ser, sin limitación, sangre, plasma, suero, secreción nasal, saliva, líquido broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo u orina. La muestra se toma preferentemente antes del comienzo de la terapia o antes del comienzo planificado de la terapia. La muestra también se puede tomar después del comienzo de la terapia, por ejemplo, después de completar una ronda de terapia para decidir si se procederá a rondas adicionales. Cuando el procedimiento es un procedimiento para determinar la eficacia de la terapia, la muestra se toma preferentemente antes

25 y/o después del comienzo de la terapia.

[0038] La detección del "nivel de expresión" de un polipéptido de Fetuína-A puede referirse al nivel de expresión de cualquier isoforma individual o variante de dicho polipéptido; el nivel colectivo de expresión de isoformas o variantes seleccionadas de dicho polipéptido; o el nivel total de expresión de dicho polipéptido, incluyendo la secuencia de

30 referencia y todas las isoformas y variantes. Por ejemplo, la detección del nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 puede incluir la detección del nivel de expresión de una glucoforma particular que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, un subconjunto de glucoformas que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido

35 siálico terminales en la posición 256, comprendiendo todas las glucoformas una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, o todas las formas de Fetuína-A modificadas o no modificadas, siempre que comprendan una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleve dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256.

40 **[0039]** En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención implican la detección de una sola isoforma proteica. En otras realizaciones, se detecta más de una isoforma de proteínas, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o al menos 15 isoformas de proteínas.

[0040] Según la invención, se determina el nivel de expresión del polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del

45 mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1.

Control

50 **[0041]** La expresión del polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en la muestra del paciente puede

55 compararse con un valor estándar de control y/o con la expresión de dicho polipéptido o fragmento en una muestra de control.

[0042] Un valor estándar de control puede ser un valor absoluto, tal como la abundancia total del polipéptido, o fragmento del mismo, por volumen de muestra biológica. Un valor estándar de control también se puede medir como

60 la relación de dicho polipéptido, o fragmento del mismo, en cualquier polipéptido, o fragmento del mismo, o en la suma de parte o todo el polipéptido, o fragmento del mismo, en una muestra biológica. Más preferentemente, un valor estándar de control puede ser la abundancia relativa de un fragmento del polipéptido de Fetuína-A, tal como la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, en comparación con la abundancia peptídica total de una muestra biológica. La muestra biológica puede agotarse o no en proteínas específicas antes de la medición. Preferentemente, la muestra

65 se agota en albúmina, IgG, anti-tripsina (o α1-antitripsina), IgA, transferrina y haptoglobulina. Más preferentemente, la

muestra se agota en cualquiera de las siguientes proteínas albúmina, IgG, anti-tripsina (o α 1-antitripsina), IgA, transferrina y haptoglobulina, glucoproteína de ácido α 1, macroglobulina α 2, apolipoproteína A1, apolipoproteína A2, complemento C3, fibrinógeno, IgM y transtiretina, o una combinación de los mismos.

- 5 **[0043]** La muestra de control puede ser la de un sujeto o sujetos de control. El sujeto de control puede ser, por ejemplo, un sujeto previamente identificado como no respondedor o mal respondedor a la terapia, o un grupo de dichos sujetos. Como alternativa, el sujeto de control puede ser un sujeto previamente identificado como respondedor a la terapia, o un grupo de dichos sujetos. La muestra de control también se puede obtener de un grupo de sujetos seleccionados al azar. El control también puede comprender un control interno. Por ejemplo, un subconjunto de un
- 10 grupo de candidatos para la terapia puede seleccionarse para terapia comparando el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en todos los candidatos y seleccionando aquellos candidatos con el nivel más alto de expresión para la terapia. Se puede obtener un valor estándar, por ejemplo, detectando el nivel de expresión en un grupo de sujetos y obteniendo una cifra promedio o mediana.
- 15 **[0044]** Como será evidente para el experto, la naturaleza de la comparación de la muestra del paciente con el control y las conclusiones extraídas dependerán de la naturaleza del control. Los inventores han demostrado que los polipéptidos de Fetuína-A, o fragmentos de los mismos, que llevan modificaciones postraduccionales específicas, están regulados positivamente en los sujetos respondedores. En este contexto, cuando el control se basa en un sujeto no respondedor o en un grupo de dichos sujetos, un valor igual o similar o inferior al control puede ser indicativo de
- 20 falta de respuesta a la terapia, mientras que un valor mayor que el control puede ser indicativo de capacidad de respuesta a la terapia. Por el contrario, cuando el control se basa en un sujeto respondedor o un grupo de dichos sujetos, un valor igual o similar o mayor que el control puede ser indicativo de la capacidad de respuesta a la terapia, mientras que un valor inferior al control puede ser indicativo de falta de respuesta a la terapia. Cuando el control se basa en un valor promedio o medio obtenido de un grupo aleatorio de sujetos, un valor igual o similar o superior al
- 25 control puede ser indicativo de la capacidad de respuesta a la terapia.

[0045] Por consiguiente, la identificación de un paciente como probable respondedor o no respondedor a la inmunoterapia basándose en la comparación con el control puede realizarse:

- 30 (i) determinando que es probable que el paciente responda a la inmunoterapia si el control se deriva de un sujeto respondedor o un grupo de sujetos respondedores que se sabe que responden a dicha inmunoterapia, y si un nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control; o
- 35 (ii) determinando que es probable que el paciente responda a la inmunoterapia si el control se deriva de un sujeto no respondedor o un grupo de sujetos no respondedores, y si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, en la muestra del paciente es mayor que el nivel de expresión en el control; o
- (iii) determinando que es probable que el paciente responda a la inmunoterapia si el control se deriva de un grupo de sujetos seleccionados aleatoriamente, y si un nivel de expresión de dicho polipéptido Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control.

- 40 **[0046]** Además, la selección o rechazo de dicho paciente para inmunoterapia basándose en la comparación con el control se realiza:

- 45 (i) si el control se deriva de un sujeto respondedor o un grupo de sujetos respondedores que se sabe que responden a dicha inmunoterapia, seleccionando al paciente para inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control (y rechazando al paciente de la inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es menor que el nivel de expresión en el control);
- 50 (ii) si el control se deriva de un sujeto no respondedor o un grupo de sujetos no respondedores, seleccionando al paciente para inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es mayor que el nivel de expresión en el control (y rechazando al paciente de la inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es menor que el nivel de expresión en el control); o
- 55 (iii) si el control se deriva de un grupo de sujetos seleccionados aleatoriamente, seleccionando al paciente para inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control (y rechazando al paciente de la inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es menor que el nivel de expresión en el control).

- 60 **[0047]** Se puede detectar un aumento o disminución en el nivel de expresión del polipéptido proteico, variantes del mismo y fragmentos del mismo, en una muestra de paciente en comparación con un control, como se detalla anteriormente. El cambio múltiple en la muestra del paciente en comparación con el control puede ser de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,4, al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2, al menos 2,2, al menos 2,4, al menos 2,6, al menos 2,8, al menos 3, al menos 3,5, al menos 4, al menos 4,5, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8
- 65 veces.

[0048] Además, el valor estándar de control o el nivel de expresión de dicho polipéptido, o fragmento del mismo, en una muestra de control puede variar dependiendo de la distinción entre paciente respondedor y no respondedor, determinándose esta distinción basándose en el umbral seleccionado para eficacia clínica. Por ejemplo, el valor estándar de control o el nivel de expresión de dicho polipéptido o fragmento puede determinarse basándose en un umbral para la eficacia clínica en el que la administración del tratamiento da como resultado una mejoría de los síntomas clínicos. Más particularmente, esto puede determinarse sobre la base de una mejoría de los síntomas clínicos detectada en una reducción de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 % de al menos un síntoma o una combinación de síntomas, como se ilustra

10 más adelante.

[0049] El valor estándar de control también puede determinarse sobre la base de un valor absoluto. Como será evidente para el experto, el valor absoluto dependerá del ensayo utilizado. El valor absoluto puede determinarse como el valor umbral de la abundancia del polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoácidas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra representativa de paciente para el que la inmunoterapia dio como resultado una mejoría de los síntomas clínicos detectada en una reducción de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 % de al menos un síntoma o una combinación de síntomas, como se ilustra más adelante.

[0050] En una realización preferida, el valor estándar de control consiste en una abundancia relativa de la SEQ ID NO: 2, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos el 0,0046 %, el 0,0133 %, al menos el 0,0219 %, al menos el 0,0393 %, al menos el 0,0566 % o al menos el 0,0740 % de la abundancia peptídica total en una muestra biológica. El valor estándar de control también puede expresarse como una abundancia relativa de la SEQ ID NO: 2, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos 3.600, al menos 10.400, al menos 17.100, al menos 30.600, al menos 44.100 o al menos 57.600, unidades en una muestra biológica. Además, el valor estándar de control expresado como una abundancia relativa de dicho péptido en unidades en una muestra biológica también puede establecerse (i) definiendo un valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS, y (ii) determinando el valor unitario aplicando la ecuación $Y = 0,0007397 \cdot X + 7,337$, donde $Y =$ "valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS" y $X =$ "Valor unitario". Asimismo, el valor de control expresado como una relación de la abundancia relativa de dicho péptido con la abundancia peptídica total en una muestra biológica puede establecerse además (i) definiendo un valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS, (ii) determinando el valor unitario aplicando la ecuación $Y = 0,0007397 \cdot X + 7,337$, donde $Y =$ "valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS" y $X =$ "Valor unitario", y (iii) determinando la relación de la abundancia relativa de dicho péptido con la abundancia peptídica total en una muestra biológica dividiendo el Valor unitario determinado en la etapa (ii) por el número 778009,62 que corresponde a la centésima parte de la media de la abundancia peptídica total. Más preferentemente, los valores estándar de control anteriores son aplicables para un procedimiento en el que se está agotando una muestra de suero de proteínas de muestra de suero principales tales como albúmina, IgG, anti-tripsina, IgA, transferrina y haptoglobulina, a continuación se digieren, más preferentemente 50 µg de proteína de suero agotada digerida con tripsina en una relación enzima/sustrato de al menos 1/25, y a continuación la abundancia se mide por espectrometría de masas, más preferentemente espectrometría de masas sin etiquetas con detección peptídica realizada con una intensidad peptídica >1000, una abundancia peptídica >2000, y $2+ \leq$ carga peptídica $\leq 12+$.

[0051] En otra realización preferida, el valor estándar de control consiste en una abundancia relativa de la SEQ ID NO: 2, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos el 0,0200 %, al menos el 0,0547 %, al menos el 0,0894 %, al menos el 0,1588 %, al menos el 0,2282 % o al menos el 0,2976 % de la abundancia peptídica total en una muestra biológica. El valor estándar de control también puede expresarse como una abundancia relativa de la SEQ ID NO: 2, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos 15.600, al menos 42.600, al menos 69.600, al menos 123.600, al menos 117.600 o al menos 231.600 unidades en una muestra biológica. Además, el valor estándar de control expresado como una abundancia relativa de dicho péptido en unidades en una muestra biológica también puede establecerse (i) definiendo un valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS, y (ii) determinando el valor unitario aplicando la ecuación $Y = 0,0001852 \cdot X + 7,111$, donde $Y =$ "valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS" y $X =$ "Valor unitario". Asimismo, el valor de control expresado como una relación de la abundancia relativa de dicho péptido con la abundancia peptídica total en una muestra biológica puede establecerse además (i) definiendo un valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS, (ii) determinando el valor unitario aplicando la ecuación $Y = 0,0007397 \cdot X + 7,337$, donde $Y =$ "valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS" y $X =$ "Valor unitario", y (iii) determinando la relación de la abundancia relativa de dicho péptido con la abundancia peptídica total en una muestra biológica dividiendo el Valor unitario determinado en la etapa (ii) por el

número 778009,62 que corresponde a la centésima parte de la media de la abundancia peptídica total. Más preferentemente, los valores estándar de control anteriores son aplicables para un procedimiento en el que se está agotando una muestra de suero de proteínas de muestra de suero principales tales como albúmina, IgG, anti-tripsina, IgA, transferrina y haptoglobulina, a continuación se digieren, más preferentemente 50 µg de proteína de suero agotada digerida con tripsina en una relación enzima/sustrato de al menos 1/25, y a continuación la abundancia se mide por espectrometría de masas, más preferentemente espectrometría de masas sin etiquetas con detección peptídica realizada con una intensidad peptídica >1000, una abundancia peptídica >2000, y 2+ ≤carga peptídica ≤12+.

- [0052]** En una realización preferida adicional, el valor estándar de control consiste en una abundancia relativa de la SEQ ID NO: 2, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, expresada en unidades en una muestra biológica, que se establece (i) definiendo un valor umbral para el porcentaje de mejoras de la ARTSS, (ii) definiendo un valor umbral de la sensibilidad de la prueba, y (iii) determinando el valor unitario correspondiente. Como alternativa, en lugar de determinar un valor umbral de la sensibilidad de la prueba en la etapa (ii), puede seleccionarse un valor umbral de especificidad. Asimismo, el valor de control expresado como una relación de la abundancia relativa de dicho péptido con la abundancia peptídica total en una muestra biológica puede establecerse además (i) definiendo un valor umbral para el porcentaje de mejora de la ARTSS, (ii) definiendo un valor umbral de la sensibilidad de la prueba, (iii) determinando el valor unitario correspondiente, y (iv) determinando la relación de la abundancia relativa de dicho péptido con la abundancia peptídica total en una muestra biológica dividiendo el Valor unitario determinado en la etapa (iii) por el número 778009,62 que corresponde a la centésima parte de la media de la abundancia peptídica total. Como alternativa, en lugar de determinar un valor umbral de la sensibilidad de la prueba en la etapa (ii), puede seleccionarse un valor umbral de especificidad. Como una realización más preferida, puede seleccionarse cualquiera de los valores unitarios en una muestra biológica definidos en las tablas 3, 4 y 5. Más preferentemente, los valores estándar de control anteriores son aplicables para un procedimiento en el que se está agotando una muestra de suero de proteínas de muestra de suero principales tales como albúmina, IgG, anti-tripsina, IgA, transferrina y haptoglobulina, a continuación se digieren, más preferentemente 50 µg de proteína de suero agotada digerida con tripsina en una relación enzima/sustrato de al menos 1/25, y a continuación la abundancia se mide por espectrometría de masas, más preferentemente espectrometría de masas sin etiquetas con detección peptídica realizada con una intensidad peptídica >1000, una abundancia peptídica >2000, y 2+ ≤carga peptídica ≤12+.

Detección de proteínas, o fragmento de las mismas

- [0053]** El nivel de expresión del polipéptido de Fetuína-A o fragmento que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, puede determinarse por electroforesis en gel (SDS-PAGE), por análisis de masas, por ensayo de afinidad tal como ensayos basados en lectina o aptámero, por inmunoensayo, o cualquier combinación de los mismos.
- [0054]** La expresión de polipéptidos se puede determinar mediante análisis de masas, tal como espectrometría de masas (MS). Las técnicas de espectrometría de masas cualitativa y cuantitativa son conocidas y se utilizan en la técnica. También se puede usar un análisis por LC-MS/MS cuantitativa.
- [0055]** El nivel de expresión del polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, puede determinarse, por ejemplo, por la cuantificación de la cantidad absoluta de dicho polipéptido de Fetuína-A o fragmento en una muestra biológica:
- a) proporcionando una cantidad conocida del polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, opcionalmente marcado, como estándar de calibración,
 - b) degradando la muestra para obtener una mezcla de polipéptidos, opcionalmente marcados, en la que al menos los polipéptidos en la muestra degradada o en el estándar de calibración están marcados, y si ambos polipéptidos están marcados, el agente de marcaje utilizado para los polipéptidos en el estándar de calibración es diferente del agente de marcaje utilizado para los polipéptidos en la muestra degradada,
 - c) cuantificando la cantidad absoluta del polipéptido según la invención en la muestra degradada correlacionando la cantidad del polipéptido en el estándar de calibración con la cantidad del polipéptido correspondiente en la muestra degradada mediante análisis de masas.
- [0056]** La etapa de cuantificación puede realizarse, por ejemplo, usando espectrometría de masas, el etiquetado puede realizarse, por ejemplo, usando química ITRAQ™, y la etapa de degradación puede realizarse, por ejemplo, usando una enzima proteolítica, tal como tripsina, papaína, pepsina, ArgC, LysC, proteasa V8, AspN, pronasa, quimotripsina y carboxipeptidasa C, o una combinación de las mismas, como se describe en el documento WO 2007/031080.

[0057] La cuantificación de la cantidad de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, también se puede determinar mediante la cuantificación de su abundancia relativa.

[0058] Esto puede ser determinado:

- 5 a) degradando con pronasa la muestra que contiene el polipéptido a cuantificar para obtener una mezcla de polipéptidos,
- b) cuantificando la abundancia relativa del polipéptido según la invención en la muestra digerida con pronasa midiendo la abundancia relativa del péptido de la SEQ ID NO: 3 que comprende una cadena de oligosacáridos
- 10 unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, y midiendo la abundancia relativa del péptido de la SEQ ID NO: 4 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

[0059] En Huang y col. 2014, se proporcionó un valor m/z de 594,2537 para $z = 2$ para el péptido de la SEQ ID NO: 3 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, y se proporcionó un valor m/z de 730,3203 para $z = 2$ para el péptido de la SEQ ID NO: 4 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

[0060] Preferentemente, la cuantificación de la cantidad de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, puede determinarse:

- a) degradando con tripsina la muestra que contiene el polipéptido a cuantificar para obtener una mezcla de polipéptidos
- 25 b) cuantificando la abundancia relativa del polipéptido según la invención en la muestra digerida con tripsina midiendo la abundancia relativa del péptido de la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, y/o midiendo la abundancia
- 30 relativa del péptido de la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

[0061] Más preferentemente, la cuantificación de la cantidad de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, puede determinarse:

- 35 a) proporcionando una muestra de suero agotada en albúmina, IgG, anti-tripsina, IgA, transferrina y haptoglobulina
- b) degradando la muestra de suero agotada con tripsina, preferentemente con una relación de enzima con respecto a la muestra de suero agotada de al menos 1:25 peso/peso, para obtener una mezcla de polipéptidos,
- 40 c) cuantificando la abundancia relativa del polipéptido según la invención en la muestra de suero agotada digerida con tripsina midiendo la abundancia relativa del péptido de la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, y/o midiendo la
- 45 abundancia relativa del péptido de la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, con detección peptídica realizada con una intensidad peptídica >1000 , una abundancia peptídica >2000 , y $2+ \leq \text{carga peptídica} \leq 12+$

[0062] Para dicha cuantificación, se prefiere que la muestra de suero agotada sometida a digestión con tripsina comprenda al menos 50 μg de proteína total.

[0063] En la presente solicitud, se describe un valor m/z de 1858,2795 para $z = 5$, comprendiendo el péptido de la SEQ ID NO: 2 una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, y se describe un valor m/z de 1800,0704 para $z = 5$, comprendiendo el péptido de la SEQ ID NO: 2 una

55 cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

[0064] El péptido de calibración se prepara preferentemente mediante síntesis de péptidos. El número de aminoácidos en el péptido estándar de calibración está preferentemente en el intervalo de 2-20 aminoácidos, más preferentemente en el intervalo de 4-15, y lo más preferido en el intervalo de 6-15. El número depende del sitio óptimo de escisión enzimática que coincida con la secuencia de aminoácidos dentro de la muestra, es decir, la secuencia de región constante o variable cuando la muestra se escinde por una enzima. Además, el péptido estándar de calibración a usar depende de la etiqueta y el procedimiento de cuantificación que se utilizará para dar una señal detectable y fragmentación cuando se analiza en un instrumento de MS.

65

[0065] También se describe el polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 1, el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, o el polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 4, opcionalmente marcado con uno o más agentes de etiquetado modificadores de masa, que se utiliza como una proteína estándar de calibración. Más específicamente, el polipéptido de la secuencia SEQ ID NO: 1 o el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 comprenden una

5 cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1.

[0066] La expresión también puede determinarse usando un anticuerpo que se une específicamente a un

10 polipéptido de Fetuina-A o fragmento que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, y/o una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico

15 terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

[0067] Como se usa en esta invención, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" tienen el mismo significado y se usan en el sentido más amplio e incluyen específicamente anticuerpos monoclonales intactos,

20 anticuerpos policlonales, quiméricos, anticuerpos, diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y también fragmentos de anticuerpos.

[0068] En particular, el anticuerpo puede estar comprendido en un antisuero.

[0069] También se describe un anticuerpo dirigido contra la secuencia SEQ ID NO: 2 que comprende una

25 cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, contra la secuencia SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico

30 terminales en la posición 270, contra la secuencia SEQ ID NO: 3 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, o contra la secuencia SEQ ID NO: 4 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

[0070] El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb", como se usa en esta invención, se refiere a una molécula de anticuerpo de una única composición de aminoácidos, que se dirige contra un antígeno específico y que puede producirse por un solo clon de linfocitos B o hibridoma. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser recombinantes, es decir, obtenidos por ingeniería de proteínas. Los anticuerpos recombinantes pueden producirse en una línea celular de mamífero tal como CHO, NSO, PERC6 o cualquier otra célula después de la transfección.

[0071] El término "anticuerpos policlonales" se refiere a una combinación de inmunoglobulinas dirigidas contra un antígeno específico, uniéndose posiblemente cada inmunoglobulina a un epítipo diferente en el antígeno. Los anticuerpos policlonales generalmente se producen por inmunización de un mamífero adecuado, como un ratón, conejo o cabra.

[0072] El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo modificado que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, en asociación con un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en particular un anticuerpo humano. El animal no humano puede ser un ratón, una rata, un hámster, un conejo, o similares.

[0073] La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo genomanipulado que posee dos sitios de unión a antígeno diferentes. En una realización preferida de la invención, la al menos una molécula de unión a CD5 y al menos una molécula de unión a HLA-DR de la invención es un anticuerpo biespecífico que puede unirse a CD5 y a HLA-DR.

[0074] El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). En general, al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Preferentemente, el diacuerpo puede reconocer CD5 y HLA-DR.

[0075] La expresión "fragmentos de anticuerpos" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de

65 anticuerpos incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados

a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0076] El anticuerpo puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Los anticuerpos se pueden usar para determinar la expresión de proteínas en una variedad de ensayos inmunológicos que incluyen sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencia Western, radioinmunoensayo tal como RIA (inmunoensayo ligado a radio), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), inmunoensayos tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, por ejemplo, FIA (inmunoensayo ligado a fluorescencia), inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) e inmunoensayos de proteína A. Dichos ensayos son rutinarios y se conocen bien por el experto en la materia.

[0077] Como alternativa, la expresión puede determinarse usando un aptámero específico de proteína. Un aptámero es un péptido corto capaz de unirse específicamente a una secuencia de proteína específica, que consiste en un bucle de péptido variable unido en ambos extremos a un andamiaje de proteína. Los procedimientos para preparar aptámeros de proteínas son bien conocidos en la técnica, siendo el procedimiento más utilizado el sistema de doble híbrido de levadura. Dichos aptámeros se pueden marcar preferentemente para permitir la detección de una interacción proteína-ligando. También se podría usar un ensayo basado en nanotecnología.

[0078] Como se usa en esta invención, una lectina se refiere a una proteína o polipéptido de unión a carbohidratos, o una proteína o polipéptido altamente específico para restos de azúcar. Más preferentemente, las lectinas son proteínas de unión a glucano que se unen a su resto glucano diana con alta especificidad. Como tal, las lectinas se usan para el reconocimiento de proteínas-carbohidratos y para detectar variaciones sutiles en las estructuras de los carbohidratos. También se ha demostrado que las lectinas son sensibles a los cambios en las glucosilaciones de proteínas, tales como cambios en el contenido de ácido siálico o residuos de fucosilo presentes en las glucoproteínas séricas. Los ejemplos de lectinas y sus especificidades de glucano se enumeran a continuación (véase Fanavan y col., Electrophoresis, Jul 2012, 33 (12):1746-54):

Tabla 1

Lectina	Especificidad
Concanavalina A (Con A)	Estructuras manosídicas ramificadas de alto contenido en manosa
Aglutinina de germen de trigo (WGA)	N-acetilglucosamina; Quitobiosa
Jacalina (JAC)	Galactosilo (b-1,3) N-acetilgalactosamina (O-glucoproteínas)
Lectina de <i>Sambucus nigra</i> (SNA, EBL)	Ácido siálico unido a la galactosa terminal en (a-2,6)
Aglutinina de cacahuete (PNA)	Galactosilo (b-1,3) N-acetilgalactosamina (T-Antígeno)
Aglutinina de <i>Lens culinaris</i> (LCA)	Residuos de manosa unidos
Leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA-L)	N-glucano de tipo complejo tri/tetra-antenario
Lectina de <i>Aleuria aurantia</i> (AAL)	Fucosa unida (a -1,6) a N-acetilglucosamina; fucosa unida (a -1,3) a N-acetil-lactosamina

[0079] En un aspecto, el anticuerpo, el aptámero o la lectina se une específicamente a una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva uno o dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256, o a una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270; o el anticuerpo, aptámero o lectina no se une significativamente al polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, que carece una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva uno o dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y/o una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

Aplicaciones terapéuticas

[0080] La "alergia" o la "hipersensibilidad tipo 1" es una afección caracterizada por la producción de IgE específica de alérgeno en respuesta a un alérgeno específico, usualmente una proteína. Las manifestaciones clínicas y los síntomas de alergia pueden incluir congestión nasal, prurito nasal, prurito ocular, lagrimeo, rinitis, estornudos, sibilancias, conjuntivitis, picazón cutánea, dermatitis, irritación cutánea, vómitos, calambres estomacales, indigestión, diarrea, urticaria, dificultad para respirar, tos repetitiva, dificultad para tragar, hinchazón de la lengua y/o labios, pulso débil, mareos o confusión y asma.

[0081] Un "alérgeno" es una sustancia, usualmente una proteína, que provoca la producción de anticuerpos IgE en individuos predispuestos. Los alérgenos pueden incluir alérgenos de polen (tales como alérgenos de polen de árboles, hierbas, malezas y gramíneas), alérgenos de insectos (tales como alérgenos de inhalantes, saliva y veneno, por ejemplo, alérgenos de ácaros, mosquitos y ácaros del polvo doméstico y alérgenos de venenos de himenópteros),

alérgenos del pelo y la caspa de animales (por ejemplo, perro, gato, caballo, rata, ratón, conejo), y alérgenos alimentarios (tales como cacahuete, frutos secos, leche, huevo, trigo, marisco).

[0082] Preferentemente, el alérgeno o alérgenos administrados al paciente que padece alergia, como inmunoterapia, corresponden a los alérgenos a los que el paciente es alérgico.

[0083] En una realización preferida, el paciente tiene alergia a los ácaros del polvo doméstico y la inmunoterapia usa extracto de ácaros del polvo doméstico de uno o más de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*. En una realización específica, la inmunoterapia comprende la administración de extracto de uno o más de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*.

[0084] En otra realización preferida, el paciente tiene alergia al polen de gramíneas y la inmunoterapia usa alérgeno de polen de gramíneas. En una realización específica, la inmunoterapia comprende la administración de uno o más extractos de polen de 5 gramíneas, en particular de uno o más extractos de polen de uno o más de los géneros *Dactylis*, *Poa*, *Lolium*, *Anthoxanthum* y *Phleum*.

[0085] Por ejemplo, un alérgeno proteico se puede seleccionar del grupo que consiste en un alérgeno proteico del género *Dermatophagoides*; un alérgeno proteico del género *Felis*; un alérgeno proteico del género *Ambrosia*; un alérgeno proteico del género *Lolium*; un alérgeno proteico del género *Cryptomeria*; un alérgeno proteico del género *Alternaria*; un alérgeno proteico del género *Alder*, un alérgeno proteico del género *Betula*; un alérgeno proteico del género de *Blomia*; un alérgeno proteico del género *Quercus*; un alérgeno proteico del género *Olea*; un alérgeno proteico del género *Artemisia*; un alérgeno proteico del género *Plantago*; un alérgeno proteico del género *Parietaria*; un alérgeno proteico del género *Canine*; un alérgeno proteico del género *Blattella*; un alérgeno proteico del género *Apis*; un alérgeno proteico del género *Cupressus*; un alérgeno proteico del género *Thuya*; un alérgeno proteico del género *Chamaecyparis*; un alérgeno proteico del género *Periplaneta*; un alérgeno proteico del género *Agropyron*; un alérgeno proteico del género *Secale*; un alérgeno proteico del género *Triticum*; un alérgeno proteico del género *Cynorhodon*; un alérgeno proteico del género *Juniperus*; un alérgeno proteico del género *Dactylis*; un alérgeno proteico del género *Festuca*; un alérgeno proteico del género *Poa*; un alérgeno proteico del género *Lolium*; un alérgeno proteico del género *Avena*; un alérgeno proteico del género *Holcus*; un alérgeno proteico del género *Anthoxanthum*; un alérgeno proteico del género *Arrhenatherum*; un alérgeno proteico del género *Agrostis*; un alérgeno proteico del género *Phleum*; un alérgeno proteico del género *Phalaris*; un alérgeno proteico del género *Paspalum*; un alérgeno proteico del género *Sorghum*; un alérgeno proteico del género *Arachis*; un alérgeno proteico del género *Gallus* y un alérgeno proteico del género *Bos*.

[0086] Ejemplos de diversos alérgenos proteicos conocidos derivados de algunos de los géneros identificados anteriormente incluyen: *Betula* (*verrucosa*) Bet v 1; Bet v 2; *Blomia* Blo t 1; Blo t 3; Blo t 5; Blo t 12; *Cynodon* Cyn d 1; *Dermatophagoides* (*pteronyssinus* o *farinae*) Der p 1; Der p 2; Der p 3; Der p 7; Der f 1; Der f 2; Der f 3; Der f 7; *Felis* (*domesticus*) Fel d 1; *Ambrosia* (*artemiisfolia*) Amb a 1; Amb a 3; Amb a 4; Amb a 5; Amb a 6; Amb a 7; Amb a 8; Amb a 9; Amb a 10; Amb a 11; *Lolium* (*perenne*) Lol p 1; Lol p 2; Lol p 3; Lol p 4; Lol p 9 (Lol p 5 o Lol p 1b); *Cryptomeria* (*japonica*) Cry j 1; Cry j 2; *Canis* (*familiaris*) Can f 1; Can f 2; *Juniperus* (*sabinoide* o *virginiana*) Jun s 1; Jun v 1; *Juniperus* (*ashei*) Jun a 1; Jun a 2; *Dactylis* (*glomerata*) Dae g 1; Dae g 5; *Poa* (*pratensis*) Poa p 1; *Phleum* (*pratense*) Phl p 1; Phl p 5; Phl p 6; *Sorghum* (*halepensis*) Sor h 1; *Arachis* (*hypogaea*) Ara h 1; Ara h 2; Ara h 6; *Gallus* (*domesticus*) Gal d 1; Gal d 2; Gal d 3; Gal d 4; y *Bos* (*domesticus*) Bos d 2; Bos d 3; Bos d 4; Bos d 5; Bos d 6; Bos d 7; Bos d 8; Bos d 9; Bos d 10; Bos d 11; Bos d 12.

[0087] Como se usa en el presente documento, un "autoantígeno" se refiere a un antígeno endógeno capaz de estimular la producción de autoanticuerpos, por ejemplo, en una reacción autoinmune.

[0088] En los trastornos autoinmunes, el sistema inmunitario produce anticuerpos contra un antígeno endógeno. Las células recubiertas de anticuerpos, como cualquier partícula extraña recubierta de manera similar, activan el sistema del complemento, dando como resultado una lesión tisular. La mayoría de los trastornos autoinmunes humanos son enfermedades específicas de linfocitos T impulsados por antígenos. Los clones de linfocitos T que responden a epítomos antigénicos específicos son responsables del inicio y/o la propagación de estas enfermedades. De forma similar, las respuestas específicas de linfocitos T impulsados por antígeno son responsables del rechazo de aloinjertos de órganos. Los linfocitos T activados proporcionan el "motor" para la inflamación crónica asociada con los trastornos autoinmunes. Los trastornos autoinmunes incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria intestinal (EII), lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Graves y diabetes mellitus. "Inmunoterapia" se refiere a la administración de un alérgeno o autoantígeno a un paciente con el objetivo de reducir la respuesta inmune actual o futura, tal como una respuesta de IgE, y/o la manifestación de síntomas clínicos de alergia o un trastorno autoinmune. La inmunoterapia se lleva a cabo convencionalmente mediante la administración repetida de una monodosis o dosis graduales de un alérgeno a un paciente que lo necesite, lo que da como resultado una respuesta inmunitaria adaptativa del paciente que se vuelve insensible al alérgeno.

[0089] La inmunoterapia puede comprender la administración de un alérgeno a una superficie mucosa,

opcionalmente una superficie sublingual, oral, bucal, ocular, rectal, urinaria, pulmonar o del oído. En particular, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia sublingual. Como alternativa, la inmunoterapia puede comprender la administración a través de una vía parenteral, tal como subcutánea o intravenosa, por ejemplo, a través de inyección, o a través de rutas alternativas tal como la intranasal, inmunización cutánea, por ejemplo; administración transdérmica o epicutánea, o intralinfática.

[0090] El alérgeno utilizado para la inmunoterapia puede ser una sola sustancia alergénica o una mezcla de dichas sustancias, por ejemplo, una mezcla de proteínas. Puede ser un extracto de alérgeno parcial o totalmente purificado, tal como un extracto de polen, un extracto de ácaros del polvo doméstico, una proteína purificada natural, una proteína recombinante, un hipoalergénico o alergoide o péptido derivado de los mismos, o cualquier péptido o polipéptido sintetizado químicamente que contenga la misma secuencia primaria. Por ejemplo, cuando la inmunoterapia se usa para tratar la alergia al polen de gramíneas, el alérgeno administrado para inmunoterapia puede ser un extracto de polen de gramíneas de polen de uno o varios géneros de gramíneas, tales como los géneros *Dactylis*, *Poa*, *Lolium*, *Anthoxanthum* y *Phleum*. Asimismo, cuando la inmunoterapia se usa para tratar la alergia a los ácaros del polvo doméstico, el alérgeno administrado para la inmunoterapia puede ser un extracto de ácaros del polvo doméstico de uno o varios géneros de ácaros del polvo tales como *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Dermatophagoides farinae*.

[0091] El alérgeno también puede ser un alergoide, es decir, una forma modificada químicamente de un alérgeno de origen natural que se ha modificado químicamente (por ejemplo, mediante aldehydación). El alérgeno puede administrarse junto con un adyuvante.

[0092] La inmunoterapia puede comprender además la administración de un agente adicional. Dicho agente adicional se administra preferentemente a un paciente sometido a inmunoterapia con alérgenos. Por ejemplo, puede administrarse con el alérgeno en el transcurso del régimen inmunoterapéutico, o administrarse como un agente adicional a un paciente sometido, o que se ha sometido a inmunoterapia con alérgenos. Dicho agente adicional puede formularse con el alérgeno y administrarse en combinación con el alérgeno, administrarse simultáneamente con el alérgeno, pero de forma separada, o administrarse por separado como un complemento de la administración del alérgeno.

[0093] La "respuesta" de un paciente al tratamiento indica que el paciente manifiesta una reducción en los síntomas clínicos de la alergia. Los síntomas clínicos pueden evaluarse durante el curso del tratamiento, es decir, los síntomas antes del tratamiento pueden compararse con los síntomas durante y después del tratamiento. Como alternativa, se puede determinar una reducción de los síntomas en comparación con un nivel de referencia establecido antes del tratamiento. El nivel de referencia puede establecerse sobre la base o no de una prueba de provocación. Este enfoque es particularmente útil cuando, por ejemplo, la inmunoterapia se lleva a cabo en pacientes que actualmente no experimentan síntomas, como puede ser el caso de las personas alérgicas al polen estacional de las gramíneas, que pueden recibir tratamiento antes de la temporada de polen. Los síntomas pueden evaluarse mediante procedimientos estándar, como la autoevaluación del paciente o el registro de la cantidad de medicamento requerida. El grado de respuesta de un paciente al tratamiento puede evaluarse midiendo el grado de reducción de la gravedad de los síntomas, por ejemplo, como se describe en la sección experimental a continuación.

[0094] Un sujeto "respondedor" como se define en esta invención es un sujeto que responde a la inmunoterapia con una mejora en los síntomas clínicos más alta que los pacientes que reciben placebo o ningún tratamiento. Preferentemente, un sujeto respondedor demostrará una mejora en los síntomas clínicos que es igual o similar o mayor que la mejora promedio o mediana observada en una muestra aleatoria de sujetos que reciben tratamiento.

[0095] Un sujeto "no respondedor" es un sujeto que no manifiesta ninguna mejora en los síntomas clínicos después de la inmunoterapia, o que demuestra una mejora en los síntomas clínicos que es igual o similar o menor en comparación con los pacientes que reciben placebo o ningún tratamiento.

[0096] Por ejemplo, la mejora en los síntomas clínicos para la hipersensibilidad de tipo 1 o alergia se puede detectar mediante:

- una reducción en la frecuencia o gravedad de la congestión nasal, prurito nasal, prurito ocular, lagrimeo, rinorrea, sinusitis, rinitis, estornudos, sibilancias, conjuntivitis, picazón cutánea, dermatitis, irritación cutánea, vómitos, calambres estomacales, indigestión, diarrea, urticaria, dificultad para respirar, tos repetitiva, dificultad para tragar, hinchazón de la lengua y/o labios, pulso débil, mareos o confusión y asma, y/o
- una reducción en la absorción de medicamentos de alivio conocidos tales como antihistamínicos, corticosteroides, agentes broncodilatadores o agentes antileucotrienos.

[0097] Además, la mejora de los síntomas clínicos también puede demostrarse en base a una combinación de los mismos, tales como la puntuación de los síntomas (por ejemplo, puntuación total de los síntomas de rinoconjuntivitis (RTSS) (*Rhinoconjunctivitis Total Symptom Score*)) o la puntuación promedio total de los síntomas de rinoconjuntivitis (ARTSS) (*Average Rhinoconjunctivitis Total Symptom Score*)), puntuación de la medicación (por ejemplo, puntuación

de la medicación de rescate (RMS (*Rescue Medication Score*)) o puntuación promedio de la medicación de rescate (ARMS (*Average Rescue Medication Score*)), puntuaciones combinadas (por ejemplo, puntuación combinada de los síntomas (CS (*Combined Symptoms Score*)), puntuación promedio combinada de los síntomas (ACS (*Average Combined Symptoms Score*))) (véanse Clark J. y col., *Allergy* 2007: 62: 1023-1028; Pfaar y col., *Allergy* 2014: 69: 854-867).

[0098] "Terapia", "terapéutico", "tratamiento" o "tratar" incluyen reducir, aliviar o inhibir o eliminar los síntomas de la alergia, así como el tratamiento destinado a reducir, aliviar, inhibir o eliminar dichos síntomas. Estos términos pueden incluir el tratamiento preventivo que tiene la intención, o tiene el efecto de reducir, aliviar, inhibir o eliminar síntomas futuros. También pueden incluir el tratamiento de los síntomas continuos.

[0099] "Paciente" incluye a cualquier individuo que sea candidato para la inmunoterapia, incluyendo individuos que actualmente no están sometiéndose a terapia. En la mayoría de los casos, el paciente será un individuo que tiene, o ha tenido en cualquier momento en el pasado, síntomas clínicos de alergia y/o sensibilización a un alérgeno y/o una respuesta de IgE específica de alérgeno, o un individuo en riesgo de desarrollando dichos síntomas. La sensibilización a un alérgeno se puede evaluar mediante la detección de IgE dirigida contra uno o más alérgenos de esta fuente en el suero del paciente o mediante pruebas cutáneas con una preparación que contenga el uno o más alérgenos correspondientes. El alérgeno puede incluir, sin limitación, cualquiera de los alérgenos descritos en esta invención, en particular un alérgeno de polen de gramíneas o un alérgeno de ácaros del polvo doméstico. El paciente tiene preferentemente alergia al polen de gramíneas o alergia a los ácaros del polvo doméstico, y más preferentemente alergia al polen de uno o más de los géneros *Dactylis*, *Poa*, *Lolium*, *Anthoxanthum*, *Phleum* y *Dermatophagoides*. El paciente es preferentemente un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino o un primate, y es preferentemente un ser humano, en particular un niño, una mujer, un hombre.

[0100] A lo largo de la presente solicitud, el término "que comprende" debe interpretarse como que incluye todas las características mencionadas específicamente, así como las opcionales, adicionales y no especificadas. Como se usa en esta invención, el uso del término "que comprende" también incluye la realización en la que no están presentes características distintas de las características mencionadas específicamente (es decir, "que consiste en"), así como la realización en la que están presentes características distintas de la característica específicamente mencionada siempre que las características esenciales de la composición no se vean materialmente afectadas por su presencia (es decir, "que consiste esencialmente en").

[0101] La presente invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se dan solo a modo de ilustración de la invención y no constituyen en modo alguno una limitación de la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[0102]

La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia del polipéptido de Fetuína-A de referencia.
 La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de un primer fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de un segundo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de un tercer fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de un cuarto fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de un quinto fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de un sexto fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de un séptimo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de un octavo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de un noveno fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de un décimo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de un undécimo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de un duodécimo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de un decimotercer fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de un decimocuarto fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de un decimoquinto fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de un decimosexto fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de un decimoséptimo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de un decimoctavo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de un decimonoveno fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 21 muestra la secuencia de un vigésimo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 22 muestra la secuencia de un vigésimo primer fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de un vigésimo segundo fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 24 muestra la secuencia de un vigésimo tercer fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia de un vigésimo cuarto fragmento de Fetuína-A.
 La SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de un vigésimo quinto fragmento de Fetuína-A.

La SEQ ID NO: 27 muestra la secuencia de un vigésimo sexto fragmento de Fetuína-A.

La SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de un primer fragmento de Fetuína-B.

La SEQ ID NO: 29 muestra la secuencia de un segundo fragmento de Fetuína-B.

La SEQ ID NO: 30 muestra la secuencia de un tercer fragmento de Fetuína-B.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0103]

10 **Figura 1:** Diseño del estudio. Después de la detección y la aleatorización, los pacientes fueron tratados una vez al día con un placebo o un comprimido de polen de 5 gramíneas durante 4 meses. Las exposiciones al polen de gramíneas se realizaron antes del tratamiento y el día 7, y los meses 1, 2 y 4, concomitantemente con la evaluación de la ARTSS. La búsqueda de biomarcadores predictivos se realizó en 82 muestras de suero recogidas de

15 **Figura 2:** Abundancias de puntos de proteína Fetuína A medidos por 2D-DiGE como media $\pm$ SEM en grupos activo (A) y de placebo (C), y correlaciones de Spearman entre las abundancias de Fetuína A y porcentajes de mejora de la ARTSS en pacientes de los grupos activo (B) y de placebo (D) después de 4 meses de AIT. Los puntos de Fetuína A están numerados en función de su punto isoeléctrico. Se definen 4 subgrupos de pacientes en función de la mediana del porcentaje de mejora en la ARTSS en el grupo activo: respondedores activos (AR, n = 21), no

20 respondedores activos (ANR, n = 20), respondedores a placebo (PR, n = 7), y no respondedores a placebo (PNR, n = 33)

Figura 3: Medición de la masa intacta de la cadena A de Fetuína A purificada a partir de suero humano sano mediante espectrometría de masas.

25 **Figura 4:** Las variantes postraduccionales OG1, OG2 y OG3 de Fetuína A analizadas por espectrometría de masas representan rombos para el ácido siálico o el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac o NeuAc), círculos para galactosa (Gal) y cuadrados para N-acetilgalactosamina (GalNAc). OG3 consiste en la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una

30 cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270. OG2 consiste en la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270

Figura 5: Las abundancias de O-glucopéptidos se muestran como media $\pm$ SEM en los grupos activo (a) y de placebo (c). La diferencia entre los grupos se probó usando una prueba de Mann-Whitney (indicando * y *** valores p $\leq$ 0,05 y $\leq$ 0,001, respectivamente). Correlación de Pearson de la abundancia de O-glucopéptido 3 con porcentajes

35 de mejora de la ARTSS en pacientes de grupos activo (b) y de placebo (d) después de 4 meses de AIT. Se definen 4 subgrupos de pacientes en función de la mediana del porcentaje de mejora en la ARTSS en el grupo activo: respondedores activos (AR, n = 21), no respondedores activos (ANR, n = 21), respondedores a placebo (PR, n = 7), y no respondedores a placebo (PNR, n = 33).

40 **Figura 6:** Medición de la masa intacta de Fetuína A sialilada purificada a partir de suero humano sano mediante espectrometría de masas. **a)** Análisis por LC-UV de las formas reducidas de FetA natural (en un tampón que contiene DTT 20 mM), **b-d)** Análisis por espectrometría de masas de la cadena B. Las formas no glucosiladas (b) y sialiladas (glucanos unidos a O) se pueden observar en el espectro de masas (c, d). Cuadrado = N-acetilglucosamina; círculo = hexosa; rombo = ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). **Figura 7:** Medición de la

45 masa intacta de Fetuína A desialilada purificada a partir de suero humano sano mediante espectrometría de masas.

a) Análisis por LC-UV de las formas reducidas de FetA natural (DTT 20 mM).

b-d) Análisis por espectrometría de masas de la cadena A (b) y la cadena B (c-d). Cuadrado = N-acetilglucosamina; círculo = hexosa; rombo = ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). El término AsialoFetA significa Fetuína A desialilada.

50

Figura 8: Correlaciones de Spearman entre las abundancias de O-glucopéptidos y los porcentajes de mejora de la ARTSS en pacientes del grupo activo después de 4 meses de AIT. OG = O-glucopéptido. Abundancia peptídica total para una muestra de 82 pacientes (42 tratados con comprimidos activos y 40 con placebo) = 6379678890; Media de abundancia peptídica total por paciente = 77800962.

55 **Figura 9:** Curvas ROC de los niveles de abundancia de OG3 de 42 pacientes tratados (AUC: área bajo la curva ROC), umbral para generar grupos: (A) Porcentaje de mejora de la ARTSS = 50 %, (B) Porcentaje de mejora de la ARTSS = 10 %. OG3 consiste en la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270). En estas curvas ROC, los controles se

60 definen como pacientes respondedores (es decir, pacientes con un porcentaje de mejora de la ARTSS superior o igual al porcentaje de umbrales de mejora de la ARTSS definidos anteriormente).

Figura 10: Exclusión de pacientes en función de la abundancia de OG3 y su impacto en la eficacia clínica. Los subgrupos del "50 % de alta abundancia de OG3" representan pacientes de los grupos activo y de placebo para los que las abundancias peptídicas antes del tratamiento son superiores al valor medio de la abundancia de OG3 calculada para todos los pacientes (es decir, de los grupos tanto activo como de placebo) Abundancia media de

65

OG3 = 36301. OG3 consiste en la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270). Los porcentajes de mejora de la ARTSS se muestran como media $\pm$ SEM en grupos activo y de placebo. Las variaciones medias entre activo y placebo se prueban con una prueba estadística de Mann-Whitney.

Figura 11: La Fetuína-A sialilada, pero no la Fetuína-A desialilada, se sinergiza con LPS para comprometer la vía TLR4.

a) Valores de densidad óptica (DO a 655 nm) después de 18 horas de estimulación de células que informan hTLR4 HEK-293 incubadas con dosis crecientes de LPS, Fetuína-A sialilada o una combinación de ambos. * y # indican una diferencia estadísticamente significativa frente a las células hTLR4 HEK-293 estimuladas con Fetuína-A sialilada o estimuladas con LPS respectivamente, utilizando una prueba ANOVA bidireccional con corrección de Tukey. **b)** La expresión de marcadores coestimuladores CD80, CD83 y CD86 se evaluó en la superficie de MoDC mediante citometría de flujo. **c)** La producción de DC estimuladas se midió usando un ensayo Luminex. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM (n = 4) en las figuras 4b y 4c. **d)** Las células que informan hTLR4 HEK-293 se estimularon con LPS (100 ng/ml), Fetuína-A sialilada (10 μ g/ml), Fetuína-A desialilada (10 μ g/ml), o combinaciones de estas moléculas. Los valores de DO se midieron a 655 nm después de 18 horas de incubación. **e)** La expresión de la superficie celular de las moléculas coestimuladoras se evaluó mediante citometría de flujo en MoDC estimuladas y **f)** la producción de citocinas se midió usando un ensayo Luminex. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM (n = 6) en las figuras 4e y 4f. Un valor p $\leq$ 0,05 se considera significativo (prueba de Friedman).

Figura 12: La Fetuína-A sialilada, pero no la Fetuína-A desialilada, mejora las características proinflamatorias específicas de DC2.

a) Las DC2 cultivadas durante 24 horas en medio sin suero en presencia de Fetuína A sialilada o Fetuína A desialilada se analizaron para determinar la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD80, CD83 y CD86) mediante citometría de flujo. **b)** La producción de citocinas se midió usando un ensayo Luminex. **c)** La expresión de genes relacionados con DC1, DC2 o DCreg se midió por PCR en tiempo real. Los datos se muestran como media $\pm$ SEM (n = 4) en las figuras 5a a c. **d)** Se midió la producción de citocinas por DC2 cultivadas en presencia de Fetuína A sialilada o Fetuína A desialilada (ambas a 10 μ g/ml) y un extracto de polen de 5 gramíneas (20 μ g/ml) utilizando un ensayo Luminex. Los resultados se presentan para n = 6 (de 12 donantes evaluados) como media $\pm$ SEM. **e)** La cuantificación de IL-6 e IL-10 producidas por DC en presencia de Fetuína-A sialilada o Fetuína-A desialilada (ambas a 10 μ g/ml) y un extracto de *D. far.* (1 μ g/ml) se realizó utilizando un ensayo Luminex (medio $\pm$ SEM en n = 6 donantes).

Figura 13: Curvas ROC de los niveles de abundancia de OG3 de 42 pacientes tratados (AUC: área bajo la curva ROC) en la que los controles se definen como pacientes no respondedores (es decir, pacientes con un porcentaje de mejora en la ARTSS inferior a un umbral). Umbral utilizado para generar grupos: **(A)** Porcentaje de mejora de la ARTSS = 50 %, **(B)** Porcentaje de mejora de la ARTSS = 43,9 %, **(C)** Porcentaje de mejora de la ARTSS = 10 %. OG3 consiste en la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos

Muestras clínicas de un estudio de cámara de polen VO56.07A

[0104] Ochenta y nueve pacientes alérgicos se asignaron al azar 1:1 para recibir un comprimido de polen de gramíneas o de placebo a través de la vía sublingual. Las exposiciones se realizaron antes del tratamiento y después de 1 semana y 1, 2 y 4 meses de tratamiento. Debido a que los pacientes se expusieron antes del tratamiento, las respuestas clínicas individuales se evaluaron calculando los porcentajes de mejora en las puntuaciones totales promedio de los síntomas de rinoconjuntivitis (ARTSS) entre el inicio y después de 4 meses de tratamiento. El porcentaje medio de mejora de la ARTSS en el grupo activo (correspondiente al menos a una disminución del 43,9 % de ARTSS después del tratamiento) se consideró un umbral para identificar a los respondedores clínicos. Los sujetos con un porcentaje de mejora de la ARTSS superior o igual a este umbral se consideraron respondedores, y aquellos con una mejora inferior al umbral se consideraron no respondedores. Se recogió sangre completa en 82 pacientes antes y después del tratamiento para mediciones inmunológicas, ensayos celulares o experimentos de proteómica comparativa: 4 subgrupos de pacientes, incluyendo respondedores activos (AR; n = 21), no respondedores activos (ANR; n = 21), respondedores a placebo (PR; n = 7), y no respondedores a placebo (PNR; n = 33).

Agotamiento de la afinidad de proteínas de alta abundancia para análisis proteómicos

[0105] Se procesaron muestras de suero (340 µl cada una) usando un sistema de eliminación de afinidad múltiple humana (MARS) Human 6 (columna Hu-6HC, 10 x 100 mm, Agilent Technologies, Les-Usis, Francia), que eliminó selectiva y específicamente la albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina y haptoglobina. Se usó HPLC Ultimate 3000 (Thermo scientific, Villebon-sur-Yvette-Courtaboeuf, Francia) que consiste en una bomba binaria, un autómuestreador con termostato con opción de volumen de inyección extendido, un compartimento de columna con termostato, un detector de matriz de diodos, y un colector de fracciones a escala analítica con termostato, para la cromatografía por afinidad. Las proteínas de flujo continuo se recogieron y se concentraron según las instrucciones del fabricante (columna Hu-6HC, Agilent Technologies). Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta que se confirmó el análisis y la reproducibilidad de agotamiento en ejecución con los datos cromatográficos y el análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras (gel NuPAGE al 4-12 %, Life Technologies, Saint-Aubin, Francia).

Diseño experimental DiGE bidimensional

[0106] Las muestras de suero se precipitaron con un kit de limpieza 2D según el protocolo de GE Healthcare (Velizy-Villacoublay, Francia), solubilizadas en un tampón que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4 % y Tris 30 mM, pH 8,8 (todos obtenidos en Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, Francia) y se almacenaron a -80 °C. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) y las proteínas séricas agotadas (50 µg) se marcaron mínimamente con 400 pmol de DiGE fluors Cy2 (patrón interno), Cy3 o Cy5 (GE Healthcare) como se describe en el manual de instrucciones. Las muestras consistieron en suero agotado de AR (n = 21), ANR (n = 21), PR (n = 7) y PNR (n = 33). Se usó un esquema de intercambio de tinte para evitar cualquier artefacto de etiquetado de tinte específico. El patrón interno Cy2 se obtuvo agrupando cantidades iguales de proteínas (25 µg) de los sueros de 82 pacientes incluidos en el análisis. Se realizaron dos pruebas SDS-PAGE, conteniendo cada gel dos muestras diferentes (marcadas con Cy3 y Cy5) y una muestra de patrón interno (marcada con Cy2). A continuación, las muestras de proteínas marcadas con los tintes Cy2, Cy3 y Cy5 se mezclaron y se diluyeron con tampón de rehidratación, que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4 %, DTT 100 mM, tampón IPG al 0,5 % a pH 4-7, hasta un volumen final de 450 µl. Se aplicaron 150 µg (combinación de las tres muestras de proteínas marcadas) de proteína a tiras de gradiente de pH 4-7 inmovilizadas de 24 cm de largo (GE Healthcare) a través de la técnica de rehidratación pasiva durante 15 h. El enfoque isoelectrico de primera dimensión (IEF) se realizó utilizando una unidad de electroforesis IPGPhor 3 (GE Healthcare) enfriada a 18 °C para un total de 74 kWh. Después del IEF, las tiras se equilibraron en tampón que contenía urea para la reducción completa de proteínas, la alquilación y se colocaron encima de geles de poliácridamida al 12,5 % que contenían SDS prefabricado (GE Healthcare). La SDS-PAGE se realizó a 0,5 W por gel durante 1 h seguido de 1 W por gel durante 16 h (Ettan DALT Twelve Electrophoresis System, GE Healthcare). Los geles DiGE se escanearon usando un Ettan DiGE Imager (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. Basándose en el gel de control de calidad, el gel número 79 se excluyó del análisis (es decir, muestra de ANR). Los puntos expresados diferencialmente se determinaron mediante análisis de imagen con el programa SameSpots (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) y se seleccionaron para la selección automática de puntos (EXquest™ Spot Cutter, Bio-Rad). Los geles preparativos teñidos posteriormente con Sypro Ruby (Life Technologies) se usaron para la selección de puntos y la identificación de proteínas se realizó mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Identificación de puntos de proteína por espectrometría de masas en tándem

[0107] Los tapones de gel se digirieron con tripsina y los péptidos se separaron por cromatografía de fase inversa usando un sistema Ultimate 3000 RS-nanoLC (Thermo scientific). Los péptidos se inyectaron y se atraparon en un Acclaim®

PepMap100 (100 µm x 2 cm; C₁₈, partículas de 5 µm y tamaño de poro a 100 Å, Thermo scientific), y a continuación se realizó la separación usando una columna C₁₈ (Acclaim® PepMap RSLC 75 µm de D.I., 15 cm, partículas de 2 µm, y tamaño de poro a 100 Å, Thermo Scientific). El sistema nanoLC se acopló a un espectrómetro de masas maXis 4G ESI-Qq-TOF de alta resolución (Bruker Daltonics, Wissembourg, Francia). Los datos de NanoLC-MS/MS se analizaron utilizando un servidor interno Mascot (Matrix Science Ltd, Londres, Reino Unido) o el programa PEAKS (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canadá) para buscar bases de datos públicas tal como la base de datos Uniprot/Swiss-Prot y la base de datos no redundante del Centro Nacional de Información Biotecnológica (nrNCBI), suponiendo una digestión triptica. Se buscaron la masa del precursor y la masa del fragmento con una tolerancia de masa inicial de 8 ppm y 0,05 Da, respectivamente. La búsqueda incluyó la modificación fija de carbamidometil (CAM) cisteína. La longitud peptídica mínima se estableció en 6 aminoácidos y se permitió un máximo de falta de escisión. Las identificaciones de péptidos se aceptaron si pudieron establecerse con una probabilidad superior al 95 % según lo especificado por Mascot o el software PEAKS.

Cuantificación por espectrometría de masas sin etiqueta

[0108] Se mezclaron 50 µg de proteínas séricas con un tampón que contenía urea, se redujeron con DTT 20 mM, se alquilaron con yodoacetamida 50 mM y se digirieron con tripsina (37 °C, durante una noche, relación enzima/sustrato de 1/25). Después de la digestión, los péptidos se acidificaron con FA al 2,5 % y se analizaron por LC-MS o LC-MS/MS usando el sistema Ultimate 3000 RSLC acoplado a un espectrómetro de masas maXis 4G ESI-

Qq-TOF. Se inyectaron 5 µg de péptidos tripticos en una columna Acquity C₁₈ BEH130 (10 mm de D.I., 10 cm, partículas de 1,7 µm, Waters) equilibrada a 40 °C con disolvente A al 95 % (FA al 0,15 %); disolvente B al 5 % (ACN al 100 %-ácido fórmico al 0,15 %) a un caudal de 0,4 ml/min. La separación se realizó a un caudal de 0,4 ml/min con un gradiente lineal de disolvente B del 5 al 40 % durante 30 min. Las intensidades iónicas registradas en los datos de LC-MS se analizaron utilizando el software Progenesis LC-MS v4.1 (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, Reino Unido) para proporcionar mediciones fiables de la abundancia peptídica en las muestras. Se realizó la calibración de la masa de bloqueo y la detección peptídica se realizó con una intensidad peptídica >1000, una abundancia peptídica >2000 y 2+ ≤carga peptídica ≤12+. A continuación, los datos se normalizaron mediante el procedimiento "normalizar con respecto a todas las características" y se realizó una comparación entre los cuatro grupos (obtenidos de AR, ANR, PR y PNR) para elegir qué péptidos se representaron estadísticamente de forma diferencial. Los datos de LC-MS/MS se analizaron utilizando un servidor Mascot interno frente a la base de datos Swiss-Prot, taxonomía Homo sapiens, suponiendo una digestión triptica o semi-triptica como se ha descrito anteriormente, y posteriormente se importaron al software.

15 Desialilación enzimática y caracterización de Fetuína-A humana

[0109] Se mezclaron 31,15 µg de Fetuína A purificada nativa con 10 µl de tampón de reacción 5X (kit EDEGLY, Sigma). Se añadió 1 µl de α-(2 → 3,6,8,9)-Neuraminidasa (kit EDEGLY, Sigma), para alcanzar una actividad enzimática final de 0,109 U/ml, y la mezcla se incubó durante una noche a 37 °C. La eficacia de la desialilación se evaluó mediante SDS-PAGE y caracterización de MS.

Análisis de espectrometría de masas de Fetuína A purificada

[0110] Las mediciones de la masa promedio (*M_{prom}*) de proteínas intactas se realizaron en un espectrómetro de masas maXis ESI-Qq-TOF acoplado a un sistema Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific). Las proteínas se desnaturalizaron y se redujeron en un tampón que contenía urea 8 M, Tris 75 mM, pH 8,5, DTT 20 mM durante 20 minutos y se acidificaron con ácido fórmico (FA) al 2,5 %. A continuación, las muestras de proteínas se desalaron y se concentraron durante 4 min en una columna Acquity C₄ BEH300 (10 mm de D.I., 10 cm, partículas de 1,7 µm, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, Francia) equilibrada a 70 °C con disolvente A al 95 % (FA al 0,15 %); disolvente B al 5 % (ACN al 100 %-ácido fórmico al 0,15 %) a un caudal de 0,4 ml/min. Las proteínas se eluyeron directamente en el espectrómetro de masas a un caudal de 0,4 ml/min con un gradiente lineal de disolvente B del 5 al 60 % durante 30 min. Los espectros de masas se desconvolucionaron usando MaxEnt, y la *M_{prom}* precisa de proteínas se determinó con análisis de datos (Bruker Daltonic).

[0111] La presencia de modificaciones postraduccionales (PTM) en proteínas purificadas se determinó por nanoLC-MS/MS como se ha descrito anteriormente. Se solubilizaron las proteínas Fetuína A purificada o Fetuína A desialilada en un tampón que contenía urea 8 M, Tris 75 mM, pH 8,5 y TCEP 5 mM. A continuación, las proteínas se alquilaron con yodoacetamida (10 mM) durante 20 min y someterse a una solución de digestión con tripsina (relación en masa de 50/1 de proteína/proteasa) durante 3 h a 37 °C en presencia del 0,018 % de tensioactivo ProteaseMax (Promega, Charbonnières, Francia). Se añadió FA al 2,5 % a la mezcla para inactivar la actividad enzimática, y los péptidos se almacenaron a -80 °C hasta el día del análisis. A continuación, las muestras de péptidos se centrifugaron a 18000 g, y la mezcla de péptidos se separó usando una columna C₁₈ (Acclaim® PepMap RSLC 75 µm de D.I., 25 cm, partículas de 2 µm y tamaño de poro a 100 Å, Thermo Scientific). Los N y O-glucopéptidos se identificaron manualmente por la presencia de fragmentos de iones de oxonio específicos de glucano.

Propiedades inmunomoduladoras de Fetuína-A sialilada y Fetuína-A desialilada

[0112] Los monocitos aislados de PBMC de voluntarios sanos con microperlas CD14 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) se cultivaron en presencia de GM-CSF e IL-4 (Miltenyi Biotec) durante 6 días. La diferenciación de DC se confirmó por citometría de flujo basada en la pérdida de expresión de CD14 y la regulación positiva de la expresión superficial de CD1a y CD11c. Las DC inmaduras derivadas de monocitos (MoDC) o MoDC polarizadas hacia un patrón DC2 se cultivaron en medio sin suero (medio CellGro DC, Cellgenix, Friburgo, Alemania) durante 24 horas, en presencia de cualquier medio en solitario, o medio complementado con LPS-EB ultra-puro de *Escherichia coli* (100 ng/ml, Invivogen, Toulouse, Francia), Fetuína-A sialilada purificada nativa (10 µg/ml), Fetuína-A desialilada (10 µg/ml), un polen de 5 gramíneas (de *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* y *Anthoxanthum odoratum*) o extractos de alérgenos de *Dermatophagoides farinae* (20 o 1 µg/ml, respectivamente, Stallergenes SA, Antony, Francia), o combinaciones de estos reactivos. En algunos experimentos, la ruta TLR4 se bloqueó añadiendo LPS de *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS, 10 µg/ml, Invivogen) a MoDC durante 30 minutos. Los sobrenadantes se cosecharon para medir la producción de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF-α) utilizando un ensayo Luminex (Milliplex, Millipore). La expresión superficial de los marcadores de maduración (CD80, CD83 y CD86) se evaluó en DC mediante citometría de flujo (BD Biosciences, San Jose, EE.UU.). Se aisló ARN total (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Venlo, Países Bajos) para evaluar la expresión de los genes C1QA, MX1 y PADI2 mediante PCR en tiempo real usando β-actina como gen de referencia endógeno (se usaron los siguientes cebadores, todos de Thermo científicos, se utilizaron: Hs00381122_m1, Hs00895608_m1 y Hs00247108_m1, respectivamente).

Análisis estadístico

[0113] Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante el uso de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de 2 colas o mediante la prueba t paramétrica de 2 colas y la prueba de Friedman para comparaciones múltiples. Los análisis de correlación se realizaron utilizando la prueba no paramétrica de Spearman o la prueba paramétrica de Pearson. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con el software GraphPrism 5 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, California). Se evaluaron las diferencias significativas en los cambios en la expresión de proteínas en el análisis DiGE y en la abundancia peptídica en los experimentos de MS sin etiqueta mediante el uso de un umbral de valor p anova de 0,01. También se usó un filtro de cambio múltiplo ($\geq 1,5$). Las estadísticas sobre datos proteómicos se realizaron con dos programas de Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, Reino Unido) llamados SameSpots o Progenesis LC-MS.

Ejemplo 2: Resultados

La sialilación de la Fetuína A sérica discrimina a los respondedores clínicos

[0114] El estudio clínico descrito en el Ejemplo 1 se usó para comparar los perfiles de proteoma en suero y predecir respondedores clínicos de los no respondedores con respecto al tratamiento con AIT. Muestras de suero, de 4 subgrupos de pacientes, incluyendo respondedores activos (AR; n = 21), no respondedores activos (ANR; n = 20), respondedores a placebo (PR; n = 7), y no respondedores a placebo (PNR; n = 33) se compararon retrospectivamente usando 2D-DiGE. Después del agotamiento de la afinidad inmune de las 6 proteínas de alta abundancia para mejorar la detección de proteínas de menor abundancia, se cortaron puntos de proteínas cuyo volumen era significativamente diferente entre los subgrupos de geles 2D, se digirió la tripsina y se analizó por espectrometría de masas (MS). Se observaron diferencias en los niveles de expresión de los puntos de proteína Fetuína A (también llamada glucoproteína alfa-2-HS, AHSG) entre pacientes AR y ANR (figura 2). La abundancia de cuatro proteoformas de la cadena A (sp419, 428, 439 y 448) aumentó en individuos AR (p < 0,01 o 0,001, figura 2A) mientras que la de sp469 disminuyó (p < 0,05). Cuando se representó frente a porcentajes de la mejora en la puntuación de síntomas para cada paciente individual, la abundancia de los puntos más ácidos, es decir, la suma de sp419, 428 y 439, se correlacionó significativamente con el beneficio clínico en pacientes del grupo activo (con una correlación de Spearman de r = 0,5, p = 0,0009, figura 2B), mientras que no se observaron diferencias en los niveles de expresión y no se observó dicha correlación en los pacientes tratados con placebo (figura 2C-D). Colectivamente, estas observaciones indican que el tren de puntos de Fetuína A podría cambiar hacia valores de pH ácido, lo que sugiere cambios en la modificación postraduccional (PTM) en pacientes AR.

[0115] Los inventores purificaron posteriormente la Fetuína A de suero humano sano mediante cromatografía por afinidad para obtener más información sobre el tipo de PTM asociadas. La cadena A se resolvió en SDS-PAGE como una banda única a ~40 kDa y las mediciones de masa intacta mediante el uso de MS revelaron la contribución de una gran cantidad de ácido siálico (Neu5Ac) ramificado en restos de glucano (figura 3 y figura 6A). Sorprendentemente, Neu5Ac es aniónico y, por lo tanto, probablemente contribuye a la carga de Fetuína A y a la migración hacia un pH ácido durante 2D-DiGE, como se observa en los donantes AR. El análisis de MS también reveló que una porción de la cadena B está sialilada con uno o dos Neu5Ac (figura 6B-D). Por último, el tratamiento de Fetuína A purificada con sialidasa, atestiguada por análisis de MS de asialofetuína A (figura 7), cambió notablemente el perfil de gel 2D y permitió la desaparición completa del tren de carga puntual.

[0116] En conjunto, el cambio del tren de puntos de Fetuína A hacia el pH ácido depende de los niveles de sialilación, lo que sugiere que cuanto más responda el paciente a la AIT, mayor será la sialilación de la Fetuína A antes de la AIT.

Los niveles de sialilación de Fetuína A dependen de cadenas de oligosacáridos unidos a O

[0117] Como glucoproteína, la Fetuína A lleva cadenas de oligosacáridos unidos a N y O que terminan con residuos de ácido siálico (Swiss-Prot AC P02765) y los inventores observaron que la respuesta positiva a la AIT está asociada con el aumento de las glucoformas sialiladas antes del tratamiento. Por lo tanto, los inventores examinaron exhaustivamente sus estructuras de glucano utilizando MS para proporcionar una comparabilidad cuantitativa fiable de estas glucoformas en muestras clínicas. Los glucopéptidos, derivados de la Fetuína A purificada por digestión con tripsina, se asignaron basándose en una combinación de los datos de MS/MS y la medición precisa de la masa de iones precursores. Particularmente únicos para los glucopéptidos que contienen glucanos sialilados son los iones de tipo B correspondientes a la masa neutra 291 Da (Neu5Ac) y la masa neutra 273 Da (Neu5Ac-H₂O). Los picos de masa también incluyen los observados como 203 Da, 365 Da, 656 Da y 947 Da que corresponden a las masas neutras de HexNAc, (Hex + HexNAc), (Hex + HexNAc + Neu5Ac) y (Hex + HexNAc + Neu5Ac₂). En este trabajo, se evidenciaron dos sitios de unión de N-glucano para los residuos N₁₅₆ y N₁₇₆ y el N-glucano más abundante encontrado se desialiló (Hex5HexNAc4Neu5Ac₂, Tabla 2). Además de los N-glucanos, estaba presente una serie de O-glucopéptidos, en su mayoría unidos con glucanos sialilados. El O-glucopéptido de la cadena A contenía dos glucanos de tipo mucina para los residuos T₂₅₆ y T₂₇₀ y todos los cuales estaban sialilados, con uno o dos Neu5Ac (denominados

OG1, OG2 y OG3 dependiendo del número de Neu5Ac, [figura 4](#) y [Tabla 2](#)). La cadena B se observó tanto en forma no sialilada, monosialilada como disialilada (residuo S₃₄₆, [figura 6B-D](#)).

- [0118]** Además, considerando la glucosilación de sitio específico de la Fetuína A, ahora es posible realizar el análisis de muestras clínicas para comprender el potencial diagnóstico de la Fetuína A sialilada. Se desarrolló un análisis por MS sin etiqueta para la comparación directa de señales de MS correspondiente a los péptidos y glucopéptidos de Fetuína A ([Tabla 2](#)). Con este procedimiento, los inventores realizaron el análisis de muestras clínicas y observaron que los O-glucopéptidos que contenían el tipo de núcleo 1 con dos Neu5Ac fueron los que aumentaron más significativamente en individuos AR (OG2, $p < 0.01$ y OG3, $p < 0.001$, [figura 5A](#) y cadena B disialilada $p < 0.01$, [Tabla 2](#)). Sorprendentemente, como se ha observado previamente para la abundancia de los puntos más ácidos de Fetuína A, el glucopéptido tetrasialilado OG3 se correlacionó significativamente con la mejora de los síntomas clínicos en pacientes del grupo activo (con la correlación de Spearman de $r = 0.5$, $p = 0.0002$, [figura 5B](#) y [figura 8](#)), mientras que no se observó dicha correlación en pacientes tratados con placebo ([figura 5C-D](#)).
- [0119]** En resumen, los niveles de sialilación de Fetuína A discriminan a los respondedores clínicos de los que no responden al tratamiento con la vacuna contra la alergia al polen de gramíneas y dependen, al menos en parte, del número de Neu5Ac unidos a las cadenas de oligosacáridos unidas a O. Por lo tanto, la sialilación de Fetuína A puede desempeñar un papel importante en su heterogeneidad funcional.
- [0120]** Los inventores mostraron que las variantes peptídicas denominadas en esta invención OG1, OG2 y OG3 estaban presentes en un nivel significativamente más alto en el suero de pacientes que respondieron bien a la inmunoterapia sublingual. Más importante aún, aunque los tres péptidos mostraron un nivel significativo de correlación, la variante peptídica OG3 presentó una mejor correlación estadística con la respuesta al tratamiento. De manera similar, OG3 presentó una correlación más significativa que Fetuína-A global (OG1 + OG2 + OG3).
- [0121]** El péptido OG3 consiste en la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.
- [0122]** El péptido OG2 consiste en la SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva un residuo de ácido siálico terminal en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270.

Tabla 2: Resumen de los principales péptidos tripticos de Fetuina A identificados por nanoESI-Qq-TOF MS/MS. Medido (Med.). Estado de carga peptídica (z). Carbamidometil Cys (CAM). Fosforilación (Phospho). Hexosa (Hex). N-acetilhexosamina (HexNAc). Ácido siálico (NeuAc). Intervalo, numeración según la secuencia de pro-proteína.

Acceso	Cadena	SEQ ID NO:	m/z med.	z	Δ m/z [PPm]	Secuencia	Modificaciones	Glucosilación tipo	Ácidos iálico	Intervalo	MS sin etiqueta	MS sin etiqueta (valor p Anova)
FETUA_HUMAN	A	5	1107,041	4	4,00	APHGGLYRQPNCCDDPET EEAALVAIDYINQNLPWGKYK H	CAM: 14			20-57		
FETUA_HUMAN	A	6	1065,0150	4	0,79	PHGPGLYRQPNCCDDPETE EAALVAIDYINQNLPWGKYKH	CAM: 12			21 -57		
FETUA_HUMAN	A	7	1121,8587	3	4,17	RQPNCCDDPETEEAALVAIDY INQNLPWGKYKH	CAM: 4			29-57		
FETUA_HUMAN	A	8	1136,0470	4	2,09	RQPNCCDDPETEEAALVAIDY INQNLPWGKYKHTLNQIDEVK V	CAM: 4			29-67		
FETUA_HUMAN	A	9	1317,6619	2	2,97	DPETEEAALVAIDYINQNLP WGYKH				35-57		
FETUA_HUMAN	A	10	971,8927	5	2,02	KHTLNQIDEVKWVPPQQPSG ELFEIDTLETTCHVLDPTP VARC	CAM: 32			58-99		
FETUA_HUMAN	A	11	1098,3058	4	2,35	NQIDEVKWVPPQQSGELFEI EIDTLETTCHVLDPTPVARC	CAM: 28			62-99		
FETUA_HUMAN	A	12	508,2569	4	3,86	RQLKEHAVEGDCDFQLLKL	CAM: 11			104-120	X	ns
FETUA_HUMAN	A	13	554,2603	3	1,70	KEHAVEGDCDFQLLKL	CAM: 8			107-120	X	ns
FETUA_HUMAN	A	14	519,2541	4	1,81	KEHAVEGDCDFQLLKL F	CAM: 8					
FETUA_HUMAN	A	15	407,2298	2	1,59	KFSVVYAKC				125-131	X	ns
FETUA_HUMAN	A	16	1326,2169	3	4,29	KVCQDCPLLAFLNPLTRV	CAM: 2, 5; Hex (5)HexNAc(4) NeuAc(2): 14	Glucano unido a N	2	145-159	X	ns
FETUA_HUMAN	A	16	1544,9553	3	1,03	KVCQDCPLLAFLNPLTRV	CAM: 2, 5; Hex (6)HexNAc(5) NeuAc(3): 14	Glucano unido a N	3	145-159	X	ns

(continuación)

Acceso	Cadena	SEQ ID NO:	m/z med.	z	Δ m/z [PPm]	Secuencia	Modificaciones	Glucosilación tipo	Ácido iónico	Intervalo	MS sin etiqueta	MS sin etiqueta (valor p Anova)
FETUA_HUMAN	A	17	1183,0825	2	2,00	KAALAAAFNAQNNGSNFQLE EISRA				166-		
FETUA_HUMAN	A	17	1523,9822	3		KAALAAAFNAQNNGSNFQLE EISRA	Hex(5)HexNAc (4) NeuAc(2);11	Glucano unido a N	2	166-187	X	ns
FETUA_HUMAN	A	17	1143,2366	4	0,30	KAALAAAFNAQNNGSNFQLE EISRA	Hex(5)HexNAc (4) NeuAc(2);11	Glucano unido a N	2	166-187	X	ns
FETUA_HUMAN	A	17	1742,7277	3		KAALAAAFNAQNNGSNFQLE EISRA	Hex(6)HexNAc (5) NeuAc(3);11	Glucano unido a N	3	166-187		
FETUA_HUMAN	A	18	1290,1579	2	0,94	RAQLVPLPPSTYVEFTVSGT DCVAKE	CAM: 21			188-211	X	ns
FETUA_HUMAN	A	19	1093,8886	3	1,83	RAQLVPLPPSTYVEFTVSGT DCVAKEATEAAKC	CAM: 21			188-218		
FETUA_HUMAN	A	20	424,2214	2	0,94	KCNLLAEKQ	CAM: 1			219-225	X	ns
FETUA_HUMAN	A	21	401,6823	2	1,99	KQYGFCKA	CAM: 5			226-231	X	p<0,05
FETUA_HUMAN	A	2	1741,847	5	2,91	LGGAEVAVTCTVFQTPVT SQPQEGANEAVTPWDP DAPPSPPLGAPGLPPAGSP PDSHVLLAAPPQHQLHR	CAM: 10; Hex (1)HexNAc(1) NeuAc(1): 19, 33	Glucano unido a O	2	238-311	X	ns
FETUA_HUMAN	A	2	1800,0704	5	4,71	LGGAEVAVTCTVFQTPVT SQPQEGANEAVTPWDP DAPPSPPLGAPGLPPAGSP PDSHVLLAAPPQHQLHR	CAM: 10; Hex (1)HexNAc(1) NeuAc(1): 19, 33 HexNAc(1) NeuAc(2): 19, 33	Glucano unido a O	3	238-311	X	p<0,01

(continuación)

Acceso	Cadena	SEQ ID NO:	m/z med.	z	Δ m/z [PPm]	Secuencia	Modificaciones	Glucosilación tipo	Ácidos iálico	Intervalo	MS sin etiqueta	MS sin etiqueta (valor p Anova)
FETUA_HUMAN	A	2	1858,2795	5	-1,30	LGAEVAVTCTVFQTPVTS QPQPEGANEAVTPVWDPDA PPSPPLGAPGLPPAGSPDS HVLLAAPPQHQLHR	CAM: 10; Hex (1)HexNAc(1) NeuAc(2): 19, unido a O 33	Glucano	4	238 - 311	X	p<0,001
FETUA_HUMAN	A	22	724,3871	5	2,43	DPDAPPSPPLGAPGLPPAGS PPDSHVLLAAPPQHQLHRA				275 -		
FETUA_HUMAN	A	23	387,6989	2	0,09	RAHYDLRH				312 - 317	X	ns
FETUA_HUMAN	A	24	568,0879	5	5,50	RAHYDLRHFTFMGWVSLGSPS GEVSHPRK				312 - 337		
FETUA_HUMAN	A	25	642,3136	3	2,16	RHTFMGWVSLGSPSGEVSHPR				318 - 336		
FETUA_HUMAN	A	26	694,3468	3	1,16	RHTFMGWVSLGSPSGEVSHPRK				318 - 337	X	ns
FETUA_HUMAN	A	26	541,0047	4	3,36	RHTFMGWVSLGSPSGEVSHPRK	Phospho: 13			318 - 337	X	ns
FETUA_HUMAN	A	26	721,0030	3	2,16	RHTFMGWVSLGSPSGEVSHPRK	Phospho: 13			318 - 337	X	ns
FETUA_HUMAN	A	27	553,0377	4	5,00	RHTFMGWVSLGSPSGEVSHPRKT				318 - 338		
FETUA_HUMAN	B	28	1008,5432	2	4,76	RTVWQPSVGAAAGPWPPCP GRI	CAM: 18			341 - 361	X	ns
FETUA_HUMAN	B	28	1336,6567	2	3,40	RTVWQPSVGAAAGPWPPCP GRI	CAM: 18; Hex (1)HexNAc(1)N euAc(1): 1	Glucano unido a O	1	341 - 361	X	ns
FETUA_HUMAN	B	28	891,4380	3	0,90	RTVWQPSVGAAAGPWPPCP GRI	CAM: 18; Hex (1)HexNAc(1)N euAc(1): 1	Glucano unido a O	1	341 - 361	X	ns
FETUA_HUMAN	B	28	988,4692	3	0,14	RTVWQPSVGAAAGPWPPCP GRI	CAM: 18; Hex (1)HexNAc(1) NeuAc(2): 1	Glucano unido a O	2	341 - 361	X	p<0,01

(continuación)

Acceso	Cadena	SEQ ID NO:	m/z med.	z	Δ m/z [PPm]	Secuencia	Modificaciones	Glucosilación tipo	Ácidos iálico	Intervalo	MS sin etiqueta	MS sin etiqueta (valor p Anova)
FETUA_HUMAN	B	29	958,0155	2	0,94	TVQPSVGAAAGPVVPPCPGRI	CAM: 17			342 – 361		
FETUA_HUMAN	B	30	908,4811	2	0,81	WQPSVGAAAGPVVPPCPGRI	CAM: 16			343 – 361		

[0123] La pertinencia del polipéptido OG3 se evaluó adicionalmente mediante un análisis de la característica operativa del receptor (ROC). La figura 9A muestra la curva ROC de los niveles de OG3 de 42 pacientes activos divididos en 2 subgrupos basándose en un porcentaje de mejora en la ARTSS del 50 %. El AUC fue de 0,7015 (con un valor p de 0,03509). La figura 9B muestra la curva ROC de los niveles de OG3 de 42 pacientes activos divididos en 2 subgrupos basándose en un porcentaje de mejora en la ARTSS del 10 %. El AUC fue de 0,7978 (con un valor p de 0,0095). En estas curvas ROC, los controles se definen como pacientes respondedores (es decir, pacientes con un porcentaje de mejora de la ARTSS superior o igual al porcentaje de umbrales de mejora de la ARTSS definidos anteriormente).

- 10 **[0124]** Además, la curva ROC de los niveles de OG3 de 42 pacientes activos divididos en 2 subgrupos basados en un porcentaje de mejora en la ARTSS del 50 % y en los que los controles se definen como pacientes no respondedores (es decir, pacientes con un porcentaje de mejora en la ARTSS inferior al 50 %) se muestra en la figura 13.A. El AUC fue de 0,7015 (con un valor p de 0,03509). La curva ROC de los niveles de OG3 de 42 pacientes activos divididos en 2 subgrupos basados en un porcentaje de mejora en la ARTSS del 43,9% y en los que los controles se definen como pacientes no respondedores (es decir, pacientes con un porcentaje de mejora en la ARTSS inferior al 43,9 %) se muestra en la figura 13.B. El AUC fue de 0,8050 (con un valor p de 0,0007). La curva ROC de los niveles de OG3 de 42 pacientes activos divididos en 2 subgrupos basados en un porcentaje de mejora en la ARTSS del 10% y en los que los controles se definen como pacientes no respondedores (es decir, pacientes con un porcentaje de mejora en la ARTSS inferior al 10%) se muestra en la figura 13.C. El AUC fue de 0,7978 (con un valor p de 0,0095).

20 **[0125]** Estas últimas curvas ROC en las que los controles se definen como pacientes no respondedores se asociaron con los siguientes datos sobre sensibilidad y especificidad.

Tabla 3 - Umbral al 10 % de mejora en la ARTSS

Corte OG3	% de sensibilidad	% de especificidad		Corte OG3	% de sensibilidad	% de especificidad
>8619	100	12,5		>37862	52,94	75
>9377	100	25		>39205	50	75
>10984	100	37,5		>41113	50	87,5
>14446	100	50		>43103	47,06	87,5
>20117	97,06	50		>43967	44,12	87,5
>23537	97,06	62,5		>45310	41,18	87,5
>23893	94,12	62,5		>46825	38,24	87,5
>24170	91,18	62,5		>48242	35,29	87,5
>24893	88,24	62,5		>49345	35,29	100
>26369	85,29	62,5		>50051	32,35	100
>27576	82,35	62,5		>50788	29,41	100
>28037	79,41	62,5		>51984	26,47	100
>28520	76,47	62,5		>57652	23,53	100
>28950	73,53	62,5		>62528	20,59	100
>29308	70,59	62,5		>62952	17,65	100
>30786	67,65	62,5		>64570	14,71	100
>32026	64,71	62,5		>67985	11,76	100
>32918	61,76	62,5		>71033	8.824	100
>33777	58,82	62,5		>73660	5.882	100
>34916	55,88	62,5		>83772	2.941	100
>36447	55,88	75				

ES 2 813 412 T3

Tabla 4 - Umbral al 43,9% de mejora en la ARTSS

Corte OG3	% de sensibilidad	% de especificidad		Corte OG3	% de sensibilidad	% de especificidad
>8619	100	4.762		>36447	76,19	76,19
>9377	100	9.524		>37862	71,43	76,19
>10984	100	14,29		>39205	71,43	80,95
>14446	100	19,05		>41113	71,43	85,71
>20117	95,24	19,05		>43103	66,67	85,71
>23537	95,24	23,81		>43967	61,9	85,71
>23893	95,24	28,57		>45310	57,14	85,71
>24170	95,24	33,33		>46825	52,38	85,71
>24893	95,24	38,1		>48242	47,62	85,71
>26369	95,24	42,86		>49345	47,62	90,48
>27576	90,48	42,86		>50051	42,86	90,48
>28037	90,48	47,62		>50788	38,1	90,48
>28520	90,48	52,38		>51984	33,33	90,48
>28950	90,48	57,14		>57652	28,57	90,48
>29308	85,71	57,14		>62528	23,81	90,48
>30786	80,95	57,14		>62952	19,05	90,48
>32026	80,95	61,9		>64570	19,05	95,24
>32918	80,95	66,67		>67985	19,05	100
>33777	76,19	66,67		>71033	14,29	100
>34916	76,19	71,43		>73660	9.524	100
				>83772	4.762	100

Tabla 5 - Umbral al 50% de mejora en la ARTSS

Corte	% de sensibilidad	% de especificidad		Corte	% de sensibilidad	% de especificidad
>8619	100	3.571		>36447	78,57	64,29
>9377	100	7.143		>37862	71,43	64,29
>10984	100	10,71		>39205	71,43	67,86
>14446	100	14,29		>41113	71,43	71,43
>20117	92,86	14,29		>43103	64,29	71,43
>23537	92,86	17,86		>43967	64,29	75
>23893	92,86	21,43		>45310	57,14	75
>24170	92,86	25		>46825	50	75
>24893	92,86	28,57		>48242	42,86	75
>26369	92,86	32,14		>49345	42,86	78,57
>27576	92,86	35,71		>50051	35,71	78,57
>28037	92,86	39,29		>50788	28,57	78,57
>28520	92,86	42,86		>51984	21,43	78,57

(continuación)

Corte	% de sensibilidad	% de especificidad		Corte	% de sensibilidad	% de especificidad
>28950	92,86	46,43		>57652	21,43	82,14
>29308	85,71	46,43		>62528	21,43	85,71
>30786	78,57	46,43		>62952	14,29	85,71
>32026	78,57	50		>64570	14,29	89,29
>32918	78,57	53,57		>67985	14,29	92,86
>33777	78,57	57,14		>71033	7,143	92,86
>34916	78,57	60,71		>73660	7,143	96,43
				>83772	7,143	100

[0126] Estos resultados confirman que OG3 es útil para discriminar a los respondedores clínicos de los no
5 respondedores antes de la AIT.

[0127] Finalmente, los pacientes de cada grupo de tratamiento (es decir, activo y placebo) se dividieron en 2
subgrupos dependiendo de los niveles de OG3 encontrados en su plasma antes del tratamiento (subgrupos "50 % de
alta abundancia de OG3"). Los subgrupos del "50 % de alta abundancia de OG3" representan pacientes de los grupos
10 activo y de placebo para los que las abundancias peptídicas antes del tratamiento son superiores al valor medio de la
abundancia de OG3 calculada para todos los pacientes (es decir, de los grupos tanto activo como de placebo)
Abundancia media de OG3 = 36301. Como se muestra en la figura 10, se observó una mejora más pronunciada en
los síntomas clínicos en pacientes activos que tenían los niveles de OG3 un 50 % más altos.

15 La Fetuína-A sialilada se sinergiza con LPS en una ruta dependiente de TLR4

[0128] Las interacciones funcionales entre Fetuína-A sialilada y TLR4 se examinaron usando células HEK-293
que expresaban TLR4 humano y una fosfatasa alcalina embrionaria secretada inducible como un gen indicador. Esas
células se estimularon con LPS, Fetuína-A sialilada en varias dosis, o una mezcla de ambos. Como se muestra en la
20 figura 11, a, la Fetuína-A sialilada en solitario no tuvo ningún efecto, mientras que una combinación de Fetuína-A
sialilada y LPS actuó en sinergia para activar TLR4 de una manera dependiente de la dosis.

[0129] Dado que las células dendríticas (DC) son críticas para la preparación de linfocitos T contra los
alérgenos, y con la idea de que el LPS bacteriano es un cofactor de sensibilización importante, a continuación, se
25 examinó la capacidad de la Fetuína-A sialilada para sinergizar con LPS y/o alérgenos, para afectar a la polarización
DC. Las MoDC generadas in medio sin suero se incubaron con LPS, Fetuína-A sialilada a diversas dosis, o una
combinación de ambos. La estimulación de MoDC con una mezcla de LPS y Fetuína-A sialilada mejoró la expresión
de CD83 y CD86, y en menor medida de las moléculas coestimuladoras de CD80 (figura 11, b), mientras que el LPS
o la Fetuína-A sialilada en solitario no tuvieron ningún efecto. De manera similar, una combinación de las dos moléculas
30 aumentó la secreción de citocinas IL-6, IL-10, IL-12 p-70 y TNF- α , en comparación con LPS en solitario, mientras que
la Fetuína-A sialilada *per se* no tuvo actividad (figura 11, c). No se observó estimulación de las MoDC en presencia
de α -(2 $\rightarrow$ 3,6,8,9)-Neuraminidasa, tampón de desialilación o ácidos siálicos libres (datos no mostrados). Cabe
destacar que la sinergia observada entre el LPS y la Fetuína-A sialilada se anuló totalmente al añadir el antagonista
de TLR4 LPS-RS (figura 11, b-c), estableciendo que la Fetuína-A sialilada y el LPS se sinergizaron para activar la
35 ruta TLR4.

[0130] La Fetuína-A sialilada y Fetuína-A sialilada tratada con neuraminidasa (es decir, Fetuína-A desialilada)
se compararon posteriormente por su capacidad para sinergizar con LPS en estos ensayos celulares humanos. La
modulación sinérgica de la actividad de TLR4 por LPS se redujo sustancialmente cuando las células hTLR4 HEK-293
40 se coestimularon con Fetuína-A desialilada en oposición a la Fetuína-A sialilada (figura 11, d). Según esta
observación, no se observó ningún efecto sinérgico entre el LPS y la Fetuína-A desialilada en las MoDC, tanto en
términos de la inducción de moléculas coestimuladoras (figura 11, e) como de la secreción de citocinas (figura 11, f).
Colectivamente, estos resultados establecen la activación sinérgica de la ruta TLR4 por LPS y FetA, con evidencia de
sialilación de esta última en esta interacción funcional.

45 La Fetuína-A sialilada, pero no Fetuína-A desialilada, mejora las características pro-alérgicas de las MoDC tipo 2 (DC2)

[0131] Se sabe que el compromiso de TLR4 contribuye a la inflamación alérgica, por ejemplo, durante la

exposición concomitante a alérgenos con endotoxinas, o como consecuencia de una imitación funcional de MD2 por parte del alérgeno. Se investigó la posible contribución de las glucoformas de Fetuína-A sialilada a dicha inflamación alérgica mediada por TLR4. Las MoDC inmaduras se polarizaron hacia un fenotipo DC2 (es decir, capaz de polarizar linfocitos T CD4+ sin tratar hacia células TH2 secretoras de IL-5 e IL-13), usando una mezcla de TSLP, IL-25, IL-33 y dosis bajas (es decir, 10 ng/ml) de LPS, en presencia de 10 µg/ml de Fetuína-A sialilada o Fetuína-A desialilada, respectivamente. Un análisis de citometría de flujo reveló una regulación positiva de los marcadores coestimuladores CD83 y CD86 en presencia de Fetuína-A sialilada, pero no de Fetuína-A desialilada (**figura 12, a**). De manera similar, las DC2 diferenciadas en presencia de Fetuína-A sialilada secretaron niveles más altos de IL-6, IL-8, IL-10 y TNF-α (**figura 12, b**), en comparación con las DC2 tratadas con Fetuína-A desialilada. La última observación se confirmó aún más al monitorizar la expresión de genes específicamente asociados con una polarización de DC2, tal como PADI2, GATA3 y NMES. Dichos genes marcadores DC2 se sobreexpresaron en presencia de Fetuína-A sialilada, pero no de Fetuína-A desialilada. Por el contrario, la expresión de genes más bien asociados con DC1 o DC reguladoras, tales como MX1 o C1QA, respectivamente, se reguló negativamente en gran medida cuando las DC2 se cultivaron en presencia de Fetuína-A sialilada, pero no de Fetuína-A desialilada (**figura 12, c**). Además, después de una estimulación de DC2 con una combinación de extractos de alérgenos acuosos y Fetuína-A sialilada o Fetuína-A desialilada, la Fetuína-A sialilada se sinergizó con un extracto de polen de gramíneas para inducir la secreción de IL-6, IL-8, IL-10 y citocinas TNF-α (**figura 12, d**), mientras que no se observó tal efecto con Fetuína-A desialilada. De manera similar, las DC cultivadas con extracto de alérgenos de ácaros del polvo doméstico (HDM) secretaron mayores cantidades de IL-6, IL-10 y TNF-α en presencia de Fetuína-A sialilada, mientras que esta sinergia no se observó con Fetuína-A desialilada (**figura 12, e**). No se observó una influencia clara de Fetuína-A sialilada o Fetuína-A desialilada en la secreción de IL-8, que ya es muy alta en presencia de alérgenos de ácaros del polvo doméstico. Colectivamente, estos experimentos establecieron que la Fetuína-A sialilada puede mejorar el perfil proalérgico de las DC2 en presencia de alérgenos naturales, en relación con los niveles de sialilación de la molécula de Fetuína-A.

25 **Ejemplo 3: Muestras clínicas del estudio de ácaros del polvo doméstico**

Diseño del estudio

[0132] Los objetivos de este estudio comparativo multicéntrico, de doble ciego y de grupos paralelos fueron evaluar la eficacia y seguridad del extracto de ácaros del polvo doméstico en pacientes con rinitis alérgica perenne debido a los ácaros del polvo doméstico. Los pacientes se asignaron al azar para recibir extracto de ácaros del polvo doméstico en la dosis A, extracto de ácaros del polvo doméstico en la dosis B o comprimidos de placebo. Los pacientes se trataron durante un periodo de 12 meses. Se recogieron muestras de suero y se monitorizaron los síntomas en las semanas 0, 16 y 52.

Análisis de suero

[0133] Las muestras de suero (340 µl cada una) se procesaron usando un sistema de eliminación de afinidad múltiple humana (MARS) Human 14 (columna Hu-14, 10 x 100 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.), que elimina selectivamente la glucoproteína de ácido α1, α1-antitripsina, α2-macroglobulina, albúmina, apolipoproteína A1, apolipoproteína A2, complemento C3, fibrinógeno, haptoglobina, IgA, IgG, IgM, transferrina y transtiretina. Se utilizó un aparato Ultimate 3000 HPLC (Thermo scientific, Waltham, EE.UU.) para el agotamiento de la afinidad. Las proteínas de flujo continuo se recogieron y se concentraron según las instrucciones del fabricante. Después del agotamiento, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. La reproducibilidad de agotamiento en ejecución se confirmó mediante cromatografía y análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras, usando geles NuPAGE al 4-12 % (Thermo scientific).

LISTADO DE SECUENCIAS

50 [0134]

<110> STALLERGENES

<120> FETUÍNA A SIALILADA COMO MARCADOR DE EFICACIA DE LA INMUNOTERAPIA

55

<130> BET 15P3301

<150> EP14306857.5

<151> 21-11-2014

60

<160> 30

<170> Versión de PatentIn 3.5

65

<210> 1

ES 2 813 412 T3

<211> 367
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 1

```

Met Lys Ser Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gln Leu Trp Gly Cys
 1           5           10           15

His Ser Ala Pro His Gly Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Gln Pro Asn Cys
          20           25           30

Asp Asp Pro Glu Thr Glu Glu Ala Ala Leu Val Ala Ile Asp Tyr Ile
          35           40           45

Asn Gln Asn Leu Pro Trp Gly Tyr Lys His Thr Leu Asn Gln Ile Asp
          50           55           60

Glu Val Lys Val Trp Pro Gln Gln Pro Ser Gly Glu Leu Phe Glu Ile
65           70           75           80

Glu Ile Asp Thr Leu Glu Thr Thr Cys His Val Leu Asp Pro Thr Pro
          85           90           95

Val Ala Arg Cys Ser Val Arg Gln Leu Lys Glu His Ala Val Glu Gly
          100          105          110

Asp Cys Asp Phe Gln Leu Leu Lys Leu Asp Gly Lys Phe Ser Val Val
          115          120          125

Tyr Ala Lys Cys Asp Ser Ser Pro Asp Ser Ala Glu Asp Val Arg Lys
          130          135          140

Val Cys Gln Asp Cys Pro Leu Leu Ala Pro Leu Asn Asp Thr Arg Val
145          150          155          160

Val His Ala Ala Lys Ala Ala Leu Ala Ala Phe Asn Ala Gln Asn Asn
  
```

ES 2 813 412 T3

165					170					175					
Gly	Ser	Asn	Phe	Gln	Leu	Glu	Glu	Ile	Ser	Arg	Ala	Gln	Leu	Val	Pro
			180					185					190		
Leu	Pro	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val	Glu	Phe	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Asp	Cys
		195					200					205			
Val	Ala	Lys	Glu	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Ala	Glu
	210					215					220				
Lys	Gln	Tyr	Gly	Phe	Cys	Lys	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly
225					230					235					240
Ala	Glu	Val	Ala	Val	Thr	Cys	Thr	Val	Phe	Gln	Thr	Gln	Pro	Val	Thr
				245					250					255	
Ser	Gln	Pro	Gln	Pro	Glu	Gly	Ala	Asn	Glu	Ala	Val	Pro	Thr	Pro	Val
			260					265					270		
Val	Asp	Pro	Asp	Ala	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Leu	Gly	Ala	Pro	Gly	Leu
		275					280					285			
Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	His	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Pro
		290				295					300				
Pro	Gly	His	Gln	Leu	His	Arg	Ala	His	Tyr	Asp	Leu	Arg	His	Thr	Phe
305					310					315					320
Met	Gly	Val	Val	Ser	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	Gly	Glu	Val	Ser	His	Pro
				325					330					335	
Arg	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Val	Gln	Pro	Ser	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly
			340					345					350		
Pro	Val	Val	Pro	Pro	Cys	Pro	Gly	Arg	Ile	Arg	His	Phe	Lys	Val	
		355					360					365			

<210> 2
<211> 74
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 813 412 T3

Leu Gly Gly Ala Glu Val Ala Val Thr Cys Thr Val Phe Gln Thr Gln
1 5 10 15

Pro Val Thr Ser Gln Pro Gln Pro Glu Gly Ala Asn Glu Ala Val Pro

20

25

30

Thr Pro Val Val Asp Pro Asp Ala Pro Pro Ser Pro Pro Leu Gly Ala
35 40 45

Pro Gly Leu Pro Pro Ala Gly Ser Pro Pro Asp Ser His Val Leu Leu
50 55 60

Ala Ala Pro Pro Gly His Gln Leu His Arg
65 70

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Thr Ser Gln Pro
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Pro Thr Pro Val
1 5

<210> 5
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 813 412 T3

Ala Pro His Gly Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Gln Pro Asn Cys Asp Asp
1 5 10 15

Pro Glu Thr Glu Glu Ala Ala Leu Val Ala Ile Asp Tyr Ile Asn Gln
20 25 30

Asn Leu Pro Trp Gly Tyr Lys His
35 40

<210> 6
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Pro His Gly Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Gln Pro Asn Cys Asp Asp Pro
1 5 10 15

Glu Thr Glu Glu Ala Ala Leu Val Ala Ile Asp Tyr Ile Asn Gln Asn
20 25 30

Leu Pro Trp Gly Tyr Lys His
35

<210> 7
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Gln Pro Asn Cys Asp Asp Pro Glu Thr Glu Glu Ala Ala Leu Val
1 5 10 15

Ala Ile Asp Tyr Ile Asn Gln Asn Leu Pro Trp Gly Tyr Lys His
20 25 30

<210> 8
<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 813 412 T3

Arg Gln Pro Asn Cys Asp Asp Pro Glu Thr Glu Glu Ala Ala Leu Val
1 5 10 15

Ala Ile Asp Tyr Ile Asn Gln Asn Leu Pro Trp Gly Tyr Lys His Thr
20 25 30

Leu Asn Gln Ile Asp Glu Val Lys Val
35 40

<210> 9
<211> 25
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Gln Asn Leu Pro Trp Gly Tyr Lys His
20 25

<210> 10
<211> 44
10 <212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 10

Lys His Thr Leu Asn Gln Ile Asp Glu Val Lys Val Trp Pro Gln Gln
1 5 10 15

Pro Ser Gly Glu Leu Phe Glu Ile Glu Ile Asp Thr Leu Glu Thr Thr
20 25 30

Cys His Val Leu Asp Pro Thr Pro Val Ala Arg Cys
35 40

<210> 11
<211> 40
20 <212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 813 412 T3

Asn Gln Ile Asp Glu Val Lys Val Trp Pro Gln Gln Pro Ser Gly Glu
1 5 10 15

Leu Phe Glu Ile Glu Ile Asp Thr Leu Glu Thr Thr Cys His Val Leu
20 25 30

Asp Pro Thr Pro Val Ala Arg Cys
35 40

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

Arg Gln Leu Lys Glu His Ala Val Glu Gly Asp Cys Asp Phe Gln Leu
1 5 10 15

Leu Lys Leu

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

Lys Glu His Ala Val Glu Gly Asp Cys Asp Phe Gln Leu Leu Lys Leu
1 5 10 15

<210> 14
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

Lys Glu His Ala Val Glu Gly Asp Cys Asp Phe Gln Leu Leu Lys Leu
1 5 10 15

Asp Gly Lys Phe
20

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Phe Ser Val Val Tyr Ala Lys Cys
1 5

ES 2 813 412 T3

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Lys Val Cys Gln Asp Cys Pro Leu Leu Ala Pro Leu Asn Asp Thr Arg
 1 5 10 15

Val
 10
 <210> 17
 <211> 24
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Lys Ala Ala Leu Ala Ala Phe Asn Ala Gln Asn Asn Gly Ser Asn Phe
 1 5 10 15

Gln Leu Glu Glu Ile Ser Arg Ala
 20

20 <210> 18
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 18

Arg Ala Gln Leu Val Pro Leu Pro Pro Ser Thr Tyr Val Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Val Ser Gly Thr Asp Cys Val Ala Lys Glu
 20 25

30 <210> 19
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 35

Arg Ala Gln Leu Val Pro Leu Pro Pro Ser Thr Tyr Val Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Val Ser Gly Thr Asp Cys Val Ala Lys Glu Ala Thr Glu Ala Ala Lys
 20 25 30

Cys

ES 2 813 412 T3

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Lys Cys Asn Leu Leu Ala Glu Lys Gln
 1 5

10 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Lys Gln Tyr Gly Phe Cys Lys Ala
 1 5

20 <210> 22
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 22

Asp Pro Asp Ala Pro Pro Ser Pro Pro Leu Gly Ala Pro Gly Leu Pro
 1 5 10 15

Pro Ala Gly Ser Pro Pro Asp Ser His Val Leu Leu Ala Ala Pro Pro
 20 25 30

Gly His Gln Leu His Arg Ala
 35

30 <210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 23

Arg Ala His Tyr Asp Leu Arg His
 1 5

40 <210> 24
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

ES 2 813 412 T3

Arg Ala His Tyr Asp Leu Arg His Thr Phe Met Gly Val Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Ser Pro Ser Gly Glu Val Ser His Pro Arg Lys
20 25

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Arg His Thr Phe Met Gly Val Val Ser Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu
1 5 10 15

Val Ser His Pro Arg
20

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg His Thr Phe Met Gly Val Val Ser Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu
1 5 10 15

Val Ser His Pro Arg Lys
20

<210> 27
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg His Thr Phe Met Gly Val Val Ser Leu Gly Ser Pro Ser Gly Glu
1 5 10 15

Val Ser His Pro Arg Lys Thr
20

<210> 28
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

ES 2 813 412 T3

Arg Thr Val Val Gln Pro Ser Val Gly Ala Ala Ala Gly Pro Val Val
1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro Gly Arg Ile
20

5 <210> 29
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

Thr Val Val Gln Pro Ser Val Gly Ala Ala Ala Gly Pro Val Val Pro
1 5 10 15

10 Pro Cys Pro Gly Arg Ile
20

15 <210> 30
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30

Val Val Gln Pro Ser Val Gly Ala Ala Ala Gly Pro Val Val Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Gly Arg Ile
20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a la inmunoterapia, cuyo procedimiento comprende detectar el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A o un fragmento del mismo, que comprende
 5 una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas, tal como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica de dicho paciente, en el que dicha muestra biológica se ha tomado antes del comienzo de y/o durante la inmunoterapia, y en el que, en dicha inmunoterapia, se administra un alérgeno o autoantígeno a dicho paciente para
 10 tratar una alergia o una enfermedad autoinmune.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, cuyo procedimiento comprende las etapas de:

15 a) detectar el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A o un fragmento del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas, tal como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica de dicho paciente;
 b) comparar dicho nivel de expresión con un control;
 20 c) identificar dicho paciente como probable respondedor o no respondedor a la inmunoterapia basándose en la comparación con el control.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa c) se realiza:

25 (i) determinando que es probable que el paciente responda a la inmunoterapia si el control se deriva de un sujeto respondedor o de un grupo de sujetos respondedores que se sabe que responden a dicha inmunoterapia, y si un nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control; o
 (ii) determinando que es probable que el paciente responda a la inmunoterapia si el control se deriva de un sujeto
 30 no respondedor o de un grupo de sujetos no respondedores, y si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, en la muestra del paciente es mayor que el nivel de expresión en el control;
 o
 (iii) determinando que es probable que el paciente responda a la inmunoterapia si el control se deriva de un grupo de sujetos seleccionados aleatoriamente, y si un nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento
 35 del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control.

4. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que:

40 (i) el control consiste en un valor de la abundancia relativa del péptido SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos el 0,0046 % de la abundancia peptídica total, o
 (ii) el control consiste en un valor de la abundancia relativa de SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de
 45 oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos 3.600 unidades, y

en el que la cuantificación de la abundancia de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, se determina:

50 (a) agotando una muestra de suero en albúmina, IgG, anti-tripsina, IgA, transferrina y haptoglobulina;
 (b) degradando con tripsina la muestra de suero agotada;
 (c) cuantificando la abundancia relativa en dicha muestra de suero agotada digerida con tripsina del péptido SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico
 55 terminales en la posición 270, mediante LC-MS/MS.

5. Un procedimiento para seleccionar un paciente para inmunoterapia, cuyo procedimiento comprende las etapas de:

60 a) detectar el nivel de expresión de un polipéptido de Fetuína-A, un fragmento o una variante del mismo, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, por referencia a las posiciones aminoacídicas, tal como se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica de dicho paciente;
 65 b) comparar dicho nivel de expresión con un control;

c) seleccionar o rechazar a dicho paciente para inmunoterapia basándose en la comparación con el control;

en el que dicha muestra biológica se toma antes del comienzo de la inmunoterapia, y en el que dicha inmunoterapia comprende la administración de un alérgeno o autoantígeno a dicho paciente para reducir la respuesta inmunitaria.

5

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que la selección o rechazo de dicho paciente para inmunoterapia basándose en la comparación con el control se realiza:

- 10 (i) si el control se deriva de un sujeto respondedor o de un grupo de sujetos respondedores que se sabe que responden a dicha inmunoterapia, seleccionando al paciente para inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control;
- 15 (ii) si el control se deriva de un sujeto no respondedor o de un grupo de sujetos no respondedores, seleccionando al paciente para inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es mayor que el nivel de expresión en el control; o
- (iii) si el control se deriva de un grupo de sujetos seleccionados aleatoriamente, seleccionando al paciente para inmunoterapia si el nivel de expresión de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, en la muestra del paciente es igual o mayor que el nivel de expresión en el control.

20 7. El procedimiento según la reivindicación 5 o 6, en el que:

- (i) el control consiste en un valor de la abundancia relativa del péptido SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos el
- 25 0,0046 % de la abundancia peptídica total, o
- (ii) el control consiste en un valor de la abundancia relativa de SEQ ID NO: 2 que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, de al menos 3.600 unidades, y

30

en el que la cuantificación de la abundancia de dicho polipéptido de Fetuína-A, o fragmento del mismo, se determina:

- (a) agotando una muestra de suero en albúmina, IgG, anti-tripsina, IgA, transferrina y haptoglobulina;
- (b) degradando con tripsina la muestra de suero agotada;
- 35 (c) cuantificando la abundancia relativa en dicha muestra de suero agotada digerida con tripsina del péptido SEQ ID NO: 2, que comprende una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 256 y una cadena de oligosacáridos unidos a O que lleva dos residuos de ácido siálico terminales en la posición 270, mediante LC-MS/MS.

40 8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho polipéptido de Fetuína-A, o un fragmento del mismo, consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2.

9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el paciente tiene alergia, preferentemente alergia a alérgenos del polen, alérgenos de insectos, alérgenos del pelo y la caspa de animales, y alérgenos

45 alimentarios.

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la inmunoterapia comprende la administración de un alérgeno a una superficie mucosa, preferentemente una superficie sublingual, oral, bucal, ocular, rectal, urinaria, pulmonar o del oído, o la administración de un alérgeno a través de una vía subcutánea, intranasal,

50 transdérmica, intralinfática o epicutánea.

11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se administra un extracto de alérgeno como parte de dicha inmunoterapia.

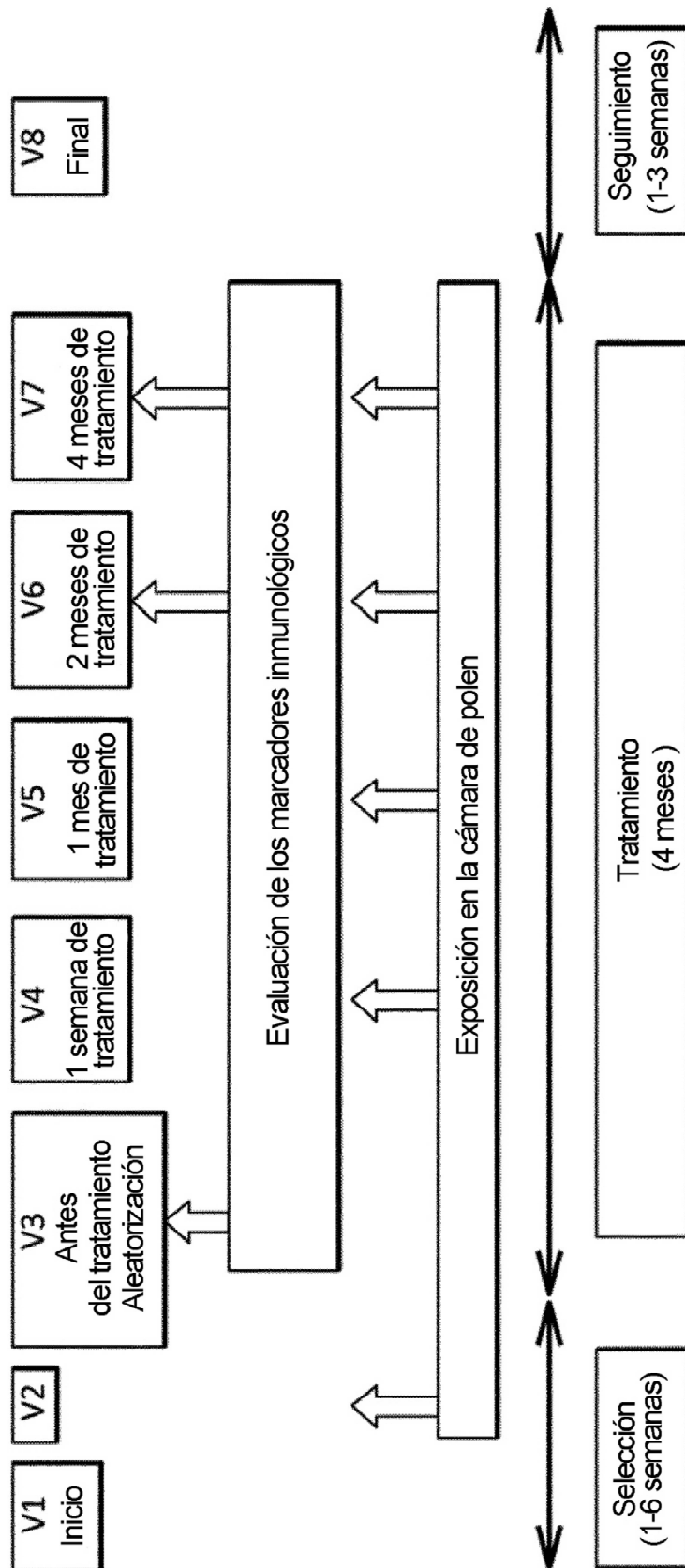


FIG.1

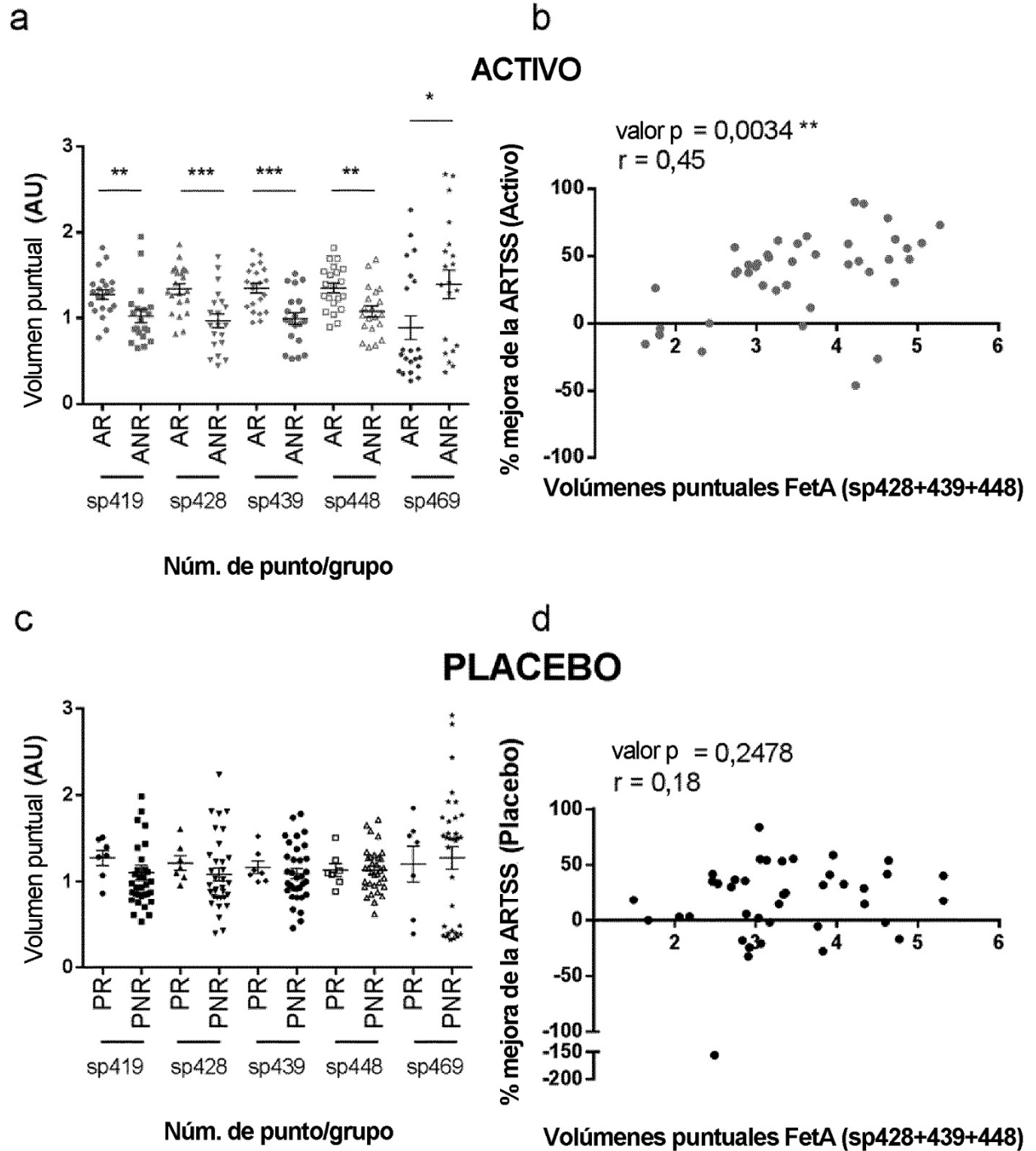


FIG.2

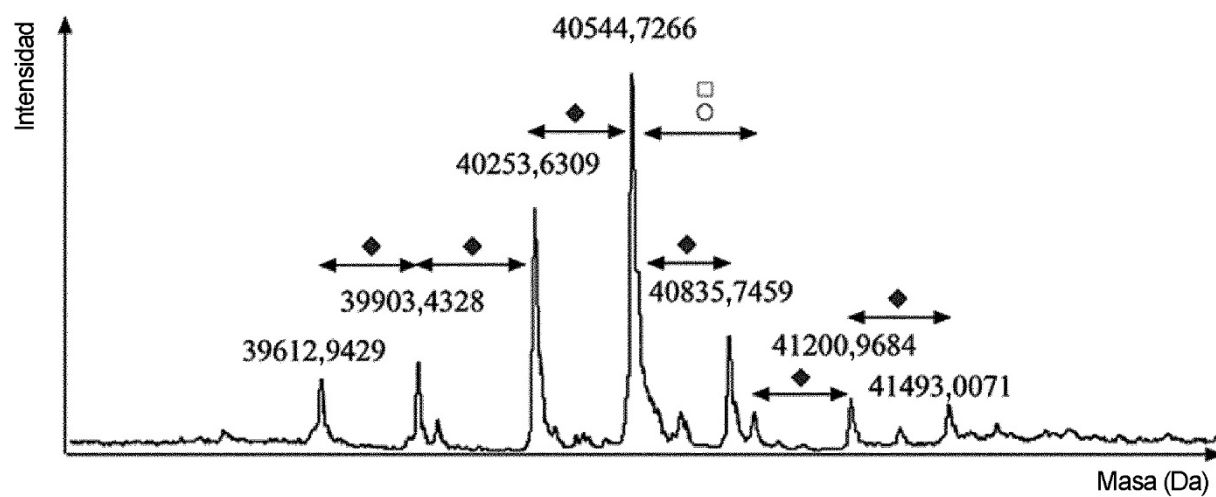


FIG.3

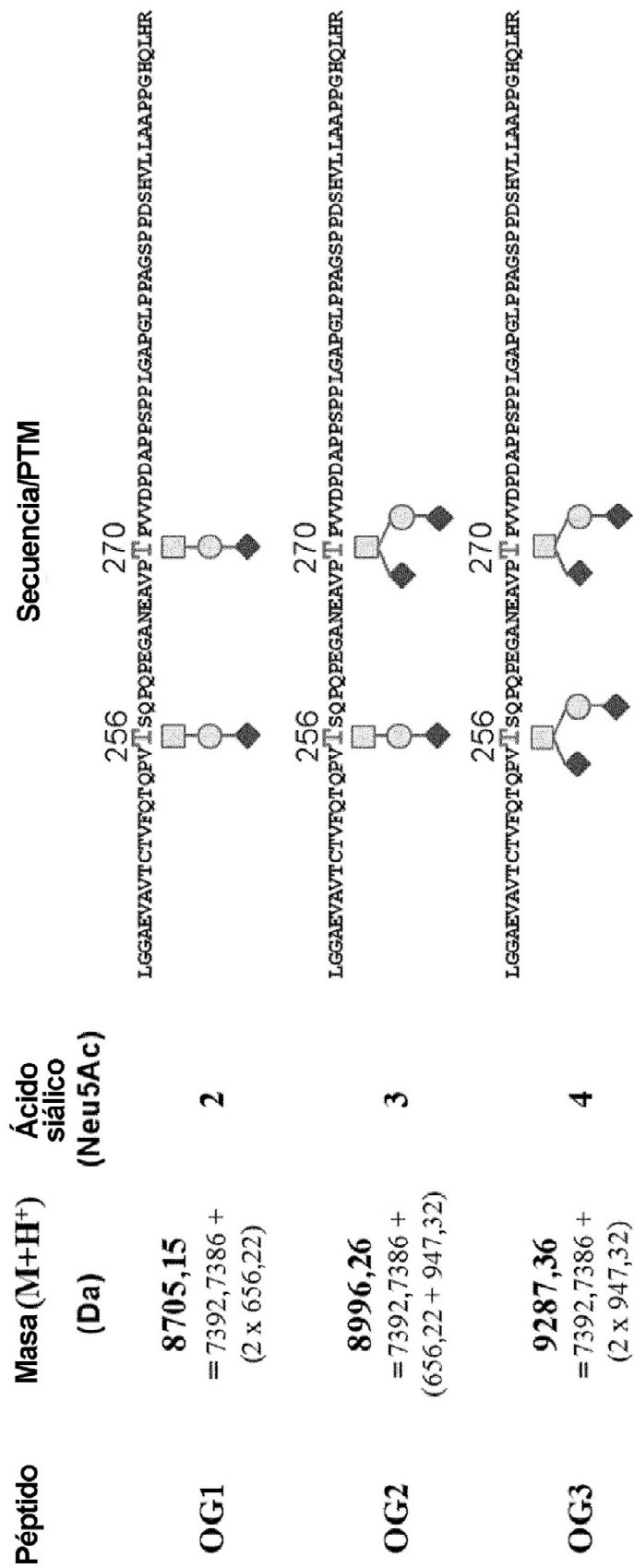


FIG.4

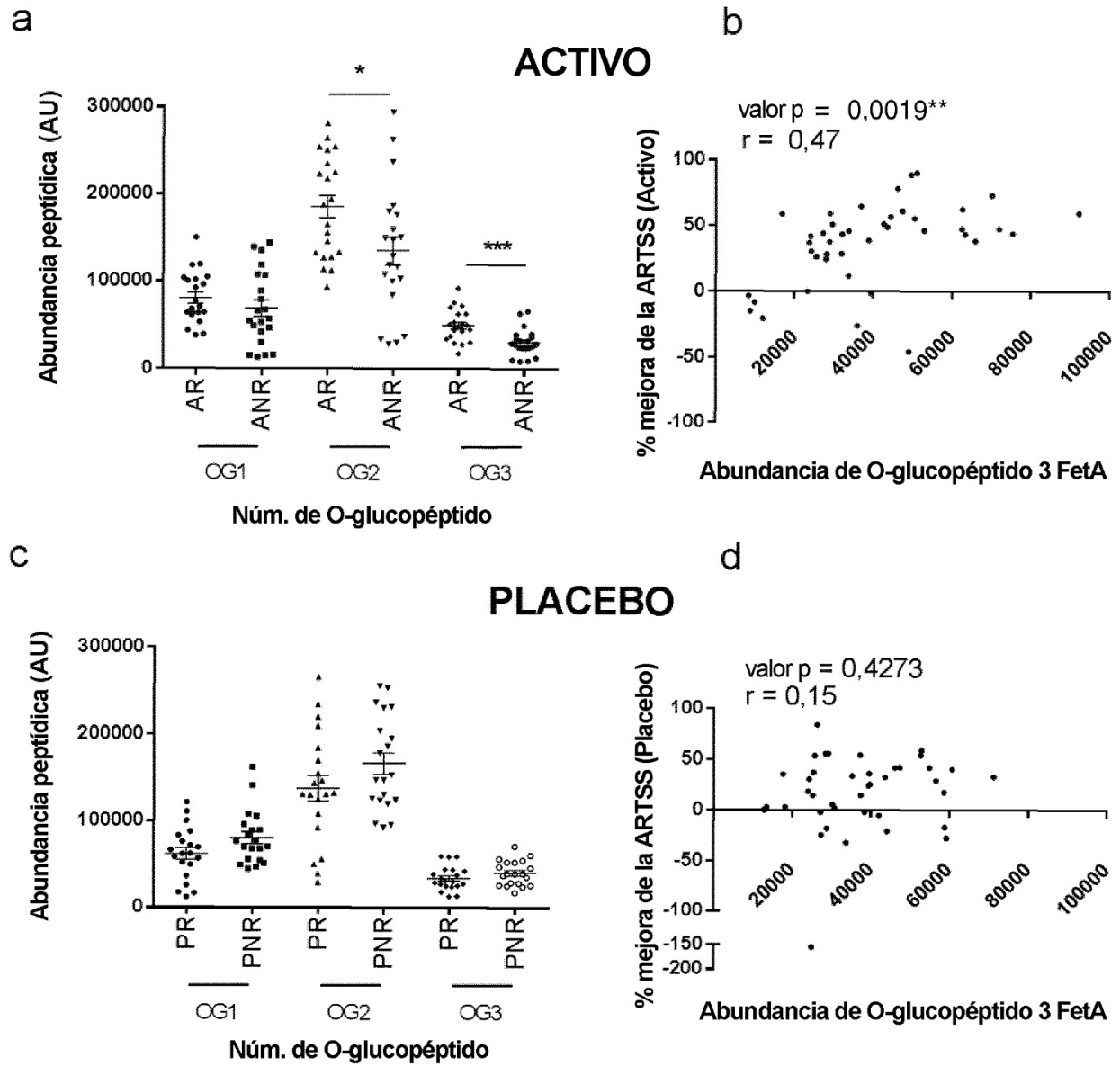


FIG.5

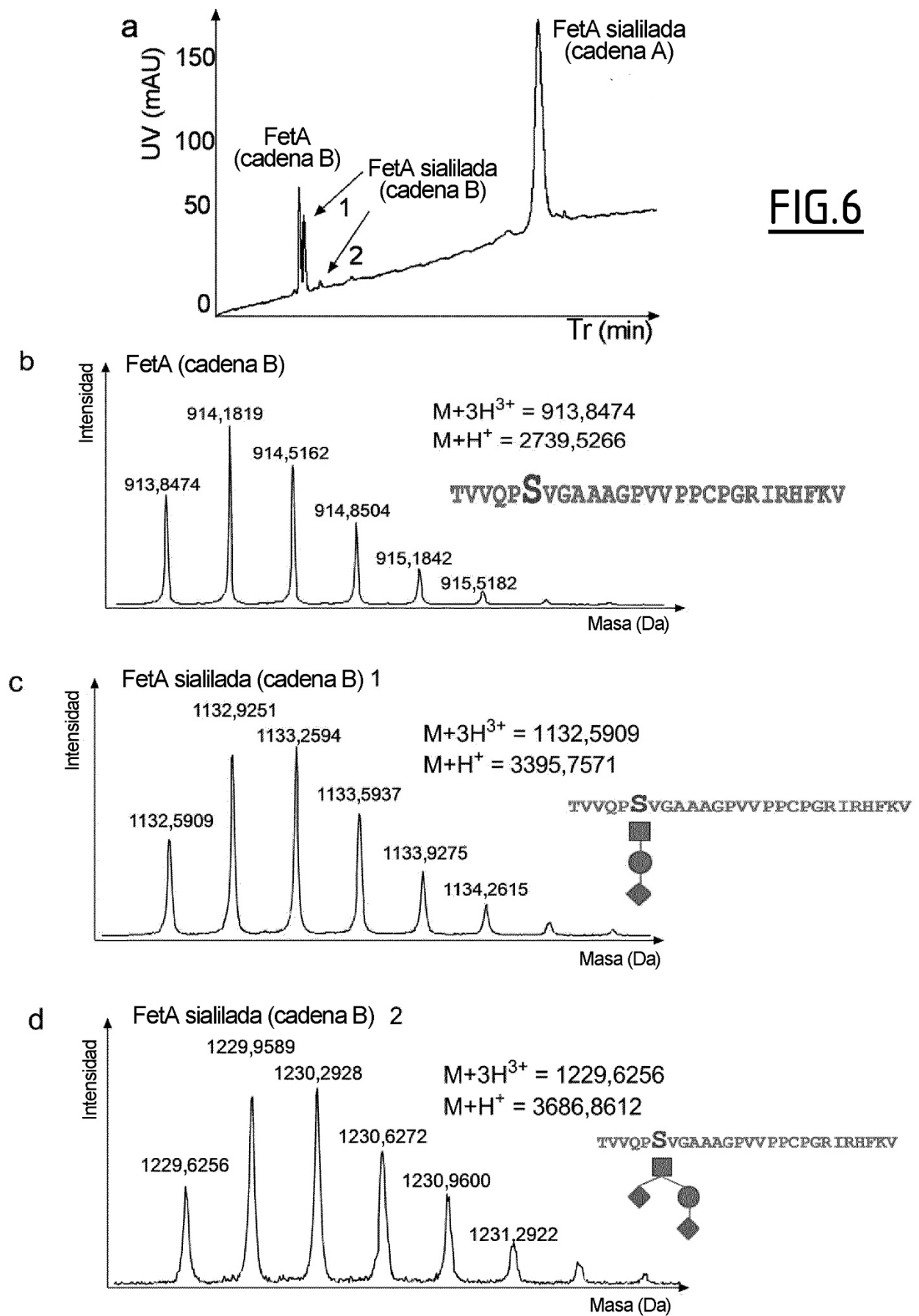


FIG.6

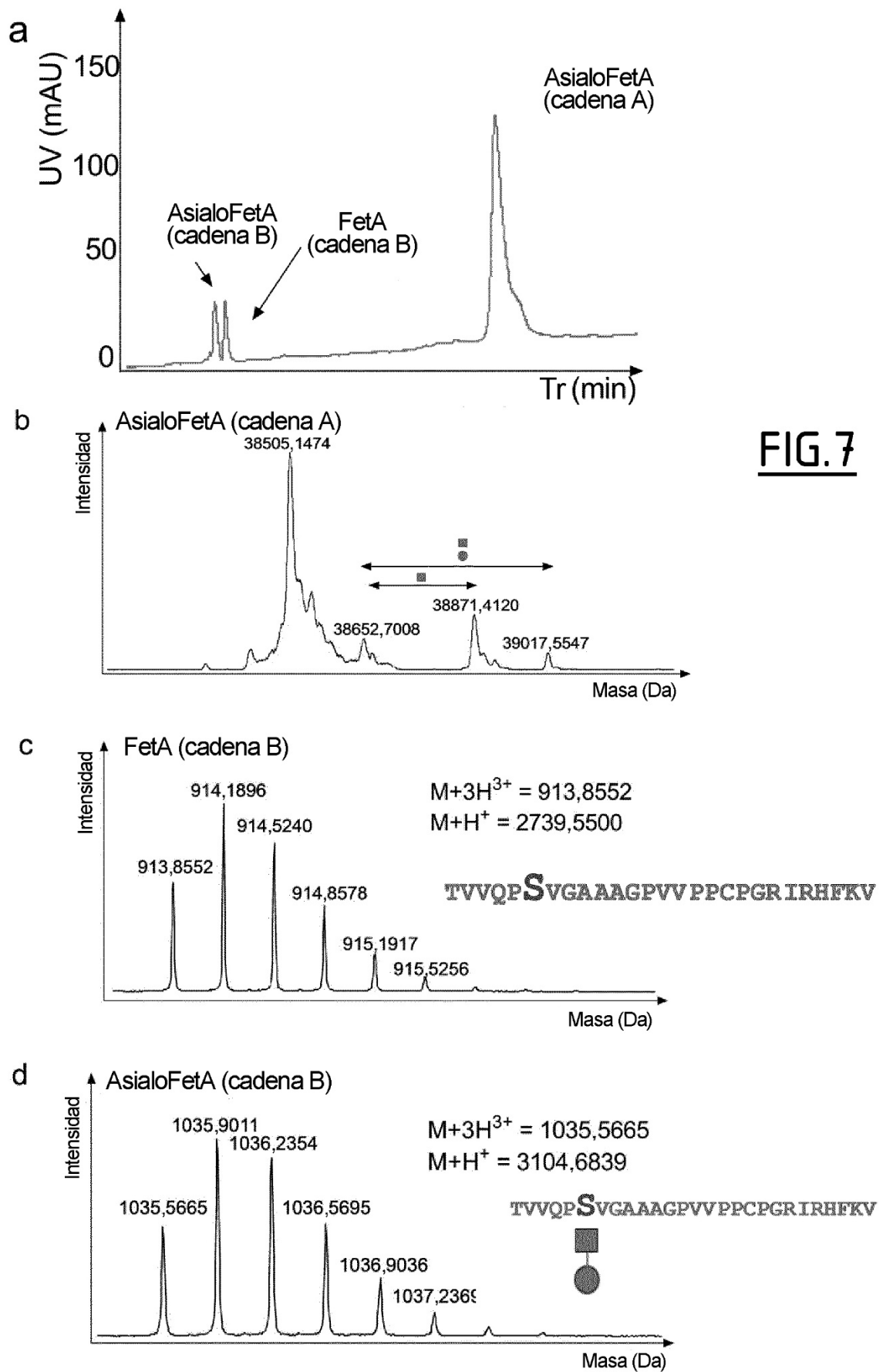


FIG. 7

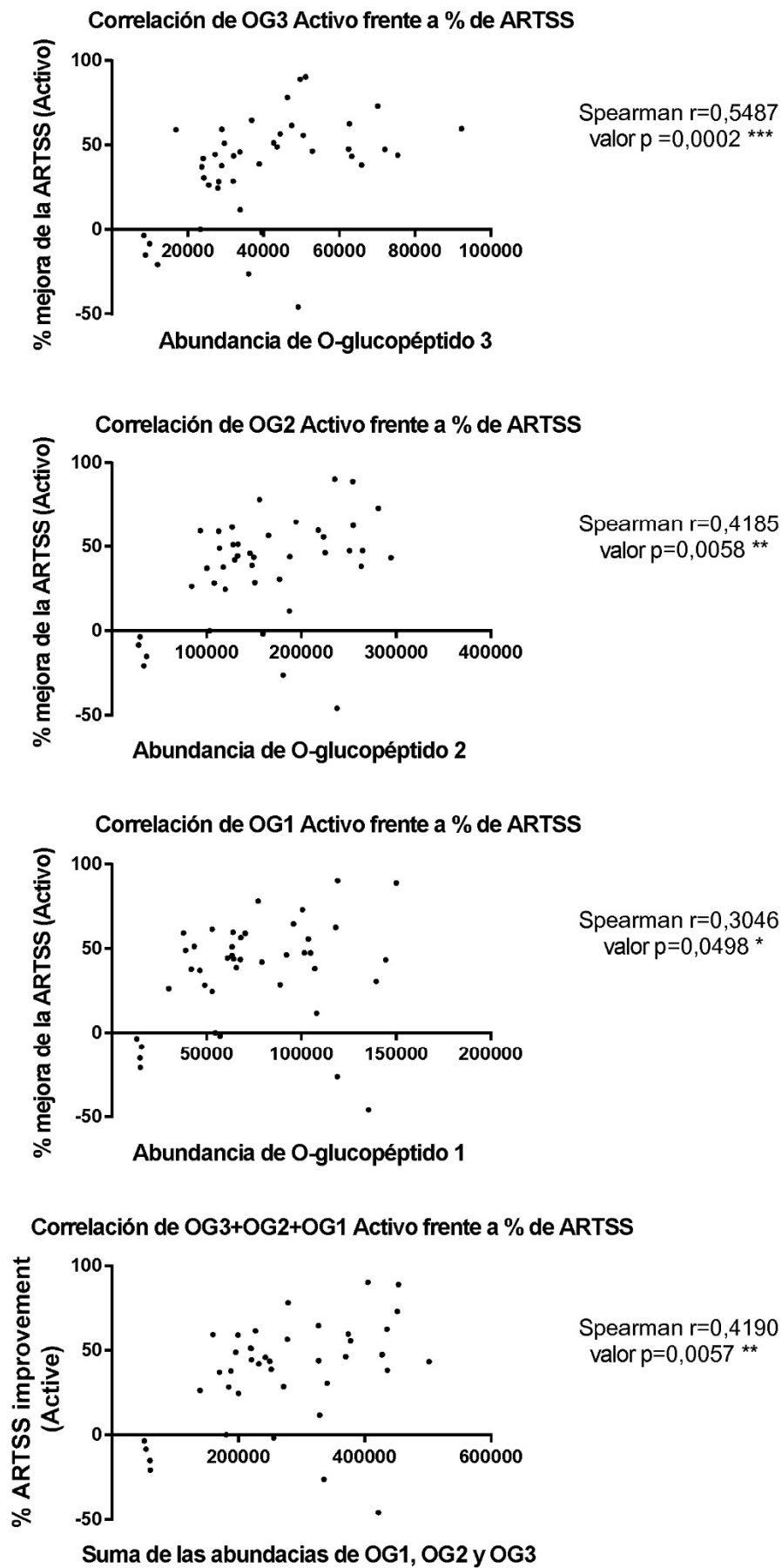
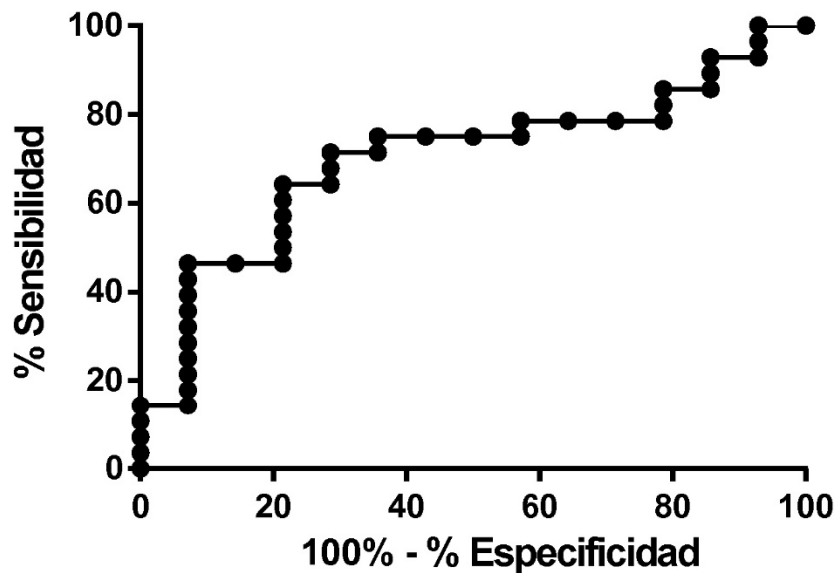


FIG.8

A

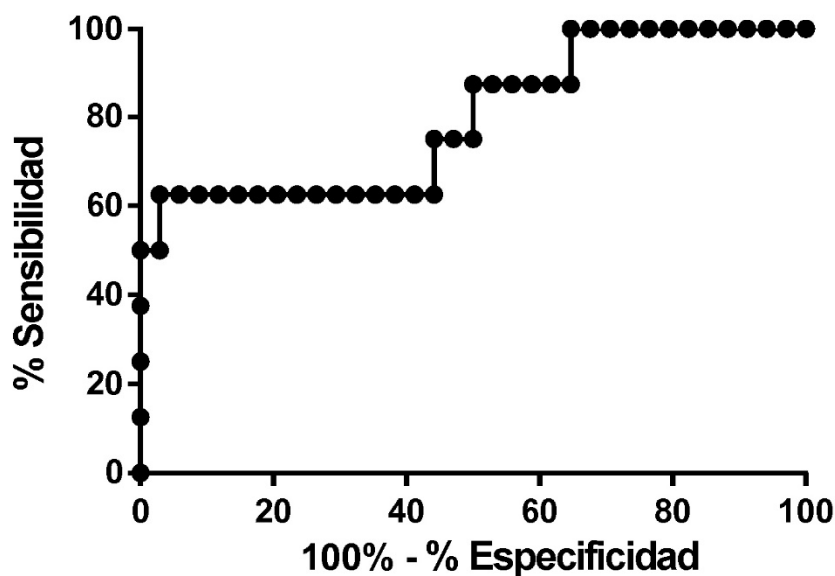
Curva ROC de la abundancia de OG3 en el grupo activo con % de mejora de la ARTSS = 50 como corte



AUC = 0,7015
valor p = 0,03509

B

Curva ROC de la abundancia de OG3 en el grupo activo con % de mejora de la ARTSS = 10 como corte



AUC = 0,7978
valor p = 0,009500

FIG.9

Subgrupos OG3: Puntuación Activo frente a Placebo

Corte basado en las abundancias de OG3 en la cohorte global

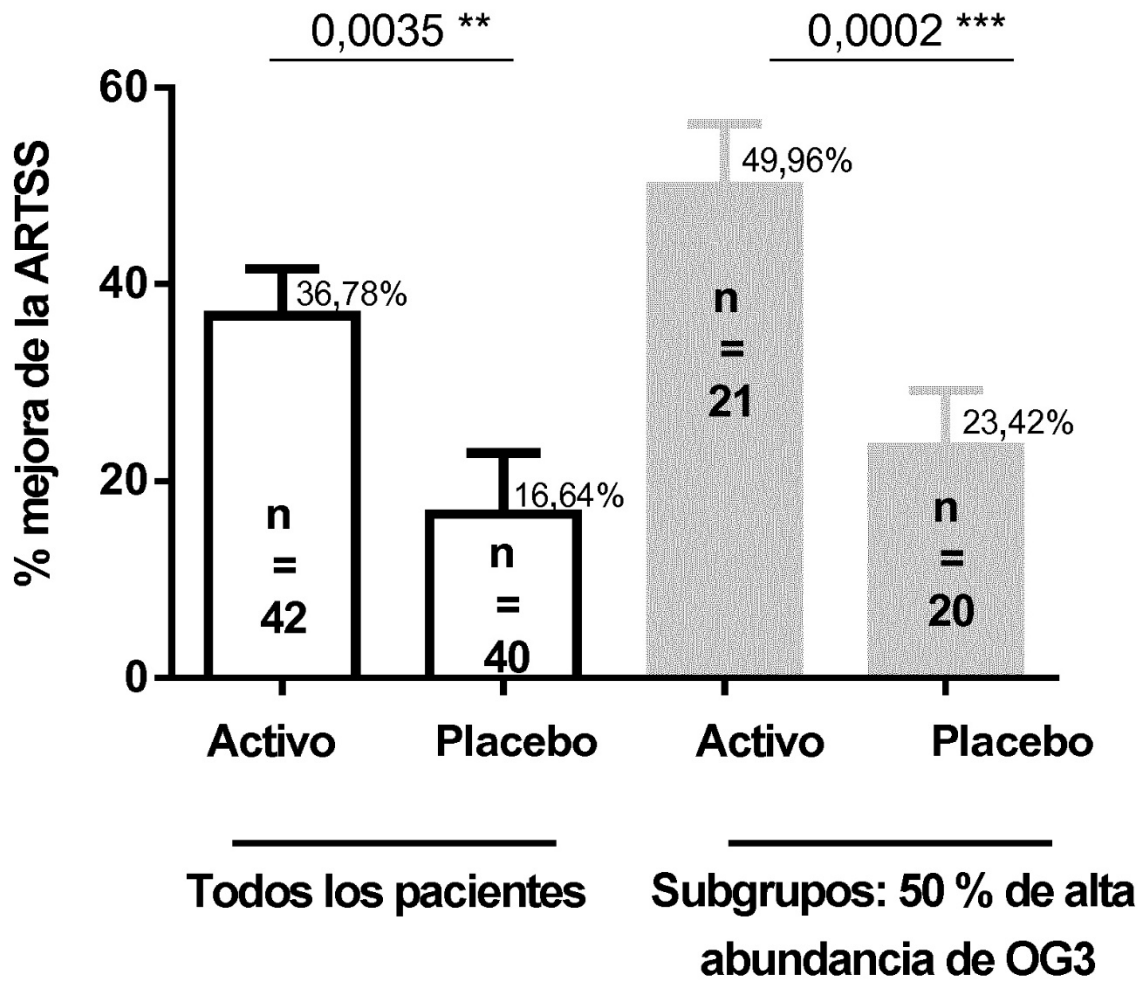
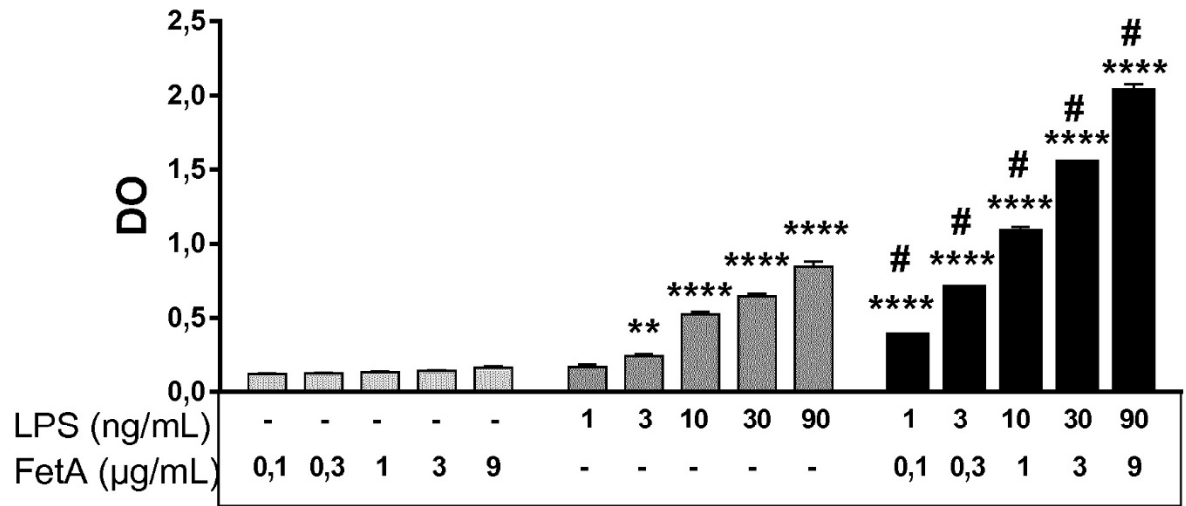


FIG.10

a



b

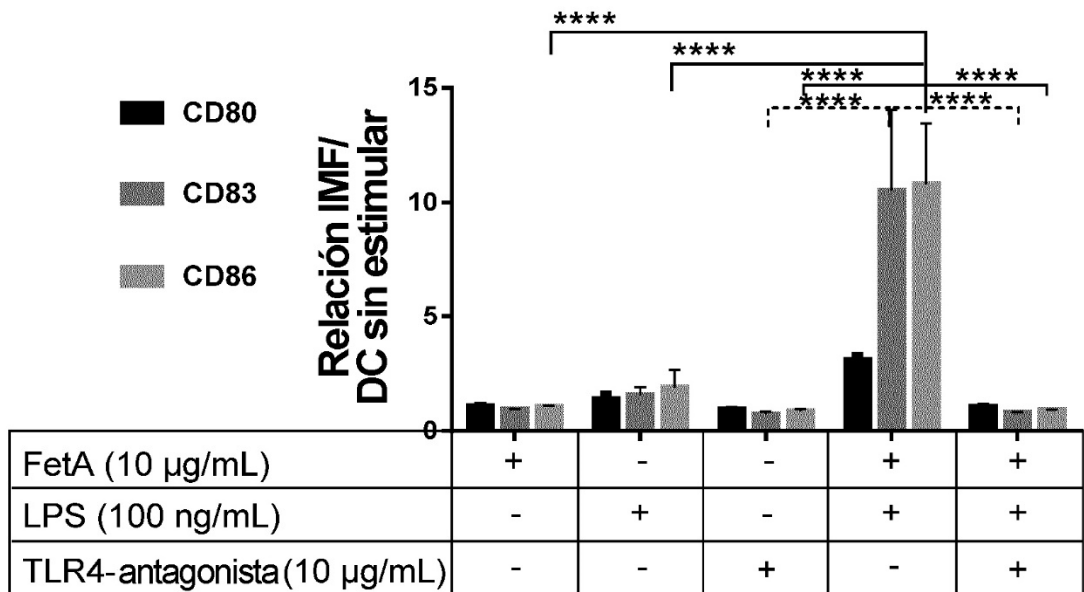
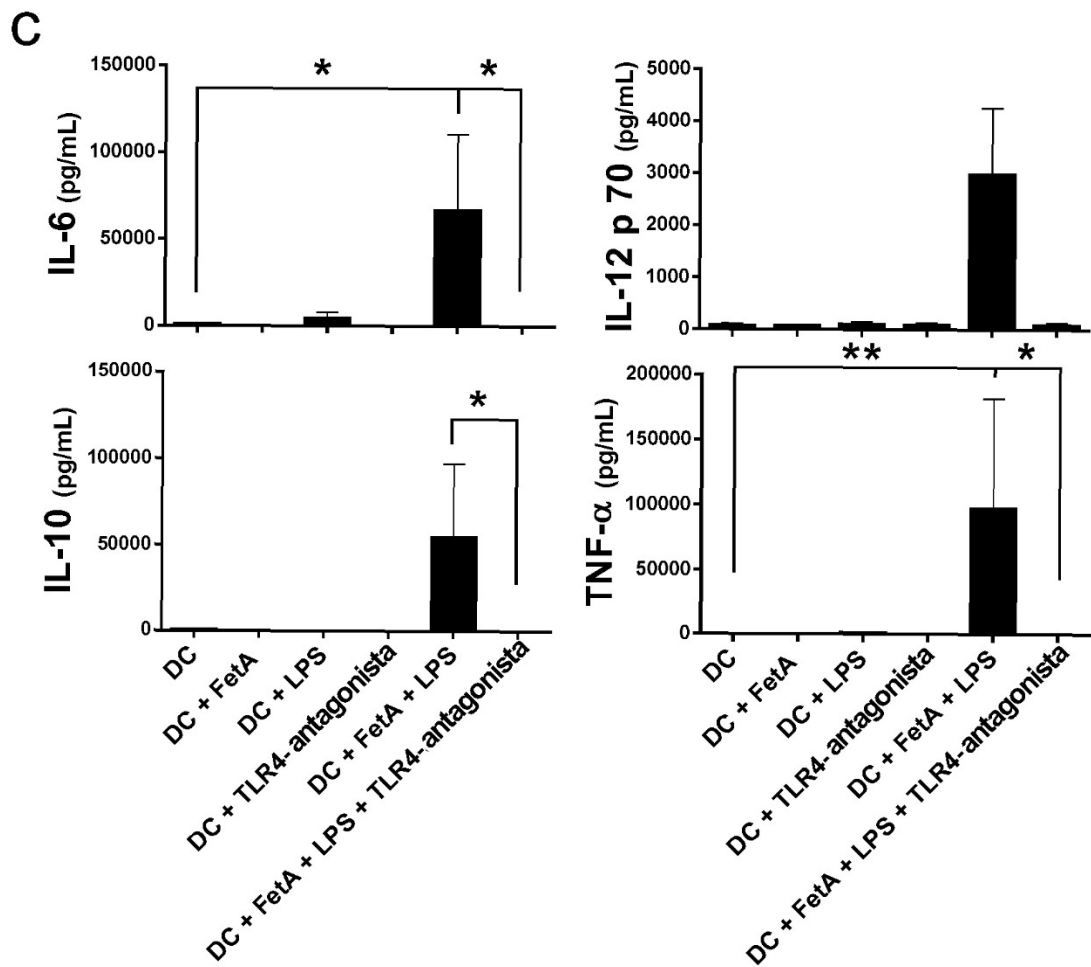
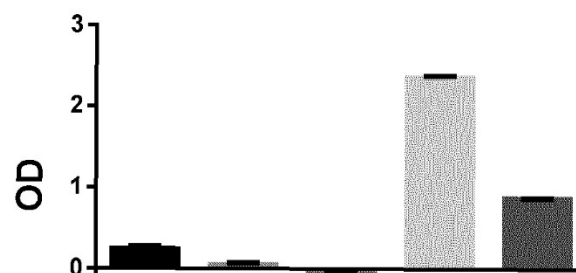


FIG.11 (comienzo)



d

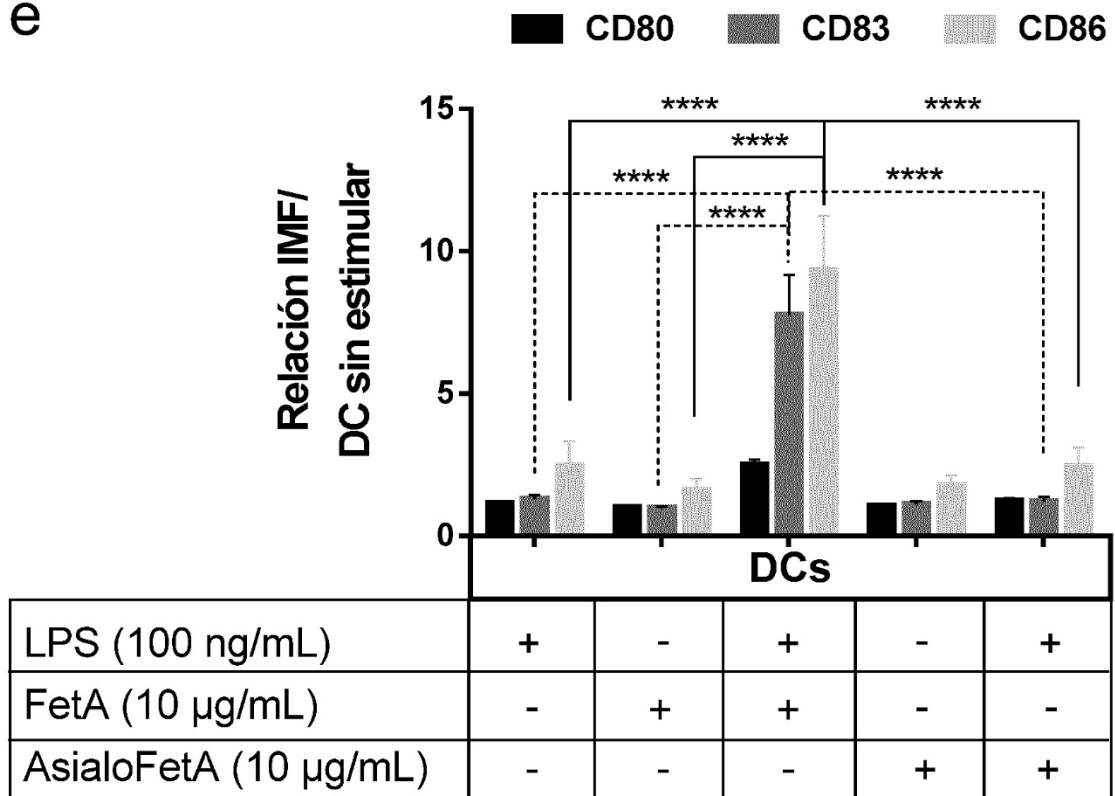
Activación de TLR4 humano



LPS (100 ng/mL)	+	-	-	+	+
FetA (10 μ g/mL)	-	+	-	+	-
AsialoFetA (10 μ g/mL)	-	-	+	-	+

FIG.11 (continuación)

e



f

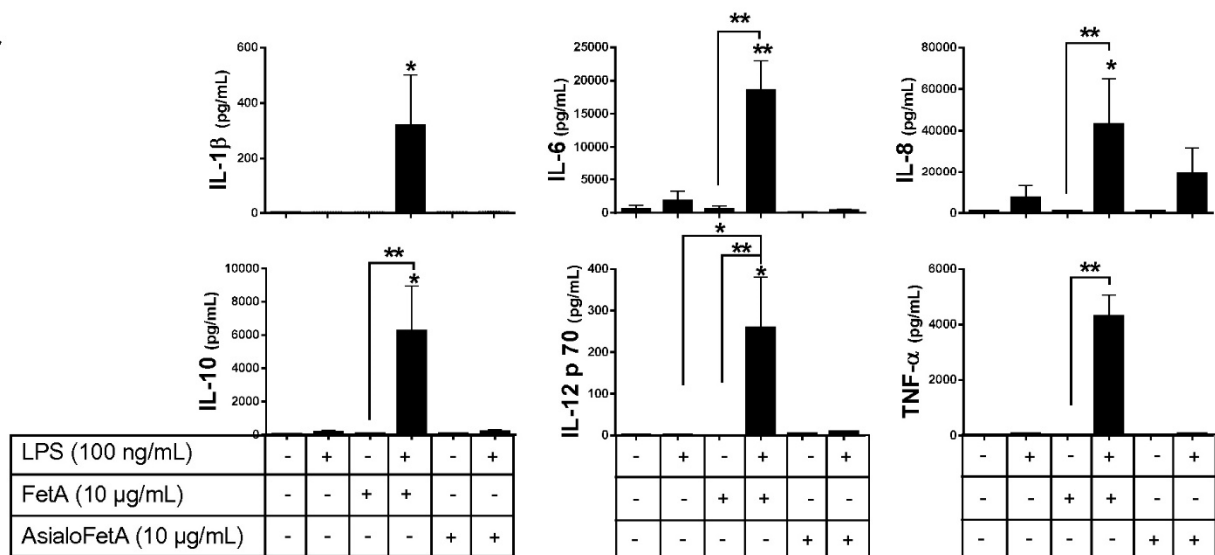
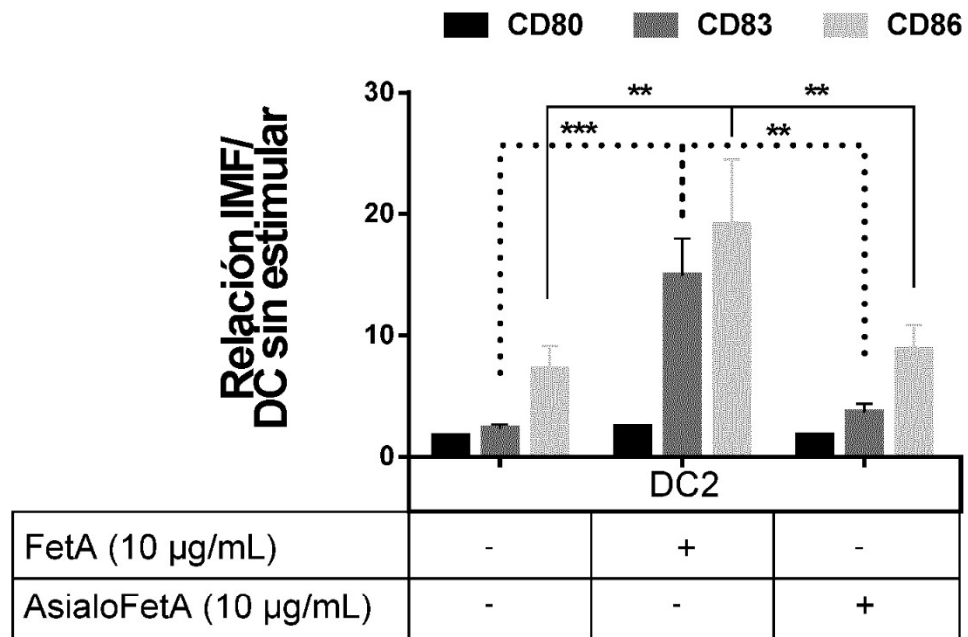


FIG.11 (final)

a



b

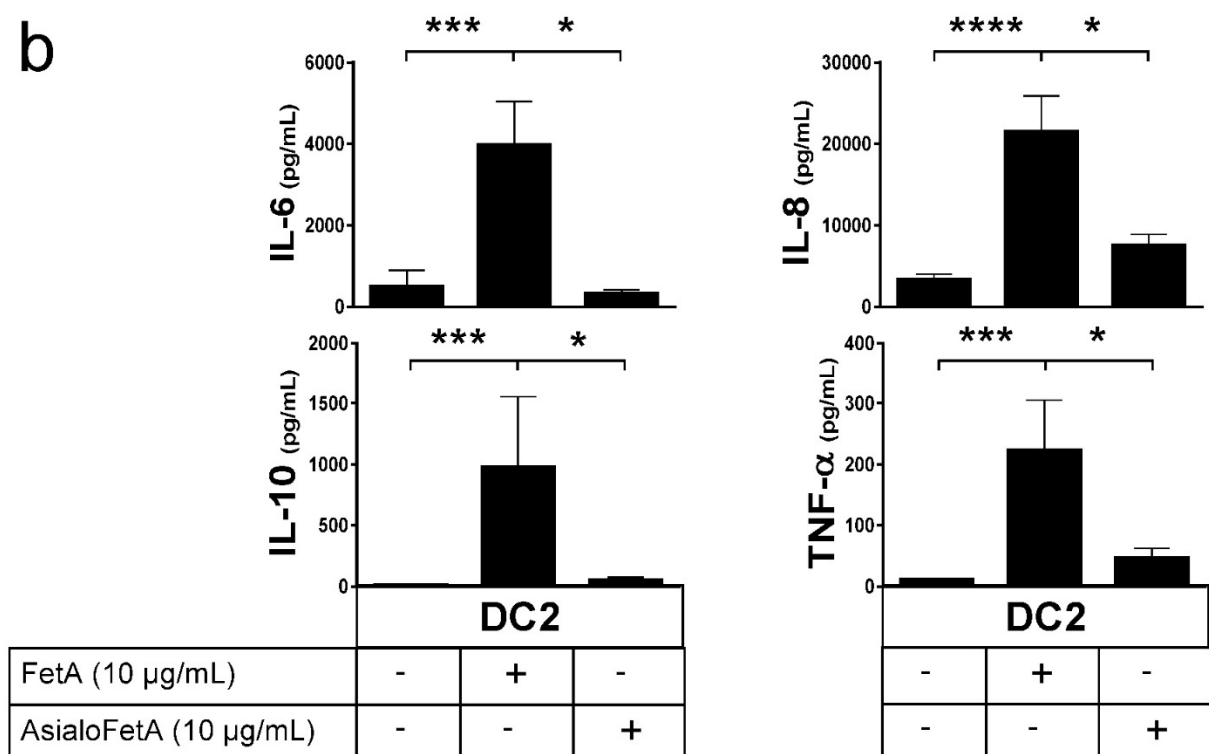


FIG.12 (comienzo)

C

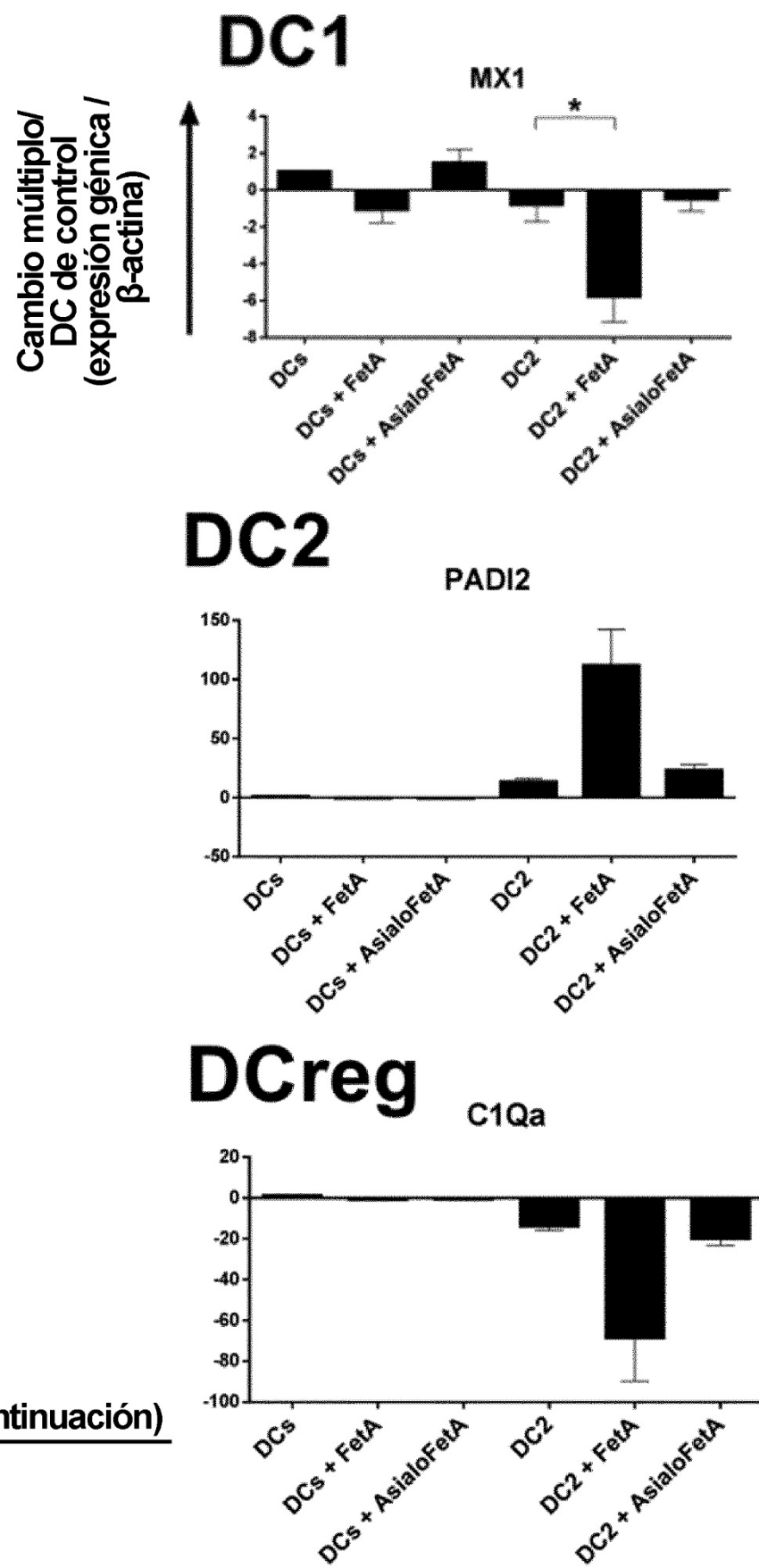


FIG.12 (continuación)

d

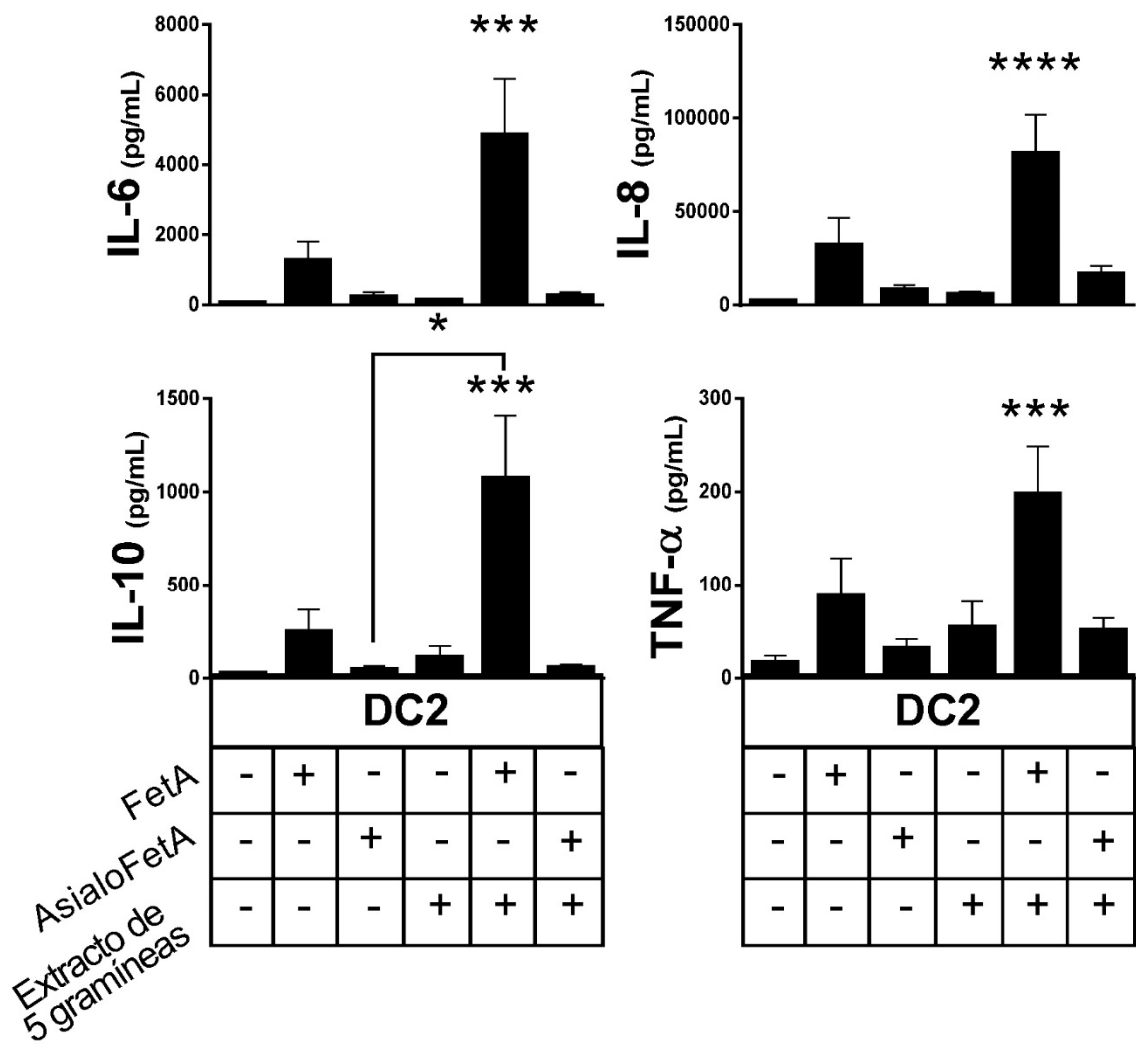


FIG.12 (continuación)

e

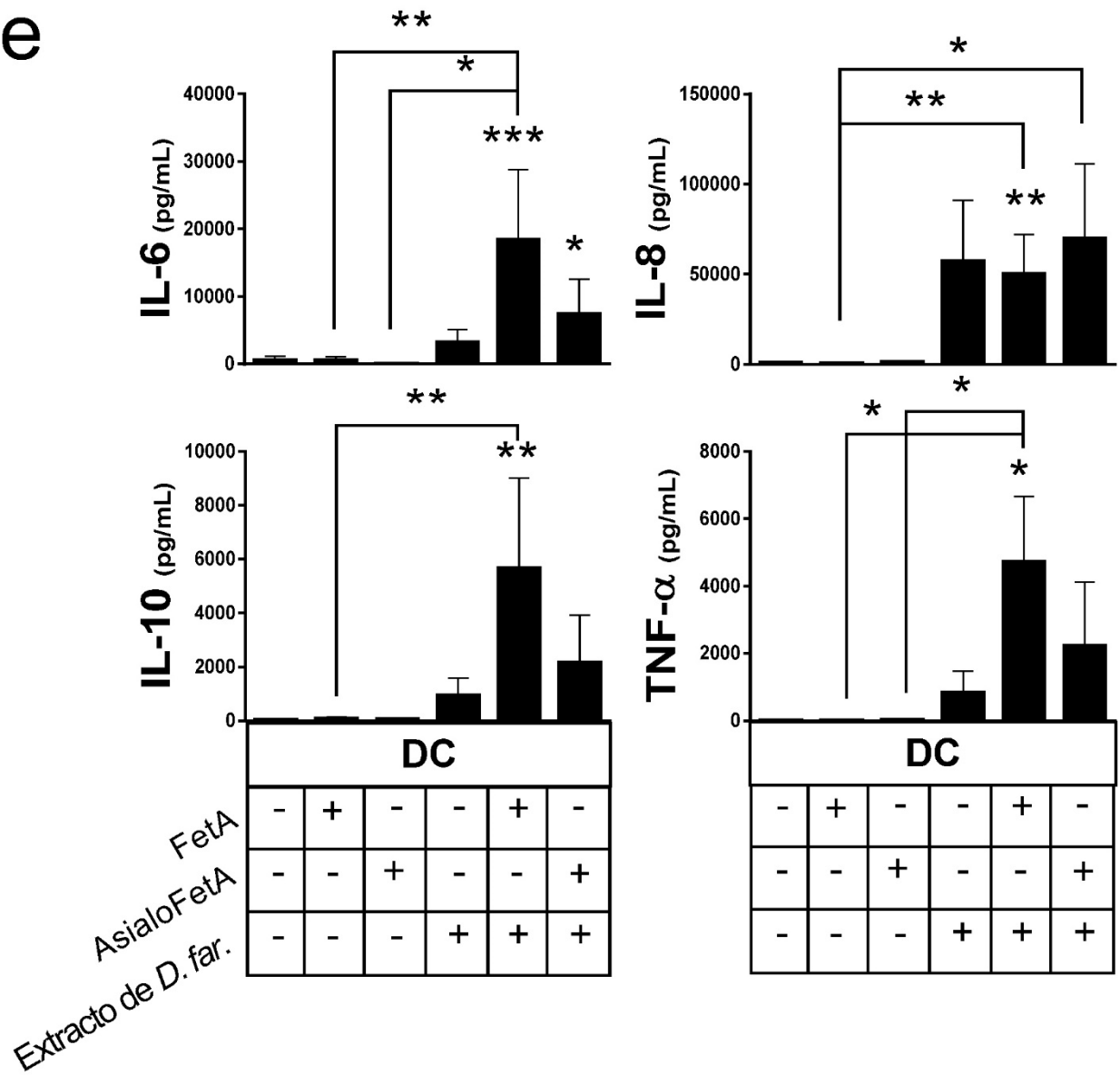
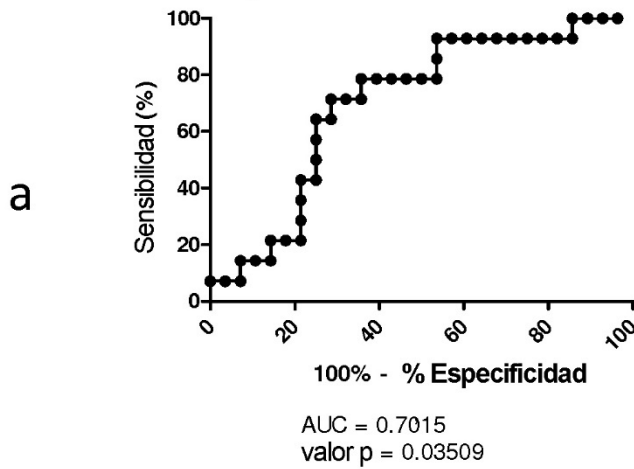
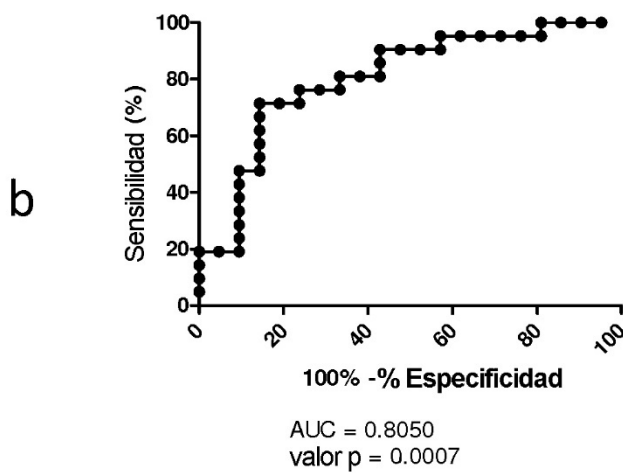


FIG.12 (final)

ROC de la abundancia de OG3 en el grupo activo con
% de mejora de la ARTSS = 50 como corte



ROC de la abundancia de OG3 en el grupo activo con
% de mejora de la ARTSS = 43,9 como corte



ROC de la abundancia de OG3 en el grupo activo con
% de mejora de la ARTSS = 10 como corte

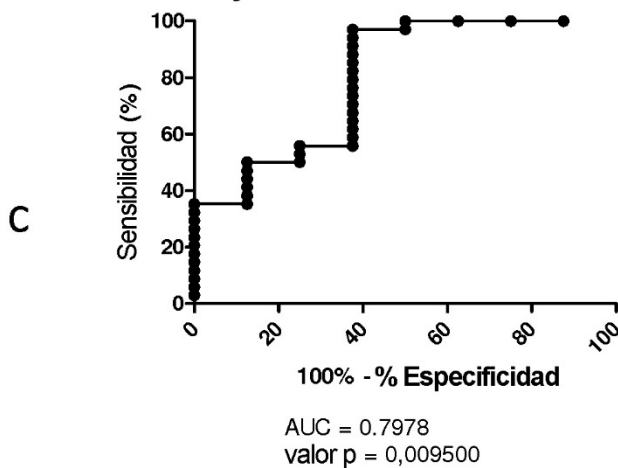


FIG.13