



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 606**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/564** (2006.01)  
**C08B 37/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06765559 .7**  
96 Fecha de presentación : **31.01.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1856531**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Método para diagnosticar la esclerosis múltiple.**

30 Prioridad: **31.01.2005 US 47124**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.05.2011**

73 Titular/es: **GLYCOMINDS Ltd.**  
**1 Yodfat Street, Alon Building, Global Park**  
**Lod 71291, IL**

72 Inventor/es: **Dotan, Nir;**  
**Dukler, Avinoam y**  
**Scwartz, Mikael**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 358 606 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

## MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La invención se refiere de manera general a un método y a reactivos para el diagnóstico y evaluación de la prognosis de la esclerosis múltiple, y más particularmente a un método y a reactivos para el diagnóstico y la evaluación de la prognosis de la esclerosis múltiple mediante la medición de los niveles de anticuerpos contra glicanos en una muestra biológica.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria crónica del sistema nervioso central. Es una causa común de discapacidad persistente en adultos jóvenes. En pacientes que sufren MS, el sistema inmunológico destruye la capa de mielina de los axones en el cerebro y en la médula espinal, provocando una diversidad de patologías neurológicas. En la forma más común de MS, a episodios de recaída-remisión (RRMS) de empeoramiento agudo de la función neurológica (exacerbaciones, ataques) siguen periodos de recuperación parcial o completa (remisiones) sin que avance la enfermedad (estables).

20 [0003] Para diagnosticar MS en un paciente deben registrarse dos sucesos separados. Se ha informado de que la mayoría de pacientes con MS inicialmente se presentan con un síndrome clínicamente aislado debido a una lesión desmielinizante inflamatoria en el nervio óptico, tallo cerebral o médula espinal. Aproximadamente 50 por ciento de aquellos pacientes que presentan un síndrome clínicamente aislado progresan a MS clínicamente definitiva (CDMS) dentro de los 37 meses posteriores a la presentación. Aproximadamente 40% a 50% progresan a una MS clínicamente definitiva dentro de los 18 meses posteriores a la evaluación mediante resonancia magnética (MRI). La progresión posterior de la enfermedad puede variar significativamente de paciente a paciente. La progresión puede variar entre un curso benigno, un curso clásico de recaída-remisión, crónico progresivo y un raro curso fulminante.

25 [0004] Un método para diagnosticar la MS que facilita el diagnóstico precoz y la predicción del avance o nivel de actividad de la enfermedad (benigna, moderada y maligna) resultaría valioso para controlar la enfermedad y proporcionar recomendaciones al paciente. Por ejemplo, a los pacientes diagnosticados precozmente de un curso activo de MS se les podrían ofrecer tratamientos que resulten beneficiosos para la MS temprana. Además, los pacientes que presentan un riesgo de un avance más rápido y que sufrirán un suceso clínico adicional en el futuro próximo se beneficiarían de un tratamiento más agresivo que ayudaría a retrasar estos potenciales sucesos futuros.

30 [0005] Los métodos actuales para la evaluación y seguimiento del avance de la MS se basan en la evaluación y clasificación de la función de los pacientes durante los ataques y de las discapacidades acumuladas durante los ataques. Una evaluación utilizada para evaluar la MS es la escala extendida de estado de discapacidad (EDSS). Sin embargo, el sistema de puntuación EDSS no predice el avance de la enfermedad. Además, la puntuación EDSS puede ser variable debido a que se basa en una evaluación subjetiva de la función del paciente. Entre los métodos para el diagnóstico pueden incluirse el seguimiento de las lesiones cerebrales mediante MRI o el ensayo del líquido cerebroespinal (CSF) para la formación de bandas oligoclonales (OCB). La MRI es un método físico para evaluar las lesiones cerebrales y se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la MR. Sin embargo, típicamente ofrece únicamente un valor predictivo del muy largo plazo, y la correlación entre los resultados de la MRI y la actividad de la enfermedad puede ser reducida. De esta manera, la MRI, la OCB o cualquier otro ensayo existente no puede utilizarse para proyecciones a corto plazo del avance y nivel de actividad de la enfermedad o para el control de la misma.

35 [0006] La punción cerebroespinal es un procedimiento invasivo incómodo que no resulta adecuado para el uso rutinario o la prognosis. Además, ambos métodos evalúan daños sólo después de que se hayan producido; ningún método puede predecir la aparición de ataques o las lesiones subclínicas silenciosas. Una desventaja adicional de los métodos anteriormente indicados como modo para diagnosticar la MS es que una OCB o MRI negativa no descarta la existencia de la MS.

40 [0007] La mayoría de pacientes con MS inicialmente se presentan con un síndrome clínicamente aislado (CIS). A pesar del hecho de que la MS se desarrolla en hasta 80% de estos pacientes, el curso de la enfermedad y el tiempo hasta la conversión es impredecible en el momento de su aparición. La enfermedad podría permanecer inactiva durante muchos años antes de que la aparición de una segunda recaída clínica o nuevas lesiones en una MRI confirmasen el diagnóstico. Debido a que la terapia actualmente disponible sólo resulta parcialmente efectiva y los efectos secundarios son habitualmente, muchos neurólogos no saben si tratar todos los pacientes de este tipo con inmunomoduladores, o esperar hasta confirmar el diagnóstico a partir de un segundo suceso clínico o la aparición de nuevas lesiones en la MRI. Además, no debe utilizarse una terapia agresiva y potente aprobada debido a los efectos secundarios asociados a la terapia, a la falta de información sobre el curso de la enfermedad y/o al avance esperado de la enfermedad.

45 [0008] Existe una necesidad de un ensayo serológico simple que pueda predecir: i) si los pacientes en el momento de un primer suceso neurológico (FNE) o CIS sugerente de MS desarrollarán MS dentro de una determinada ventana de tiempo, ii) si una MS de recaída-remisión recién diagnosticada presentará un curso de la enfermedad más activo, que por lo tanto podría requerir un tratamiento agresivo, o iii) si el paciente de MS recién diagnosticado seguirá un curso relativamente benigno que permita al paciente posponer la terapia inmunomoduladora hasta que resulte necesaria. Este ensayo también resultaría útil para ayudar a diagnosticar, evaluar el avance de la MS y

controlar el tratamiento de la misma. Existe además una necesidad no satisfecha de desarrollo de biomarcadores específicos basados en suero para el diagnóstico y pronóstico de la MS de recaída-remisión (RRMS).

[0009] La patente WO nº 01/14881 describe la utilización de determinados anticuerpos como marcadores de la MS. Schwars et al., Glycobiology 13:749-754, 2003, describen una matriz de carbohidratos que puede utilizarse para detectar anticuerpos anti-carbohidrato.

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

[0010] La invención se basa en parte en el descubrimiento de que los pacientes de MS presentan niveles séricos más altos de anticuerpos IgM que se unen a las estructuras de glicano sintetizadas  $\text{Glc}(\alpha 1,2)\text{Glc}(\alpha)$  o  $\text{Glc}(\alpha 1,3)\text{Glc}(\alpha)$  o  $\text{Glc}(\alpha 1,6)\text{Glc}(\alpha)$  en comparación con los niveles séricos de estos anticuerpos en individuos con otras enfermedades neurológicas (tanto crónicas, inflamatorias como no inflamatorias). Los niveles de anticuerpos de tipo IgM de  $\text{Glc}(\alpha 1,6)\text{Glc}(\alpha)$  en suero solo o en combinación con anti- $\text{Glc}(\alpha 1,2)\text{Glc}(\alpha)$  o  $\text{Glc}(\alpha 1,3)\text{Glc}(\alpha)$  pueden actuar como diagnóstico de la enfermedad de MS, y como biomarcadores de estadificación y pronóstico para la presencia, severidad y actividad de la enfermedad de MS. Los niveles de los anticuerpos también pueden utilizarse para seleccionar el tratamiento apropiado y para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento.

[0011] La medición de los niveles de dichos anticuerpos en la sangre de pacientes que se sospecha que presentan MS facilita el diagnóstico precoz rápido y económico de los pacientes de MS, la predicción de la actividad de la enfermedad y, en el caso indicado, la prescripción temprana de fármacos modificadores de la enfermedad. El seguimiento de los niveles de dichos anticuerpos en la sangre de pacientes definidos de MS también permite un seguimiento rápido y económico de los efectos de los fármacos prescritos y la detección precoz de ataques o lesiones subclínicas silenciosas, proporcionando de esta manera un mejor tratamiento.

[0012] Entre las ventajas adicionales de la invención se encuentran que la existencia de MS en los pacientes puede determinarse en un estadio más temprano de la enfermedad, cuando sus síntomas pueden resultar similar a muchas otras enfermedades similares a la MS o cuando los síntomas todavía no son suficientes para realizar un diagnóstico definitivo de MS. El diagnóstico precoz permite a los médicos tratar la MS antes durante el curso de la enfermedad, minimizando o previniendo de esta manera los daños causados por la destrucción de la mielina y las discapacidades producidas por esta destrucción. Además, los métodos dados a conocer en la presente memoria permiten a los médicos realizar un seguimiento de los pacientes de MS periódicamente con el fin de evaluar la actividad de la enfermedad, para realizar un seguimiento de la terapia y para modificar el tratamiento tras aparecer indicios de ataques inminentes. Por ejemplo, un incremento de biomarcadores indicativos de un ataque de MS podría justificar la administración en el paciente de metilprednisona, un agente antiinflamatorio general administrado habitualmente durante los ataques.

[0013] En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar o evaluar la prognosis de esclerosis múltiple en un sujeto. El método incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto y detectar en la muestra de ensayo por lo menos un biomarcador que es un anticuerpo que se une específicamente a una estructura de glicano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,6)\text{Glc}(\alpha)$  solo o en combinación con anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,2)\text{Glc}(\alpha)$  y/o un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,3)\text{Glc}(\alpha)$ . Los niveles de anticuerpo o anticuerpos en la muestra de ensayo se comparan con una muestra de control, que se deriva de uno o más individuos que presenta síntomas de esclerosis múltiple y que presentan un estado de esclerosis múltiple conocido, o de un individuo o individuos que no muestran síntomas de esclerosis múltiple. El estatus de MS puede incluir, por ejemplo, exacerbaciones, ataques, remisiones, y etapas benignas, moderadas, malignas y estables de la enfermedad.

[0014] En diversas realizaciones, se detectan por lo menos 1, 2 ó 3 de dichos anticuerpos.

[0015] En algunas realizaciones, el método comprende además detectar uno o más anticuerpos adicionales. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc (incluyendo un anticuerpo IgM de  $\alpha$ -Glc), un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,4)\text{Glc}(\alpha)$  (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\text{Glc}(\alpha 1,4)\text{Glc}(\alpha)$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\alpha$ -GlcNAc), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcNAc, un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,4)\text{Glc}(\beta)$ , un anticuerpo anti- $\beta$ -Glc, un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal, un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\beta 1,4)\text{Glc}(\beta 1,4)\text{Glc}(\beta)$ , un anticuerpo anti- $\text{GlcNAc}(\beta 1,4)\text{GlcNAc}(\beta)$ , un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Araf, un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Rha, un anticuerpo anti-Gal-( $\beta 1,3$ )[GlcNAc( $\beta 1,6$ )]GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta 1,4$ )GlcNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta 1,3$ )GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta 1,3$ )GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcA y/o un anticuerpo anti- $\alpha$ -Xyl. En diversas realizaciones, se detectan por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 de dichos anticuerpos adicionales.

[0016] En algunas realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos que no muestran síntomas de una esclerosis múltiple y que no presentan esclerosis múltiple. En otras realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de una población que no muestra síntomas de una esclerosis múltiple y que no presenta múltiple esclerosis. En otras realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos con enfermedades neurológicas diferentes de la esclerosis múltiple. En otras realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos con enfermedades autoinmunitarias diferentes de la esclerosis múltiple.

[0017] La presencia de MS en la muestra de control puede determinarse utilizando técnicas conocidas de la técnica, por ejemplo el examen neurológico clínico, o una evaluación en la escala extendida del estado de discapacidad (EDSS), evaluación mediante MRI o ensayo para OCB en el CSF, o una combinación de algunas o todas dichas técnicas.

[0018] La muestra de ensayo puede ser, por ejemplo, un líquido biológico. Entre los ejemplos de líquidos biológicos se incluyen, por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, líquido de la médula espinal, orina, lágrimas o saliva.

- [0019] El sujeto puede ser una mujer o un hombre.
- [0020] El anticuerpo detectado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de tipo IgM, de tipo IgA o de tipo IgG.
- [0021] En algunas realizaciones, el tipo de esclerosis múltiple detectado es la esclerosis múltiple temprana.
- 5 [0022] La invención también proporciona un método de diagnóstico de una exacerbación de la esclerosis múltiple en un sujeto. El método incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto y detectar un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) o en combinación con un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) y/o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) en la muestra de ensayo. Los niveles del anticuerpo en la muestra de ensayo se comparan con una muestra de control, que se deriva de uno o más individuos cuyo estado de esclerosis múltiple es conocido.
- 10 [0023] En algunas realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos que no muestra síntomas de una exacerbación de esclerosis múltiple y cuyo estado de esclerosis múltiple es de remisión. Una exacerbación de esclerosis múltiple se diagnostica en el sujeto en el caso de que se encuentren presentes más de un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) y opcionalmente más de un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) y/o anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) en la muestra de ensayo que en la muestra de control. En otras realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos que muestra síntomas de una exacerbación de esclerosis múltiple, y se diagnostica una exacerbación de esclerosis múltiple en el sujeto en el caso de que los niveles de anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), y opcionalmente de anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o de anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) se encuentren presentes en cantidades similares en la muestra de ensayo y en la muestra de control.
- 15 [0024] La muestra de ensayo puede ser, por ejemplo, un líquido biológico. Entre los ejemplos de líquidos biológicos se incluyen, por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, líquido<sup>-</sup> de médula espinal, orina, lágrimas o saliva.
- 20 [0025] El sujeto puede ser una mujer o un hombre.
- [0026] El anticuerpo detectado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de tipo IgM, IgA o IgG.
- [0027] En algunas realizaciones, el diagnóstico es un diagnóstico precoz de exacerbación de esclerosis múltiple.
- [0028] En algunas realizaciones, el sujeto se ha tratado con un agente terapéutico de la MS, por ejemplo interferón beta o acetato de glatirámico administrado subcutáneamente.
- 25 [0029] También se encuentra comprendido dentro de la invención un método para evaluar la actividad de la enfermedad de la esclerosis múltiple en un sujeto. El método incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto y determinar si la muestra de ensayo contiene un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), solo o en combinación con un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ). La cantidad de anticuerpo en la muestra de ensayo se compara con la cantidad del anticuerpo en la muestra de control, que se deriva de uno o más individuos cuya actividad de enfermedad de esclerosis múltiple es conocida.
- 30 [0030] En algunas realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos cuya actividad de enfermedad de esclerosis múltiple se define mediante la escala extendida de estado de discapacidad (EDSS), cambios en la puntuación EDSS, frecuencia de las recaídas o una evaluación mediante MRI.
- 35 [0031] La muestra de ensayo puede ser, por ejemplo, un líquido biológico. Entre los ejemplos de líquidos biológicos se incluyen, por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, líquido de médula espinal, orinas, lágrimas o saliva. Si se desea, el método puede incluir además la selección de un agente terapéutico para tratar la esclerosis múltiple mediante la selección de un agente terapéutico y un régimen de dosificación basado en los niveles relativos del anticuerpo o anticuerpos en la muestra de ensayo y en la muestra de control.
- 40 [0032] En algunas realizaciones, niveles más altos de anticuerpos en la muestra de ensayo respecto a la muestra de control indican la selección de un agente terapéutico y el régimen de dosificación que es la administración subcutánea de interferón beta (BETA FERON®, AVONEX®, REBIF®), la administración subcutánea de acetato de glatirámico (COPAXONE®) o natalizumab (TYSABRI®).
- [0033] El sujeto puede ser una mujer o un hombre.
- 45 [0034] Se da a conocer además un método para seleccionar un agente terapéutico para tratar la esclerosis múltiple. El método incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto en el que se ha diagnosticado esclerosis múltiple, o que presenta el riesgo de sufrirla, y determinar si la muestra de ensayo contiene un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), solo o en combinación con un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ), o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ). Los niveles del anticuerpo en la muestra de ensayo se comparan con los niveles de anticuerpo en una muestra de control que consiste esencialmente de uno o más individuos cuya actividad de enfermedad de esclerosis múltiple es conocida. Un agente terapéutico y un régimen de dosificación se seleccionan basándose en los niveles relativos de anticuerpo en la muestra de ensayo y en la muestra de control.
- 50 [0035] En algunas realizaciones, el método incluye además determinar si la muestra de ensayo contiene un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) solo o en combinación con un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) y comparar los niveles del anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) en la muestra de ensayo en comparación con los niveles de anticuerpo en una muestra de control que consiste esencialmente de uno o más individuos cuya severidad de la enfermedad de la esclerosis múltiple es conocida.
- 55 [0036] En algunas realizaciones, la muestra de control consiste esencialmente de uno o más individuos cuyo estado es ausencia de esclerosis múltiple o esclerosis múltiple estable.
- 60 [0037] Se da a conocer además un método para predecir si los pacientes con un CIS sugerente de MS o MS de recaída-remisión recién diagnosticada presentará un curso de la enfermedad altamente activo y por lo tanto requerirá un tratamiento agresivo, o si seguirá un curso más benigno que permita que dichos pacientes pospongan la terapia inmunomoduladora hasta que resulte necesaria.
- 65 [0038] El método incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto en el que se ha diagnosticado esclerosis múltiple, o que presenta el riesgo de sufrirla, y determinar si la muestra de ensayo con-tiene anticuerpo anti-

Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), solo o en combinación con anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ). Los niveles del anticuerpo en la muestra de ensayo se comparan con los niveles de anticuerpo en una muestra de control que consiste esencialmente de uno o más individuos cuya actividad y curso de enfermedad de esclerosis múltiple son conocidas. Se seleccionan un agente terapéutico y un régimen de dosificación basándose en los niveles relativos de anticuerpo en la muestra del sujeto y anticuerpo en la muestra de control.

**[0039]** La invención también proporciona un kit para el diagnóstico y la predicción de la actividad de la enfermedad asociado a múltiple esclerosis. El kit incluye un primer reactivo que detecta específicamente el anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), y opcionalmente también un reactivo que detecta específicamente un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ), y un segundo reactivo que detecta específicamente un segundo anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\alpha$ -Glc), un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) (incluyendo un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ )), un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\alpha$ -GlcNAc), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcNAc, un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -Glc, un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal, un anticuerpo anti-Glc( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti-GlcNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Araf, un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Rha, un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)[GlcNAc( $\beta$ 1,6)GalNAc( $\alpha$ )], un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcA y un anticuerpo anti- $\alpha$ -Xyl. El kit puede incluir uno o todos los agentes, e instrucciones para utilizar el kit. El kit opcionalmente incluye un reactivo que detecta específicamente un anticuerpo de tipo IgM.

**[0040]** Se dan a conocer adicionalmente sustratos que incluyen reactivos que detectan específicamente los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria, por ejemplo un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), y opcionalmente un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ), o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ). La invención también incluye reactivos que detectan específicamente anticuerpos utilizados en combinación con los anticuerpos dados a conocer anteriormente, por ejemplo un anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\alpha$ -Glc), un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) (incluyendo un anticuerpo IgM anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ )), un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\alpha$ -GlcNAc), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcNAc, un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -Glc, un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal, un anticuerpo anti-Glc( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti-GlcNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Araf, un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Rha, un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)[GlcNAc( $\beta$ 1,6)GalNAc( $\alpha$ )], un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcA o un anticuerpo anti- $\alpha$ -Xyl. El sustrato puede ser, por ejemplo, plano. En un aspecto adicional, los reactivos pueden conectarse con un sustrato mediante una molécula conectora.

**[0041]** Se dan a conocer además reactivos para diagnosticar y predecir la actividad de enfermedad asociada a la esclerosis múltiple, que detecta específicamente uno o más de entre un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), y opcionalmente también un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ). En un aspecto adicional, los reactivos pueden conectarse a un sustrato mediante una molécula conectora. El sustrato puede ser una partícula perla o un sustrato plano.

**[0042]** En algunas realizaciones, los reactivos que se utilizan para unirse específicamente y detectar dichos anticuerpos anti-glicano son las estructuras de glicano específicas. En otras realizaciones, los reactivos son otras moléculas que incluyen las estructuras de glicano específicas. Las estructuras de glicano o de otro sacárido pueden ser el único grupo carbohidrato (incluyendo monosacáridos, un oligosacárido o un polisacárido), o encontrarse expuesto en cualquier fase sólida u otra macromolécula, o cualquier otra estructura molecular que incluya el glicano. La estructura que contiene el glicano puede ser natural, por ejemplo extraída de un organismo, o sintética.

**[0043]** Por ejemplo, el anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) puede detectarse utilizando un polímero de estas unidades sacáridas conectadas con uno o más enlaces glucosídicos Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ). En otro ejemplo, el anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) o anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) se detecta utilizando el polisacárido dextrano como antígeno. El dextrano es un polímero de unidades sacáridas conectadas con uno o más enlaces glucosídicos Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) con algunas ramas Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ). En un ejemplo adicional, se detecta un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) utilizando el lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* que contiene el elemento estructural Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ).

**[0044]** En algunas realizaciones, los reactivos que se utilizan para unirse específicamente y detectar los anticuerpos anti-glicano de la invención son péptidos que imitan los antígenos carbohidrato de la invención. Los péptidos pueden utilizarse para identificar los anticuerpos anti-glicano específicos.

**[0045]** En algunas realizaciones, los péptidos que imitan los carbohidratos especificados de la presente invención pueden utilizarse para la identificación de los anticuerpos anti-glicano específicos.

**[0046]** En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para identificar un sujeto con un primer suceso neurológico (FNE) que es probable que progrese a esclerosis múltiple de recaída-remisión (RRMS). El método incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto con un FNE y detectar en la muestra de ensayo uno o más anticuerpos anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) (GAGA6), y opcionalmente también un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) (GAGA4). Los niveles del anticuerpo o anticuerpos en la muestra de ensayo se comparan con una muestra de control cuyo estado de RRMS es conocido, identificando de esta manera un sujeto de FFNE que es probable que progrese a RRMS.

**[0047]** En algunas realizaciones, el sujeto con un FNE presenta síntomas de un síndrome clínicamente aislado (CIS).

**[0048]** En algunas realizaciones, el método comprende detectar un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) y un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ).

**[0049]** En algunas realizaciones, la muestra de ensayo consiste esencialmente de una población de uno o más individuos que no muestran RRMS, y se identifica que el sujeto es probable que progrese a RRMS en el caso de que

se encuentre presente por lo menos un anticuerpo a niveles más altos en la muestra de ensayo que en la muestra de control.

**[0050]** En algunas realizaciones, la muestra de control incluye sujetos con otra enfermedad neurológica (OND).

5 **[0051]** En algunas realizaciones, la muestra de ensayo es un líquido biológico. El líquido biológico puede ser, por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, líquido de médula espinal, orina, lágrimas o saliva.

**[0052]** En algunas realizaciones, el sujeto es una mujer. En otras realizaciones, el sujeto es un hombre.

**[0053]** En algunas realizaciones, por lo menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo de tipo IgM. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo de Glc(α1,4)Glc(α) y el anticuerpo anti-Glc(α1,6)Glc(α) son anticuerpos de tipo IgM.

10 **[0054]** En algunas realizaciones, el método incluye además calcular un valor del índice para el sujeto utilizando un algoritmo basado en el nivel de por lo menos un marcador, e identificar un sujeto con FNE que probablemente progrese a RRMS según el valor del índice.

**[0055]** En algunas realizaciones, se detecta el anticuerpo utilizando un glicano que contiene un enlace Glc(α1,4)Glc(α) (GAGA4) o Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6).

15 **[0056]** En algunas realizaciones, el anticuerpo se detecta utilizando un oligosacárido que incluye un glicano que contiene un enlace Glc(α1,4)Glc(α) (GAGA4) o Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6).

**[0057]** En algunas realizaciones, el anticuerpo se detecta utilizando un polímero que incluye un glicano que contiene un enlace Glc(α1,4)Glc(α) (GAGA4) o Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6). El polímero puede ser, por ejemplo, un polisacárido, y puede ser un polímero natural o un polímero sintético.

20 **[0058]** En una realización preferente, la invención proporciona un método para identificar un sujeto con un primer suceso neurológico (FNE) que es probable que progrese a esclerosis múltiple de recaída-remisión (RRMS). El método incluye proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto con un FNE, detectar en la muestra de ensayo un anticuerpo anti-Glc(α1,4)Glc(α) (GAGA4), y un anticuerpo IgM anti-Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6), y comparar los niveles de los anticuerpos en la muestra de ensayo con los de una muestra de control que es conocido que presenta RRMS. Un nivel elevado de los anticuerpos en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control indica que el sujeto del FNE es probable que progrese a una RRMS.

25 **[0059]** En otro aspecto, la invención proporciona una composición purificada que comprende una molécula que contiene glicanos, que es un glicano que contiene Glc(α1,2)Glc(α), un glicano que contiene Glc(α1,3)Glc(α) y un glicano que contiene Glc(α1,6)Glc(α), y opcionalmente un glicano que contiene α-GlcNAc. En algunas realizaciones, se proporcionan tres, o la totalidad de los cuatro glicanos anteriormente indicados en una única composición en forma de pluralidad de glicanos.

**[0060]** En algunas realizaciones, la composición incluye además un glicano que contiene Glc(α1,4)Glc(α).

**[0061]** En algunas realizaciones, la molécula que contiene glicano se proporciona en un oligosacárido que comprende, por ejemplo, 2 a 20, 2 a 18, 3 a 15 ó 5 a 12 monosacáridos.

35 **[0062]** En algunas realizaciones, se encuentra presente por lo menos una de las moléculas que contiene glicano en un polisacárido.

**[0063]** En algunas realizaciones, la molécula que contiene glicanos se inmoviliza sobre un sustrato sólido.

40 **[0064]** A menos que se indique lo contrario, todas las expresiones técnicas y científicas utilizadas en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden utilizarse en la práctica o ensayo de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos indicados en la presente memoria, se indican posteriormente métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria, incluyendo definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no se pretende que sean limitativos.

45 **[0065]** Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y reivindicaciones siguientes.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0066]**

50 La Fig. 1 es un gráfico que muestra las curvas características de receptor- operador (ROC) para la diferenciación entre pacientes de MS y de OND utilizando los niveles de anticuerpos IgM contra Glc(α1,2)Glc(α) - (Ga2Ga), Glc(α1,3)Glc(α) - Ga3Ga, Glc(α1,6)Glc(α) - Ga6Ga, Glc(α1,4)Glc(α) - Ga4Ga, α-Glc - Ga y α-GlcNAc - GNa.

55 La Fig. 2 es un dibujo esquemático que muestra una línea temporal para una secuencia de sucesos asociada a la presentación y diagnóstico iniciales de esclerosis múltiple en un sujeto.

60 Las Figs. 3A-C son dibujos que muestran los niveles de IgM anti-GAGA6 (Fig. 3A), anti-GAGA4 (Fig. 3B) y anti-GNA en pacientes que han adquirido RRMS y en pacientes que han adquirido OIND y ONIND (Fig. 3C).

La Fig. 4 es un gráfico que muestra una comparación entre los niveles de anti-GAGA4 y anti-GAGA6 en pacientes que han adquirido RRMS y en pacientes que han adquirido OND. Las líneas representan valores de corte.

Las Figs. 5A-b son curvas ROC para diferenciar según anti-GAGA4 (Fig. 5A) y anti-GNa entre pacientes que han adquirido RRMS y han sufrido una segunda recaída dentro de los 2 años posteriores, y pacientes que han adquirido RRMS pero no han sufrido un segundo ataque dentro de los 2 años posteriores (Fig. 5B).

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0067]** Los métodos proporcionados en la presente memoria permiten el diagnóstico precoz de esclerosis múltiple inicial y recurrente, así como la predicción de la actividad de la enfermedad de MS (benigna, moderada y maligna), utilizando niveles de biomarcador evaluados objetivamente.

**[0068]** Un paciente con empeoramiento agudo de la función neurológico debe ser diagnosticado como paciente de MS definido antes de ser elegible para el tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad. El médico deberá determinar si el paciente presenta síntomas de tipo MS (tales como ictus en pacientes jóvenes, lupus, deficiencia de vitamina B-12, síndrome anti-fosfolípido, migraña severa) o si de hecho presenta MS. El paciente deberá experimentar un segundo empeoramiento agudo de la función neurológica (ataque) para que se le diagnostique una MS y pueda iniciar el tratamiento crónica con un agente terapéutico de la MS, tal como interferón beta o acetato de glatirámico.

**[0069]** En la actualidad, los médicos utilizan la MRI para la identificación de la existencia de lesiones cerebrales y/o para someter a ensayo líquido cerebroespinal (CSF) para bandas oligoclonales (OCB). Si la MRI proporciona un resultado claro respecto a la existencia de lesiones cerebrales o la presencia de OCB en el CSF, el médico debe iniciar el tratamiento inmediatamente con el fin de prevenir lesiones cerebrales silenciosas. El diagnóstico de MS completa en la actualidad se realiza sólo después del segundo ataque o la aparición de un nuevo resultado de la MRI con diseminación en el tiempo y el espacio. En el caso de que la MRI no proporcione un resultado claro o no se aprecien OCB en el CSF del paciente, no se diagnostica MS y se retrasa el tratamiento hasta después de un segundo ataque (McDonald et al., Ann. Neurol. 50:121-27, 2001).

**[0070]** La mayoría de pacientes con MS se presentan inicialmente con un síndrome clínicamente aislado (CIS). A pesar del hecho de que la MS se desarrollará hasta en 80% de estos pacientes, el curso de la enfermedad es impredecible en el momento de su aparición. La enfermedad puede permanecer inactiva durante muchos años antes de que aparezca una segunda recaída clínica o nuevas lesiones en la MRI confirmen el diagnóstico. Debido a que la terapia disponible actualmente sólo resulta parcialmente efectiva y los efectos secundarios son comunes, muchos neurólogos no pueden determinar si tratar dichos pacientes con inmunomoduladores, o esperar hasta confirmar el diagnóstico a partir de un segundo suceso clínico o la aparición de Nuevas lesiones en la MRI. La presente invención proporciona un ensayo serológico simple para predecir si los pacientes con un CIS que sugiera MS o ms de recaída-remisión recién diagnosticado presentará un curso de enfermedad altamente activo y por lo tanto requerirá un tratamiento agresivo, o si seguirá un curso más benigno que permita a dichos pacientes posponer la terapia inmunomoduladora hasta que resulte necesaria. Este ensayo también resulta útil para ayudar a diagnosticar la MS.

**[0071]** Los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden ponerse en práctica mediante la extracción de sangre de un paciente con empeoramiento agudo de la función neurológica y que se sospeche que presenta MS o que ya es un paciente de RRMS definitiva. El método puede identificar la existencia de MS y predecir el curso futuro de la enfermedad mediante la medición de los niveles de anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), y opcionalmente de anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o de anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ). En el caso de que el nivel de por lo menos uno de dichos anticuerpos sea significativamente superior al nivel medio de dichos anticuerpos en sueros de individuos sanos, de pacientes con enfermedades neurológicas aparte de la MS, o de pacientes con enfermedades autoinmunitarias aparte de la MS, se diagnostica que el paciente presenta una MS sin necesidad de esperar a un segundo ataque o a resultados adicionales de la MRI. Además, el diagnóstico rápido permite iniciar el tratamiento inmediatamente.

**[0072]** El cribado de la sangre del paciente y la determinación del nivel de biomarcadores dados a conocer en la presente memoria, por ejemplo anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) y opcionalmente de anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) o anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ), permite realizar un seguimiento exacto de la terapia. Por ejemplo, una primera línea de tratamiento para la MS es el interferón  $\beta$  (por ejemplo INF $\beta$ -1 e INF $\beta$ -1b). La evaluación actual de la efectividad y dosis requerida del fármaco se basa en el seguimiento continuo de varias puntuaciones clínicas. En la actualidad, la puntuación EDSS y su cambio durante el tiempo (por ejemplo mediante la comparación entre las diferencias de EDSS cada 3 a 6 meses) es el parámetro clínico principal para el control de la enfermedad. Un componente importante de la evaluación es el nivel de fatiga y depresión experimentado por el paciente. La fatiga y/o depresión puede ser un síntoma de la MS, al igual que de una enfermedad autoinmunitaria, o un efecto secundario de la utilización de IFN $\beta$ . La identificación de la causa de la fatiga resulta importante para el control del tratamiento. Por ejemplo, en el caso de que la fatiga sea un resultado de un efecto secundario del interferón, el médico considerará la posibilidad de reducir la dosis o incluso de cambiarlo por otro fármaco. Sin embargo, en el caso de que la fatiga se deba a los síntomas de la MS, el médico deberá considerar la posibilidad de incrementar la dosis de fármaco. Las reducciones significativas de los niveles de anticuerpos indican que el paciente responde bien al fármaco administrado.

**[0073]** En la actualidad no existe ningún modo de predecir la aparición de ataques y lesiones subclínicas silenciosas en los pacientes de MS. La MRI y la evaluación clínica de los pacientes únicamente puede revelar daños que ya se han producido. La medición periódica del nivel de unos cuantos anticuerpos anti-glicano (por ejemplo del anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), y opcionalmente del anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y/o del anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ )) en la sangre del paciente según el método descrito en la presente memoria permite al médico predecir la actividad

futura de la enfermedad (por ejemplo la frecuencia de los ataques clínicos y la aparición de lesiones subclínicas silenciosas en la MRI) basándose en un incremento en los niveles de dichos anticuerpos.

**[0074]** Todas las estructuras de glicano que se comentan en la presente exposición, a menos que se indique lo contrario, se encuentran conectadas en la anomericidad  $\alpha$  o  $\beta$  indicada mediante una molécula conectora a la fase sólida.

**[0075]** En algunas realizaciones pueden utilizarse péptidos que imitan los glicanos específicos de la presente invención para la identificación de los anticuerpos anti-glicano específicos. Los péptidos que imitan carbohidratos pueden identificarse mediante, por ejemplo, cribado de una biblioteca de péptidos aleatorios de expresión de fago filamentoso (Zhan et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:19-22, 2003; Hou et al., *J. Immunol.* 170:4373-79, 2003).

**[0076]** La mayoría de pacientes con MS inicialmente se presentan con un síndrome clínicamente aislado (CIS). A pesar del hecho de que la MS clínicamente definida se desarrolla en hasta 80% de estos pacientes, el curso de la enfermedad es impredecible en el momento de su aparición. La enfermedad puede permanecer inactiva durante muchos años antes de que la aparición de una segunda recaída clínica o nuevas lesiones en la MRI confirmen el diagnóstico. Debido a que la terapia actualmente disponible sólo resulta parcialmente efectiva y los efectos secundarios son comunes, muchos neurólogos no pueden establecer si tratar todos los pacientes de este tipo con inmunomoduladores, o esperar hasta la confirmación del diagnóstico a partir de un segundo suceso clínico o la aparición de nuevas lesiones en la MRI.

**[0077]** La invención proporciona un ensayo serológico simple que puede utilizarse para predecir si los pacientes con un CIS sugerente MS o MS de recaída-remisión recién diagnosticado presentará un curso de enfermedad altamente activa, y por lo tanto requerirá un tratamiento agresivo, o si seguirá un curso más benigno que permita posponer para estos pacientes la terapia inmunomoduladora hasta que resulte necesaria.

**[0078]** La invención proporciona además un ensayo serológico simple para la confirmación definitiva de la MS y del nivel de riesgo en individuos que presentan un suceso de desmielinización aguda primaria. El noventa por ciento de los pacientes con MS inicialmente presente con un síndrome clínicamente aislado debido a una lesión desmielinizante inflamatoria en el nervio óptico, tallo cerebral o médula espinal (O'Riordan et al., *Brain* 121:495-503, 1998). El treinta por ciento de estos pacientes con síndrome clínicamente aislado progresarán a una MS definitiva dentro de los 12 meses posteriores a la presentación (Brex et al., *N. Engl. J. Med.* 346:158-164, 2002; O'Riordan et al., *Brain* 121:495-503, 1998; Jacobs et al., *Ann. Neurol.* 41:392-98, 1997), pero no más del 80% de los pacientes con un suceso clínicamente primario desarrollarán una MS clínicamente definitiva (Weinshenker et al., *Brain* 112:1419-28, 1989). De esta manera, resulta deseable confirmar y estadificar inequívocamente la MS para iniciar el tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad.

**[0079]** Los métodos pueden utilizarse para determinar si está justificado un régimen de tratamiento particular de la MS para un paciente particular. A los pacientes de alto riesgo de progresión rápida hasta una MS definitiva se les pueden ofrecer tratamientos modificadores de la enfermedad que resultan beneficiosos en la esclerosis múltiple temprana (Comi et al., *Lancet* 351:1576-82, 2001; Jacobs et al., *N. Engl. J. Med.* 343:898-904, 2000). Por otra parte, para los pacientes de bajo riesgo y para los que existe la probabilidad de seguir sin recaídas durante varios años tras un suceso inicial de desmielinización, puede posponerse la terapia inmunomoduladora hasta que resulte necesaria. De esta manera, una ventaja de la invención es un mejor control de la enfermedad en una etapa temprana de la misma.

**[0080]** La presencia de anticuerpos contra  $\text{Glc}(\alpha 1,6)\text{Glc}(\alpha)$ , y opcionalmente también de anticuerpos contra  $\text{Glc}(\alpha 1,3)\text{Glc}(\alpha)$  y/o  $\text{Glc}(\alpha 1,2)\text{Glc}(\alpha)$  pueden combinarse con otros ensayos diagnósticos para diagnosticar la esclerosis múltiple. Uno de dichos ensayos son los anticuerpos asociados a la MS que se dan a conocer en las patentes WO n° 2004/015420 y US n° 2004/07702. Entre estos anticuerpos se incluyen, por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\alpha$ -Glc), un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,4)\text{Glc}(\alpha)$  (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\text{Glc}(\alpha 1,4)\text{Glc}(\alpha)$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNac (incluyendo un anticuerpo IgM anti- $\alpha$ -GlcNac), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcNac, un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,4)\text{Glc}(\beta)$ , un anticuerpo anti- $\beta$ -Glc, un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal, un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\beta 1,4)\text{Glc}(\beta 1,4)\text{Glc}(\beta)$ , un anticuerpo anti- $\text{GlcNac}(\beta 1,4)\text{GlcNac}(\beta)$ , un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Araf, un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Rha, un anticuerpo anti-Gal( $\beta 1,3$ )[ $\text{GlcNac}(\beta 1,6)$ ]GalNac( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta 1,4$ )GlcNac( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta 1,3$ )GalNac( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta 1,3$ )GlcNac( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcA o un anticuerpo anti- $\alpha$ -Xyl.

**[0081]** Los métodos típicamente se llevan a cabo utilizando reactivos que se unen específicamente a los anticuerpos anti-glicano. Los reactivos pueden ser, por ejemplo, las estructuras de glicano específicas. Alternativamente, los reactivos pueden ser otras moléculas o macromoléculas que incluyen la estructura de glicano específica.

**[0082]** En algunas realizaciones, los reactivos que se utilizan para unirse y detectar específicamente dichos anticuerpos anti-glicanos son las estructuras de glicano específicas. En otras realizaciones, los reactivos son otras moléculas que incluyen la estructura de glicano específica. Las estructuras de glicano o sacáridos únicamente pueden ser el grupo carbohidrato (incluyendo monosacáridos, un oligosacárido o un polisacárido) o, expuestas sobre cualquier fase sólida u otra macromolécula, o cualquier otra estructura molecular que incluya el glicano. La estructura que contiene el glicano puede ser natural, por ejemplo extraída de un organismo, o ser natural. Por ejemplo, el anticuerpo de  $\text{Glc}(\alpha 1,2)\text{Glc}(\alpha)$  puede detectarse utilizando un polisacárido que incluya un polímero con uno o más enlaces  $\text{Glc}(\alpha 1,2)\text{Glc}(\alpha)$ .

**[0083]** En otro ejemplo, el anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,6)\text{Glc}(\alpha)$  o anti- $\text{Glc}(\alpha 1,3)\text{Glc}(\alpha)$  se detecta utilizando el polisacárido dextrano como antígeno. El dextrano es un polímero de unidades sacáridas conectadas con uno o más enlaces glucosídicos  $\text{Glc}(\alpha 1,6)\text{Glc}(\alpha)$  con algunas ramas  $\text{Glc}(\alpha 1,3)\text{Glc}(\alpha)$ . Además, se detecta un anticuerpo anti- $\text{Glc}(\alpha 1,4)\text{Glc}(\alpha)$  utilizando el lipopolisacárido de *Salmonella typhimurium* que contiene el elemento estructural



Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) (Holme et al., Carbohydr. Res. 8:43-55, 1968) (ver también la solicitud publicada de patente US nº 2004/0241763 (especialmente la figura 11B, y la Tabla 5 de la solicitud)), que muestra que los anticuerpos contra Glc(1,4)Glc( $\alpha$ ) purificados a partir de sueros de pacientes con MS reaccionan con el lipopolisacárido procedente del lipopolisacárido de Salmonella typhimurium.

**[0084]** De esta manera, puede utilizarse el glicano mismo para detectar el anticuerpo o anticuerpos correspondientes, al igual que cualquier otra estructura molecular que incluya el glicano.

**[0085]** Si se desea, los péptidos que imitan antígenos carbohidrato pueden utilizarse en los métodos y composiciones indicados en la presente memoria. Los péptidos pueden utilizarse para identificar anticuerpos anti-glicano específicos. Los péptidos que imitan estructuras reconocidas por los anticuerpos anti-glicano pueden identificarse utilizando métodos conocidos de la técnica, por ejemplo mediante cribado de una biblioteca de péptidos aleatorias de expresión de un fago filamentoso (Zhan et al., Bio-chem. Biophys. Res. Commun. 308:19-22, 2003; Hou et al., J. Immunol. 17:4373-79, 2003).

**[0086]** Los antígenos glicanos utilizados para identificar diversos anticuerpos anti-glicano pueden obtenerse a partir de una diversidad de otras fuentes con la condición de que el antígeno sea capaz de unirse específicamente al anti-glicano dado. La unión a anticuerpos anti-glicano puede llevarse a cabo utilizando una diversidad de otros formatos de inmunoensayo conocidos de la técnica, entre ellos también pueden utilizarse formatos de inmunoensayo competitivos y no competitivos (Self y Cook, Curr. Opin. Biotechnol. 7:60-65, 1996, que se incorpora como referencia). Entre otros ensayos se incluyen inmunoensayos, tales como ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISAs). Puede unirse un enzima tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la  $\beta$ -galactosidasa o la ureasa, a un anticuerpo secundario selectivo para un anticuerpo anti-glicano primario de interés. Puede utilizarse un sistema de detección con peroxidasa de rábano picante, por ejemplo con el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB), que rinde un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que resulta detectable a 450 nm. Puede utilizarse un sistema de detección de fosfatasa alcalina con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenilo, por ejemplo, que rinde un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, puede utilizarse un sistema de detección de  $\beta$ -galactosidasa con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (ONPG), que rinde un producto soluble detectable a 410 nm, o puede utilizarse un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como violeta urea-bromocresol (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO.). Puede obtenerse un anticuerpo secundario útil ligado a un enzima a partir de varias fuentes comerciales; la F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana-fosfatasa alcalina, por ejemplo, puede obtenerse de Jackson Immuno-Research (West Grove, Pa.).

**[0087]** Los inmunoensayos comprenden los inmunoensayos basados en la electroforesis capilar (CEIA), y pueden automatizarse, si se desea. También pueden utilizarse inmunoensayos conjuntamente con fluorescencia inducida por láser (ver, por ejemplo, Schmalzing y Nashabeh, Electrophoresis 18:2184-93, 1997; Bao, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. 699:463-809, 1997, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria). También pueden utilizarse inmunoensayos de liposomas, tales como los inmunoensayos de liposomas por inyección en flujo y los inmunosensores de liposomas (Rongen et al., J. Immunol. Methods 204:105-133, 1997).

**[0088]** También puede utilizarse un radioinmunoensayo para determinar si una muestra es positiva para un anticuerpo de glicano o para determinar el nivel de anticuerpos anti-glicano en una muestra. Un radioinmunoensayo que utiliza, por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado con yodo-125 (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory: New York, 1988, que se incorpora como referencia en la presente memoria) se encuentra comprendido dentro de la invención.

**[0089]** Un anticuerpo secundario puede alternativamente marcarse con un marcador quimioluminiscente. Dicho anticuerpo secundario quimioluminiscente resulta conveniente para la detección no radioactiva sensible de anticuerpos anti-glicano y puede obtenerse comercialmente de diversas fuentes, tales como Amersham Lifesciences, Inc. (Arlington Heights, Ill.).

**[0090]** También puede marcarse un reactivo detectable con un fluorocromo. Entre los fluorocromos apropiados se incluyen, por ejemplo, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, ficocianina R, ficoeritrina B, ficoeritrina R, rodamina, rojo de Texas o lisamina. Un fluorocromo particularmente útil es la fluoresceína o la rodamina. Los anticuerpos secundarios ligados a fluorocromos pueden obtenerse comercialmente. Por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humana-FITC se encuentra disponible de Tago Immunologicals (Burlingame, Calif.).

**[0091]** Puede analizarse una señal procedente del reactivo detectable, por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gamma para la detección de yodo-125, o un fluorímetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz de una determinada longitud de onda. Para la detección de reactivos ligados a enzima, puede realizarse un análisis cuantitativo de la cantidad de anticuerpos anti-glicano utilizando un espectrofotómetro, tal como un lector de microplacas EMAX (Molecular Devices, Menlo Park, Calif.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la invención pueden automatizarse o llevarse a cabo robóticamente, y detectarse simultáneamente la señal de múltiples muestras.

**[0092]** Entre otros métodos se incluyen, por ejemplo, la citometría de flujo (incluyendo los inmunoensayos basados en perlas) y la tecnología de expresión fágica para expresar un antígeno recombinante específicos para un anticuerpo anti-glicano. Las partículas fágicas que expresan el antígeno específico para un anticuerpo anti-glicano pueden anclarse, si se desea, a una placa multipocillo utilizando un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal anti-fago (Felici et al., "Phage-Displayed Peptides as Tools for Characterization of Human Sera", en: Abelson (editor), Methods in Enzymol. 267, San Diego, Academic Press, Inc., 1996, que se incorpora como referencia en la presente memoria).

### Interpretación de los datos de unión a anticuerpos anti-glicano

[0093] Típicamente se compara la unión de anticuerpos anti-glicano en una muestra a una población de referencia, y se comparan las diferencias en los niveles de los anticuerpos anti-glicano en las dos muestras. El umbral para determinar si una muestra de ensayo se puntúa como positiva basándose en su perfil de anticuerpos anti-glicano puede modificarse dependiendo de la sensibilidad o especificidad deseada. Los parámetros clínicos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y eficiencia se calculan utilizando positivos verdaderos, falsos positivos, falsos negativos y negativos verdaderos. Una muestra "positiva verdadera" es una muestra positiva para MS según métodos reconocidos por la técnica para el diagnóstico de la MS, la RRMS, etc., que también se diagnostica como positiva según un método de la invención. Una muestra "falsa positiva" es una muestra negativa según método reconocido de la técnica, que se diagnostica como positiva según un método de la invención. De manera similar, un "falso negativo" es una muestra positiva para un análisis reconocido de la técnica, que se diagnostica como negativo según un método de la invención. Un "negativo verdadero" es una muestra negativa para la característica evaluada por un método reconocido de la técnica, y también negativo según un método de la invención (ver, por ejemplo, Mousy (editor), *Intuitive Biostatistics*, New York, Oxford University Press, 1995, que se incorpora como referencia en la presente memoria).

[0094] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sensibilidad" se refiere a la probabilidad de que un método de laboratorio sea positivo en presencia de la característica medida. La sensibilidad se calcula como el número de resultados positivos verdaderos dividido por la suma de los positivos verdaderos y los falsos negativos. La sensibilidad es esencialmente una medida del grado en que un método identifica correctamente aquellas personas que presentan la enfermedad. En un método de la invención, los valores de anticuerpo anti-glicano pueden seleccionarse de manera que la sensibilidad de diagnóstico de un individuo sea de por lo menos aproximadamente 60%, y puede ser, por ejemplo, de por lo menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95%.

[0095] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "especificidad" se refiere a la probabilidad de un método sea negativo en ausencia de la característica medida. La especificidad se calcula como el número de resultados negativos verdaderos dividido por la suma de los negativos verdaderos y los falsos positivos. La especificidad es esencialmente una medida del grado en que un método excluye aquellos que no presentan la característica medida. El valor de corte de anti-glicano puede seleccionarse de manera que, en el caso de que la sensibilidad sea de por lo menos aproximadamente 70%, la especificidad de diagnosticar un individuo se encuentre comprendida en el intervalo de entre 30% y 60%, por ejemplo entre 35% y 60%, entre 40% y 60%, entre 45% y 60% o entre 50% y 60%.

[0096] La expresión "valor predictivo positivo", tal como se utiliza en la presente memoria, es sinónima de "PPV" y se refiere a la probabilidad de que un individuo que se ha diagnosticado que presenta la característica medida presente la enfermedad. Puede calcularse un valor predictivo positivo como el número de positivos verdaderos dividido por la suma de los positivos verdaderos y los falsos positivos. El valor predictivo positivo se determina a partir de las características del método diagnóstico, así como la prevalencia de la enfermedad en la población analizada. En un método de la invención, los valores de corte de anticuerpo anti-glicano pueden seleccionarse de manera que el valor predictivo positivo del método en una población que presenta una prevalencia de la enfermedad del 15% sea de por lo menos aproximadamente 5%, y puede ser, por ejemplo, de por lo menos aproximadamente 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% ó 40%.

[0097] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "eficiencia" se refiere a la exactitud con la que un método diagnostica un estado de enfermedad. La eficiencia se calcula como la suma de los positivos verdaderos y los negativos verdaderos dividido por el número total de resultados de muestras y resulta afectada por la prevalencia de la característica en la población analizada. Los valores de corte de anticuerpo anti-glicano pueden seleccionarse de manera que la eficiencia de un método de la invención en una población de pacientes que presenta una prevalencia de la enfermedad de la MS de 15% sea de por lo menos aproximadamente 45%, y puede ser de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 50%, 55% ó 60%.

[0098] La invención se ilustra en los ejemplos no limitativos siguientes.

**Ejemplo 1. Se observan niveles más altos de anticuerpos IgM anti-Glc(α1,2)Glc(α), anti-Glc(α1,3)Glc(α) y anti-Glc(α1,6)Glc(α) en sueros de pacientes de MS que en pacientes de OND**

### Reclutamiento de pacientes

[0099] Ciento quince (115) pacientes externos de entre 18 y 55 años de edad con MS clínicamente definida y con apoyo de laboratorio, según los criterios de Poser (Poser et al., *Ann. Neurol.* 13:227-231, 1983), eran elegibles para el estudio. Los criterios de inclusión de los pacientes con RRMS eran una historia de por lo menos dos recaídas claramente identificadas y documentadas en los 2 años anteriores a la entrada en el estudio, y ser ambulatorios, definido por una escala extendida de estado de discapacidad de Kurtzke (EDSS) (Kurtzke, *Neurology* 33:1444-1452, 1983) de 0 a 6,5. Se definió la recaída como la aparición o reaparición de una o más anomalías neurológicas que persistían durante por lo menos 24 horas, y que habían estado precedidas por como mínimo 30 días de estado neurológico estable o mejorado. Los criterios de exclusión eran el tratamiento de corticosteroides en los 3 meses anteriores, la terapia inmunosupresora anterior con actividad citotóxica o irradiación linfóide, así como el embarazo o la lactancia. Se obtuvieron las firmas de los consentimientos informados de los pacientes y el estudio fue aprobado por el comité de ética del Lady Davis, Carmel Medical Center, Israel y por el comité de ética del Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israel.

[0100] Se obtuvieron sueros de 60 pacientes afectados de otra enfermedad neurológica (OND) del Genomics Collaborative, MA, USA, o bajo consentimiento informado de pacientes admitidos a la unidad de neuroinmunología del Carmel Medical Center, Israel.

5 [0101] Las muestras de sangre se recogieron en tubos evacuados recubiertos de silicio que contenían gel para la separación de suero y coágulo sanguíneo (Estar Technologies, Israel). Tras la coagulación de la sangre, se separó el suero mediante centrifugación, se recogió y se mantuvo congelado a -25°C hasta su utilización. Las evaluaciones de laboratorio se llevaron a cabo de modo ciego a los resultados clínicos.

10 **Ensayo de glicanos**

10 [0102] Todas las muestras se sometieron a ensayo utilizando GlycoChip®. Los glicanos se unieron covalentemente a la superficie mediante una molécula conectora, tal como se ha descrito anteriormente (Schwarz et al., Glycobiology 13:749-754, 2003; Dukler y Dotan, WIPO, vol. WO2002ii0000101, Glyco-minds Ltd., 2002). Brevemente, se sintetizó un oligómero de 1,8-diamino-3,6-dioxaoctano (Sigma, St. Louis, MO) y se acopló al soporte sólido. En consecuencia, los conjugados de pNP-sacárido se redujeron con ditionita sódica en derivados pAP-sacárido y se hicieron reaccionar con molécula conectora activada con cianocloruro (Sigma). Se identificaron en los portaobjetos los derivados glicanos p-nitrofenilo siguientes: Glc(α1,2)Glc(α), Glc(α1,3)Glc(α), Glc(α1,6)Glc(α), Glc(α1,4)Glc(α), α-Glc y α-GlcNAc. Los glicanos se imprimieron en 6 submatrices de cada portaobjetos, 4 puntos para cada glicano en cada submatriz.

20 **Ensayo fluorescente para anticuerpos específicos ligantes de glicano utilizando el portaobjetos de vidrio GlycoChip®**

25 [0103] Una superestructura de silicio adhesiva unida al portaobjetos tras la impresión permitió aplicar 6 muestras de suero diferentes en cada portaobjetos simultáneamente, 4 muestras de paciente y controles de plasma de alta y baja concentración.

30 [0104] Se incubaron muestras de suero (diluidas 1:80 en TBST que contenía BSA al 1%) durante 1 hora en los portaobjetos. Tras lavar en tampón TNTT (Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, NaCl 2 M, Tween-20 al 0,05%, Triton X-100 al 0,05%) los reactivos de marcaje se incubaron sobre los portaobjetos de vidrio en un sistema de hibridación Tecan HS-4800. Se incubó anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgM humana (1:500) y estreptavidina marcada con Alexa-488 (1:150, Molecular Probes, OR, USA) secuencialmente con lavados intermedios durante 1 hora a 32°C en el ambiente protegido de la luz y de temperatura controlada del sistema de hibridación. Se escanearon los portaobjetos utilizando un escáner de matrices Axon 4100 controlado por GenPix (Axon, CA, USA). Las imágenes se analizaron utilizando el analizador ArrayPro Analyzer 4.5.1.48 (Media Cybernetics, CA, USA).

35 [0105] El nivel de todos los anticuerpos IgM anti-glicano sometidos a ensayo era significativamente más alto en los pacientes de MS que en pacientes con otras enfermedades neurológicas. Se muestran en la Tabla 1 estadísticos descriptivos de los niveles de anticuerpo IgM anti-glicano en 115 pacientes de esclerosis múltiple y de 60 pacientes con otras enfermedades neurológicas. Las señales de RFU se transformaron logarítmicamente (log10) para conseguir la distribución normal. La curva de característica receptor-operador (ROC) para diferenciar los pacientes de MS y de OND se muestra en la Figura 1. Los resultados demuestran que todos los glicanos pueden diferenciar entre los pacientes de MS y los pacientes de OND con una especificidad de 90% y una sensibilidad de entre 40% y 60%. Utilizando valores de corte de 90% de especificidad se determinó para cada uno de los pacientes si el paciente era positivo (superior al valor de corte) o negativo (inferior al valor de corte) para cada uno de los antígenos sometidos a ensayo.

45 **Tabla 1.**

Antígeno sacárido	Log10(RFU) media, (SD)	
	MS	OND
Glc(α1,2)Glc(α)	0,51 (0,19)	0,32 (0,21) *
Glc(α1,3)Glc(α)	0,45 (0,20)	0,31 (0,23) *
Glc(α1,6)Glc(α)	0,48 (0,21)	0,20 (0,23) *
Glc(α1,4)Glc(α)	0,52 (0,20)	0,32 (0,25) *
α-Glc	0,37 (0,18)	0,17 (0,20) *
α-GlcNAc	0,61 (0,25)	0,33 (0,24) *

SD, desviación estándar; MS, esclerosis múltiple; OND, otras enfermedades neurológicas; RFU, unidades relativas de fluorescencia.  
\* p<0,000001 frente a MS

50 [0106] Se determinaron para cada paciente los niveles de los anticuerpos anti-glicano Glc(α1,4)Glc(α) - Ga4Ga, αGlc - Ga, α-GlcNAc - GNa, Glc(α1,2)Glc(α) - Ga2Ga, Glc(α1,3)Glc(α) - Ga3Ga, Glc(α1,6)Glc(α) - Ga6Ga. Se muestran los resultados en la Tabla 2. Las celdas sombreadas en gris en la tabla representan los niveles de anticuerpos superiores al valor de corte para una especificidad de 90%. Los resultados demuestran que existen pacientes de MS que son positivos para uno o más de entre Glc(α1,2)Glc(α), Glc(α1,3)Glc(α) o Glc(α1,6)Glc(α) y que no son positivos para Glc(α1,4)Glc(α), α-Glc o α-GlcNAc. Por ejemplo, el paciente nº 5.138 era positivo únicamente

5 para anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ), los pacientes n° 5.414 y n° 5.415 eran positivos únicamente para anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y el paciente n° 5.446 era positivo únicamente para anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ); estos pacientes únicamente pueden diagnosticarse mediante la utilización del antígeno relevante. De esta manera, cada antígeno presenta una contribución de especificidad única para el diagnóstico exacto de la MS. Estos resultados demuestran que los anticuerpos IgM anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ), anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ) y anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) se encuentran a niveles más altos en los pacientes de MS que en los pacientes de OND. Por lo tanto, estos anticuerpos resultan útiles en el diagnóstico de los pacientes de MS individualmente o en combinación con otros antígenos.

Tabla 2

I.D. de paciente	Enfermedad	Ga4Ga	Ga	GNa	Ga2Ga	Ga3Ga	Ga6Ga
302	MS	2.09	1.48	1.22	2.01	2.27	2.98
303	MS	1.47	1.26	3.02	2.43	3.40	1.45
308	MS	4.70	3.73	5.35	5.68	2.98	4.26
309	MS	2.06	1.65	1.64	3.41	1.98	1.79
312	MS	1.80	1.34	1.38	3.70	1.69	1.59
313	MS	5.47	3.46	3.03	4.60	6.18	4.55
314	MS	4.30	2.61	6.18	6.74	4.54	4.02
316	MS	3.30	3.12	8.39	3.27	2.61	2.39
318	MS	3.57	2.99	3.41	2.12	2.52	5.70
321	MS	2.24	2.98	5.35	4.49	3.26	2.86
322	MS	4.15	2.78	2.74	3.03	2.77	2.72
323	MS	2.20	1.61	4.46	3.34	2.62	4.61
324	MS	4.45	2.46	7.09	3.95	3.90	2.47
326	MS	3.11	3.61	4.93	11.21	3.22	7.06
328	MS	5.33	2.50	4.32	1.90	2.95	3.43
5086	MS	2.70	1.76	6.60	3.47	3.23	3.31
5089	MS	2.70	2.48	10.78	3.58	2.59	2.70
5090	MS	4.88	2.54	4.72	3.05	3.64	3.21
5093	MS	3.36	3.13	4.30	6.70	2.58	3.97
5098	MS	3.15	1.46	12.01	2.55	2.50	2.21
5103	MS	9.16	4.41	13.14	8.18	5.78	6.95
5106	MS	11.15	3.57	11.36	4.26	7.68	4.17
5110	MS	1.93	1.39	2.13	1.98	1.78	2.52
5111	MS	4.39	2.37	3.22	4.82	3.11	4.58
5113	MS	1.89	1.44	2.94	3.13	1.97	1.69
5119	MS	2.37	2.12	4.09	2.27	3.04	3.06
5120	MS	7.79	2.48	7.79	4.42	3.95	5.41

ES 2 358 606 T3

5121	MS	4.81	1.90	9.18	3.32	3.93	4.00
5126	MS	3.77	1.97	6.20	2.12	3.72	2.93
5129	MS	10.39	2.27	4.43	4.25	3.94	6.10
5130	MS	2.97	2.93	3.96	1.62	1.87	1.38
5137	MS	3.23	2.44	11.75	4.35	2.30	2.62
5138	MS	1.94	2.20	3.51	6.55	1.88	2.66
5139	MS	2.04	1.35	3.62	1.23	2.81	1.69
5145	MS	1.35	0.76	1.24	1.34	1.27	0.90
5158	MS	2.04	2.21	1.98	1.69	1.75	2.15
5159	MS	4.80	2.96	2.96	2.96	2.77	3.66
5163	MS	4.17	3.24	5.20	3.73	2.71	4.95
5174	MS	3.83	2.66	3.99	3.18	2.25	3.65
5175	MS	1.35	1.19	2.11	1.73	1.62	1.03
5176	MS	3.41	2.80	5.15	2.69	2.07	2.78
5177	MS	6.25	2.58	3.42	4.42	8.39	2.91
5204	MS	2.59	1.29	2.07	2.01	1.32	2.22
5207	MS	4.49	2.49	2.81	2.17	2.40	2.84
5208	MS	4.97	4.68	7.54	3.06	2.48	3.84
5211	MS	4.58	1.43	3.81	2.78	1.99	1.25
5212	MS	2.02	1.70	4.15	2.54	2.23	2.42
5213	MS	2.30	2.41	3.72	2.05	2.29	3.02
5214	MS	3.39	2.70	6.21	3.23	2.64	3.12
5215	MS	4.01	3.01	3.99	3.02	2.43	4.38
5216	MS	9.81	2.35	2.43	3.12	2.94	3.75
5217	MS	3.91	3.00	6.34	3.11	2.15	3.01
5219	MS	2.04	2.76	2.35	4.28	1.42	1.60
5230	MS	5.49	4.02	4.30	5.11	3.19	4.20
5231	MS	2.74	1.98	4.12	5.17	3.69	2.94

5232	MS	4.81	3.77	12.05	4.40	11.63	7.49
5240	MS	4.10	2.30	5.05	3.90	3.32	3.18
5240	MS	4.10	2.30	5.05	3.90	3.32	3.18
5241	MS	2.89	1.68	7.68	6.25	4.50	3.50
5242	MS	5.52	3.08	6.14	4.15	2.69	4.11
5246	MS	2.40	4.76	2.91	1.92	2.12	5.87
5248	MS	1.69	1.01	2.44	2.40	2.37	1.34
5249	MS	2.99	2.15	7.17	3.79	2.76	2.66
5251	MS	1.89	1.23	3.63	2.37	2.81	1.47
5254	MS	2.42	2.35	2.73	1.91	1.68	1.69
5255	MS	8.92	1.53	2.97	2.76	2.84	3.31
5410	MS	2.18	2.93	2.65	1.16	1.38	3.17
5411	MS	1.92	1.42	8.82	1.90	1.69	4.32
5412	MS	2.63	1.72	2.08	2.02	2.17	2.97
5413	MS	7.06	3.84	2.93	3.49	3.79	5.62
5414	MS	2.51	1.50	2.69	4.00	3.95	2.13
5415	MS	3.67	0.91	1.33	2.33	5.02	2.59
5416	MS	4.39	3.81	2.42	1.66	1.76	7.06
5417	MS	5.30	6.53	17.28	4.61	4.08	7.07
5418	MS	3.50	3.04	3.26	3.05	2.56	2.42
5420	MS	2.88	2.28	3.69	3.73	5.83	3.28
5423	MS	2.65	1.72	2.25	4.14	2.19	2.43
5424	MS	3.01	2.20	2.23	2.26	2.53	2.04
5428	MS	2.97	2.38	4.86	2.78	2.78	2.61
5429	MS	3.89	2.49	4.18	8.13	6.00	5.87
5430	MS	3.12	2.31	3.23	4.16	10.76	2.28
5436	MS	6.39	3.49	4.33	3.10	2.15	3.95
5438	MS	2.31	2.18	2.55	2.92	3.52	1.63

5441	MS	2.28	1.83	4.69	7.07	2.82	2.37
5443	MS	1.98	1.44	3.39	1.96	1.65	1.72
5444	MS	9.93	4.45	10.92	7.19	10.55	7.15
5446	MS	2.29	1.66	2.89	3.43	2.89	3.87
5447	MS	1.54	1.79	1.66	4.00	2.27	1.03
5449	MS	6.02	2.59	8.69	5.17	4.51	4.27
5450	MS	1.46	1.12	1.64	1.55	1.25	1.41
5452	MS	1.51	1.03	1.46	1.98	1.60	2.18
5455	MS	3.42	3.15	2.39	1.68	1.32	1.64
5456	MS	3.69	2.42	8.09	2.16	1.15	1.99
5457	MS	7.33	3.88	6.72	6.80	6.62	9.37
5458	MS	2.70	1.46	3.07	4.00	2.04	1.58
5460	MS	2.96	2.39	11.87	2.98	2.00	2.91
5461	MS	2.54	1.69	2.14	3.67	2.49	2.53
5462	MS	2.66	1.54	2.64	3.60	2.11	1.75
5463	MS	5.56	5.11	2.69	2.81	2.02	6.63
5464	MS	2.87	4.94	4.60	3.35	2.90	4.17
5465	MS	3.30	2.28	4.12	4.35	2.91	2.31
5467	MS	4.45	4.12	8.18	3.34	3.83	3.18
5468	MS	2.97	4.81	2.98	4.77	3.27	9.22
5469	MS	5.98	3.49	12.13	6.41	4.21	6.56
5470	MS	3.74	1.91	2.56	4.03	2.43	3.65
5474	MS	2.38	1.32	8.74	1.61	1.99	1.24
5476	MS	2.90	1.90	8.02	3.17	3.05	3.42
5480	MS	2.63	1.95	4.92	3.44	2.86	6.04
5482	MS	3.15	2.27	1.68	1.99	2.67	2.29
5483	MS	6.70	5.78	5.27	6.72	9.71	5.43
5484	MS	3.57	2.92	6.31	5.50	3.56	3.57

5485	MS	8.44	3.22	6.95	3.52	3.36	6.29
5486	MS	3.72	3.93	14.71	3.60	2.90	2.70
5489	MS	1.96	1.23	2.37	1.54	1.23	1.38
9999	MS	3.46	2.79	1.86	2.84	2.00	3.46
5184	OND	2.47	1.06	3.08	2.25	1.47	1.91
5185	OND	0.97	0.81	1.39	0.88	1.01	0.80
5186	OND	1.67	2.09	2.69	3.29	2.03	1.12
5187	OND	1.55	1.82	2.61	1.41	1.40	1.24
5188	OND	6.94	1.99	2.77	2.01	1.74	1.82
5190	OND	1.02	0.61	0.70	1.13	1.13	0.73
5191	OND	1.10	0.77	2.20	1.74	1.32	1.00
5192	OND	0.86	0.98	1.71	1.73	1.47	0.92
5193	OND	1.62	1.25	1.31	0.83	0.76	0.79
5194	OND	2.25	1.40	2.22	1.43	1.89	1.29
5195	OND	3.58	2.69	4.77	2.63	1.90	2.00
5196	OND	1.85	1.60	4.68	1.62	1.15	2.30
5197	OND	2.18	0.98	0.87	1.78	1.67	1.09
5198	OND	2.01	1.82	2.16	2.62	2.45	1.28
5199	OND	1.36	1.27	0.88	1.21	0.90	0.92
5224	OND	1.02	1.01	0.96	1.17	1.54	0.94
5225	OND	5.99	5.58	6.17	5.69	4.24	6.04
5226	OND	1.63	1.50	1.34	2.22	1.58	0.92
5233	OND	2.07	0.91	0.94	3.43	3.87	1.31
5234	OND	0.83	0.69	1.41	1.30	2.46	1.02
5235	OND	1.66	2.08	1.91	1.64	1.31	1.59
5236	OND	2.64	1.57	2.92	2.32	2.89	1.52
5237	OND	3.98	2.09	5.76	5.22	4.89	2.90
5239	OND	6.65	2.03	1.62	1.35	1.15	2.38
5244	OND	1.45	1.05	1.63	1.34	1.41	1.11



ES 2 358 606 T3

5400	OND	1.20	0.76	1.42	1.58	1.72	1.27
5401	OND	1.87	1.26	2.26	2.41	2.22	1.03
5402	OND	5.87	2.78	3.57	2.01	2.29	5.43
5404	OND	1.66	1.23	1.70	1.67	1.72	1.31
5405	OND	1.61	0.78	1.65	1.31	1.48	1.09
5406	OND	1.22	1.13	1.20	1.48	1.39	1.15
5407	OND	2.56	1.86	4.59	2.92	2.41	2.45
5408	OND	6.28	4.30	2.70	4.75	5.79	4.52
5706	OND	1.56	1.07	2.39	2.05	1.53	1.02
5707	OND	2.30	1.42	2.37	2.05	2.06	1.40
5708	OND	2.21	1.45	2.96	2.29	2.20	2.03
5709	OND	2.38	1.94	2.60	2.01	2.04	2.11
5710	OND	4.22	2.55	1.87	2.47	3.33	4.25
5711	OND	1.13	0.88	0.89	1.02	1.16	0.99
5712	OND	0.83	0.93	1.25	1.25	1.14	0.66
5719	OND	2.29	2.21	2.99	3.26	3.29	1.73
5720	OND	1.22	1.39	1.25	2.58	2.12	1.45
5721	OND	1.74	1.02	1.11	1.46	1.92	1.45
5725	OND	1.90	1.81	1.60	2.12	2.23	2.16
5726	OND	12.33	3.51	8.29	6.42	6.88	7.51
5727	OND	6.29	3.85	6.68	6.45	6.20	3.31
5728	OND	1.28	0.93	1.38	1.54	1.26	0.98
5729	OND	2.85	0.98	2.96	1.69	1.73	1.97
5730	OND	1.50	1.18	1.59	1.56	1.89	1.13
5731	OND	2.01	1.66	1.57	2.05	2.24	1.88
5732	OND	1.65	1.37	2.20	3.20	2.79	1.31
5733	OND	4.02	2.51	4.41	4.23	2.78	1.35
5734	OND	1.38	1.05	1.55	1.29	1.19	1.29
5737	OND	1.83	1.76	4.04	2.38	1.98	1.56

5739	OND	2.56	1.91	3.92	3.14	3.30	2.25
5740	OND	2.16	1.59	3.26	2.13	1.81	2.29
5741	OND	2.26	1.54	2.71	1.77	2.53	3.29
6102	OND	4.96	3.69	5.00	8.59	14.54	3.86
8189	OND	1.76	1.16	2.33	1.82	1.79	1.51
8191	OND	1.62	1.57	2.79	3.87	3.06	2.22

5 **Ejemplo 2. Los anticuerpos anti-IgM de tipo anti-sacárido predicen el desarrollo de esclerosis múltiple de recaída-remisión y un suceso neurológico posterior tras un primer suceso neurológico o CIS**

10 **[0107]** Se evaluó el valor de los anticuerpos IgM séricos seleccionados en la identificación de aquellos pacientes con un primer suceso neurológico agudo (FNE) o síndrome clínicamente aislado (CIS), y que se sospechaba que presentaban esclerosis múltiple que (a) se diagnosticaría posteriormente como MS de recaída-remisión (RRMS) en el seguimiento clínico (es decir, esclerosis múltiple clínicamente definida (CDMS)), o (b) presentarían una forma más activada de MS de progreso rápido a RRMS.

15 **[0108]** Se examinaron anticuerpos contra los sacáridos Glc(α1,4)Glc(α) (GAGA4), Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6) y α-GlcNAc (GNa). Los resultados en el presente ejemplo demuestran que un nivel elevado de anticuerpos IgM séricos contra GAGA4 y GAGA6 en el momento de un primer suceso neurológico agudo predicen aquellos pacientes de CIS que desarrollarán CDMS en forma RRMS, en comparación con pacientes que se sospecha que presentan MS que desarrollarán otras enfermedades neurológicas (OND). Estos resultados también demuestran que los pacientes con niveles elevados de anticuerpos IgM anti-GAGA4 y/o anti-GNa presentan un riesgo incrementado de n segundo ataque clínico dentro de los dos años posteriores a la aparición de la enfermedad. De esta manera, los anticuerpos IgM anti-GAGA4, anti-GAGA6 y anti-GNa pueden predecir la actividad de la enfermedad e identificar los pacientes de CIS que desarrollarán CDMS más rápidamente, dentro de los dos años posteriores al primer suceso neurológico. Se sometieron a ensayo retrospectivo-prospectivo muestras de sueros congelados obtenidos de pacientes que se habían presentado para un examen diagnóstico de CIS (edades de entre 18 y 60). El estudio incluía pacientes que fueron sometidos a seguimiento durante por lo menos cuatro años y que se había confirmado que presentaban RRMS (n=44) según los criterios de Poser (Poser et al., Ann. Neurol. 13:227-31, 1983) y un grupo de control de pacientes que se habían presentado como FNE o CIS pero que finalmente se les diagnosticó una OND (n=44), incluyendo enfermedades neurológicas inflamatorias (OIND, n=23) y otra enfermedad neurológica no inflamatoria (ONIND, n=21). Se presenta en la figura 2 una descripción esquemática del diseño del estudio. Los grupos de RRMS y de control se aparearon según composición por género, edad y nivel total de anticuerpos IgM. En la Tabla 3 se muestran las características demográficas y clínicas de la población de estudio. Se disponía de datos de seguimiento para 41 pacientes que revelaba si habían sufrido un ataque dentro de los 2 años posteriores a la extracción de sangre (es decir, un primer suceso neurológico o CIS). Se midieron los niveles de IgM anti-GAGA4, anti-GAGA6 y anti-GNa mediante inmunoensayo y se normalizaron respecto a los niveles de IgM total. Brevemente, se unieron covalentemente derivados p-nitrofenilo de GAGA4, GAGA6 y GNa a la superficie de una placa de microtitulación de 96 pocillos mediante una molécula conectora tal como se ha descrito anteriormente (patente US nº 6.972.172, Schwarz M. et al., Glycobiology 13:749-54, 2003). Se diluyeron las muestras de suero 1:1.200 en BSA al 1% en TBST, se dispensaron en pocillos (50 µl en cada pocillo) y se incubaron durante 30 minutos, y después se lavaron con tampón PBST. Los anticuerpos unidos se marcaron con 50 µl de anticuerpo de cabra específico del tipo IgM humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), se lavaron con tampón PBST y se añadieron 50 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) para la detección. Tras 15 minutos, se detuvo la reacción con 50 µl de solución de ácido sulfúrico al 1% y se leyó la densidad óptica (OD) a 450 nm con un lector de placas Victor 1420 (Wallac, Turku, Finlandia).

35 **[0109]** Se midió el nivel total de IgM en cada muestra de suero de la manera siguiente: se adsorbió anticuerpo de cabra anti-IgM humana (1 µg/ml en PBS) en una placa de microtitulación de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Dinamarca) durante la noche a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones en serie de sueros a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos a 27°C. Tras el lavado de la placa en un PowerWasher™, se añadió anti-IgM humana de cabra biotinilado durante 30 minutos a 27°C. El complejo inmunológico inmovilizado se detectó con estreptavidina-europio y detección de la fluorescencia. Las O.D.s medidas para los anticuerpos anti-glicano se normalizaron respecto a la IgM total en las muestras de suero, se dividieron por la lectura de RFU del ensayo de IgM total.

50 Se utilizó la prueba T de Student para evaluar las diferencias de significancia entre los anticuerpos anti-glicano en los grupos RRMS y OND. Se utilizó una prueba  $\chi^2$  para las variables no paramétricas. Los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

**Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la población de estudio**

	RRMS	OND	ONIN	ON
N	44	44	23	21
Edad, media (SD), años	37,6 (9,0)	38,5 (9,5)	36,5 (7,8)	39,8 (11,1)
Mujeres, n (%)	38 (86)	33 (75)	17 (73)	16 (76)
IgM total, media (SD), RFU*10 <sup>6</sup>	2,10 (0,80)	1,94 (0,68)	1,91 (0,71)	1,93 (0,69)

**Identificación de pacientes en los que posteriormente se diagnosticará RRMS**

5 [0110] Se encontraron niveles significativamente más altos de anticuerpos IgM anti-GAGA4 e IgM anti-GAGA6 (p=0,005 y p=0,01, respectivamente) en pacientes de CIS en los que finalmente se diagnosticó RRMS y no OND, ver la Tabla 4 y la figura 3. Aunque el nivel de anticuerpos IgM anti-GNa era más alto en pacientes de CIS en los que posteriormente se diagnosticó RRMS y no OND, la diferencia no era estadísticamente significativa. Se utilizó el conjunto de muestras de OND para fijar los valores de corte de OD media + 2\*SD para GAGA4 (0,53) y GAGA6 (0,21), para diferenciar entre los grupos de OND y de RRMS. La Tabla 5 indica el rendimiento diagnóstico de cada marcador separadamente y en combi-nación (ver también la figura 2). Diecisiete (17) pacientes de 44 (38,6%) en los que posteriormente se diagnosticó OND eran negativos para GAGA4 y GAGA6.

**Identificación de pacientes de RRMS que presentaron un segundo ataque dentro de los 24 meses posteriores**

15 [0111] Veintiséis (26) pacientes de los 41 pacientes de FNE o de CIS que habían adquirido RRMS presentaron un segundo ataque dentro de los 2 años posteriores al día de extracción de sangre. Se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-glicano de predecir un ataque posterior dentro de los 2 años posteriores.

20 [0112] Los pacientes de RRMS con niveles más altos (superiores a la mediana) frente a los pacientes con niveles más bajos (inferiores a la mediana) de anticuerpos IgM anti-GAGA4 y anti-GNa sufrieron posteriormente en grado significativo (16/20 (80%) frente a 10/21 (47%) y 17/20 (80%) frente a 9/21 (43%), prueba de  $\chi^2$ , p=0,025, oportunidad relativa: 4,4, intervalo de confianza (CI) al 95%: 1,6 a 11,8, y oportunidad relativa: 7,5, CI al 95%: 2,4 a 23,8, respectivamente) ataques adicionales dentro de los 2 años posteriores a los primeros sucesos neurológicos. No se encontraron diferencias significativas respecto a GAGA6. Ver la Tabla 6.

25 [0113] Las figuras 4A y B describen curvas ROC para diferenciar entre los pacientes de FNE o de CIS que habían adquirido RRMS y que presentaron un segundo ataque dentro de los 2 años posteriores, respecto de los pacientes de RRMS que no presentaron un segundo ataque dentro de los 2 años posteriores, basadas en anticuerpos IgM anti-GNa y anti-GAGA4. Aunque los niveles de anticuerpo IgM anti-GNa no fueron significativamente diferentes entre pacientes de RRMS y de OND, diferenciaron entre pacientes que habían adquirido RRMS y presentaron una segunda recaída dentro de los 2 años posteriores y los pacientes que habían adquirido RRMS pero no presentaron un segundo ataque dentro de los 2 años posteriores. Mediante la utilización de un valor de corte de 0,55 (D.O. de IgM anti-GNa/RFU\*1000000) puede alcanzarse una sensibilidad de 60% y una especificidad de 93%. El anticuerpo IgM anti-GAGA4 conjuntamente con la IgM anti-GAGA6 presentan una sensibilidad más alta (39%), una especificidad más alta (95%) y un valor predictivo más alto (89%) para distinguir entre pacientes de CIS que progresarán a una RRMS, y aquellos que finalmente resulta que presentan una OND. Además, los niveles más altos de anticuerpos IgM contra los epítotos GAGA4 y GNa, observados en pacientes en estadio de CIS, predicen los pacientes que se progresarán rápidamente a CDMS (dentro de los 2 años posteriores).

**Tabla 4. Niveles de anticuerpo IgM anti-sacárido en pacientes de RRMS y de OND**

Glicanos	Intensidad de la señal O.D./RFU*10 <sup>6</sup>	
	RRMS (n=44)	OND (n=44)
	Media (SD)	
Glc(α1,4)Glc(α)	0,44 (0,30)**	0,30 (0,11)
Glc(α1,6)Glc(α)	0,15 (0,10)*	0,11 (0,05)
α-GlcNAc	0,50 (0,34)	0,40 (0,23)

\*p<0,05 frente a CD  
\*\*p=0,005 frente a CD

**Tabla 5. Diferenciación entre pacientes de RRMS y pacientes de OND basada en anti-GAGA4, anti-GAGA6 y puntuación combinada**

Anticuerpos anti-glicano (valor de corte)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)	Eficiencia (%)
Anti-GAGA4 (0,53)	34,1	90,9	78,9	58,0	62,5
Anti-GAGA6 (0,21)	22,7	97,7	90,0	55,3	59,8
Positivo para anti-GAGA4 o anti-GAGA6	38,6	95,6	89,5	60,9	67,0

**Tabla 4. Asociación entre los niveles de anticuerpo IgM anti-GAGA4 y anti-GNa, y la aparición de un segundo ataque en los 2 años posteriores, en pacientes de FNE o CIS que adquieren RRMS**

Anticuerpo	Número de pacientes de RRMS que presentaron un segundo ataque dentro de los 2 años posteriores/total de pacientes		
	Pacientes con niveles de anticuerpos inferiores a la mediana	Pacientes con niveles de anticuerpos superiores a la mediana	Oportunidad relativa (CI al 95%)
IgM anti-GAGA4*	10/21 (47%)	16/20 (80%)	4,4 (1,5 a 11,8)
IgM anti-GAGA6	11/21 (52%)	15/20 (75%)	3,3 (1,3 a 8,0)
IgM anti-GNa*	9/21 (43%)	17/20 (85%)	7,5 (2,4 a 23,8)

\*p=0,025, prueba  $\chi^2$ **Ejemplo 3. Diagnóstico de RRMS o CDMS rápida en un paciente que se presenta con un FNE o CIS**

[0114] Un paciente se presenta con síntomas de esclerosis múltiple en su primer suceso neurológico (FNE) o con CIS. Se extrae una muestra de suero del paciente y se somete a ensayo para la presencia de un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc (GNa), un anticuerpo IgM anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) (GAGA4) y un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) (GAGA6). Se compararon los niveles de los anticuerpos en la muestra de ensayo con un valor de corte representativo del nivel de anticuerpos en una muestra de control cuyo estado de MS es conocido. Los valores de corte de progreso a RRMS o de progreso rápido a CDMS pueden determinarse basándose en los niveles de anticuerpos en pacientes con RRMS, CDMS rápida u OND conocidos, tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se considera que un sujeto con FNE o CIS es pro-bable que progrese a RRMS o que progrese rápidamente a CDMS en el caso de que los niveles de los anticuerpos sean superiores al valor de corte predefinido.

**OTRAS REALIZACIONES**

[0115] Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, la descripción anteriormente proporcionada pretende ser ilustrativa y no limitativa del alcance de la invención, que se define a partir del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran comprendidos dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico de la esclerosis múltiple en un sujeto, comprendiendo el método la detección en una muestra de ensayo obtenida de un sujeto un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ), y la comparación de los niveles de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo con los de una muestra de control, en el que dicha muestra de control se selecciona de entre el grupo que consiste de uno o más individuos que presentan síntomas de esclerosis múltiple y que presentan un estado de esclerosis múltiple conocido, y uno o más individuos que no manifiestan síntomas de esclerosis múltiple, diagnosticando de esta manera esclerosis múltiple en dicho sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además detectar en dicha muestra de ensayo obtenida de dicho sujeto un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) o un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ), y comparar los niveles de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo con los de una muestra de control, en el que dicha muestra de control se selecciona de entre el grupo que consiste de uno o más individuos que presentan síntomas de esclerosis múltiple y que presentan un estado de esclerosis múltiple conocido, y uno o más individuos que no manifiestan síntomas de esclerosis múltiple, diagnosticando de esta manera esclerosis múltiple en dicho sujeto.
3. Método según la reivindicación 1, que comprende además detectar en dicha muestra de ensayo obtenida de dicho sujeto un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) y un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ), y comparar los niveles de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo con los niveles de dicho anticuerpo en una muestra de control, en el que dicha muestra de control se deriva de uno o más individuos cuyo estado de exacerbación de esclerosis múltiple es conocido, diagnosticando de esta manera la exacerbación de la esclerosis múltiple en dicho sujeto.
4. Método según la reivindicación 1, que comprende además detectar en dicha muestra de ensayo obtenida de dicho sujeto un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) y un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ), y comparar los niveles de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo con los niveles de dicho anticuerpo en una muestra de control, en el que dicha muestra de control se deriva de uno o más individuos cuya actividad de la enfermedad de esclerosis múltiple es conocida, evaluando de esta manera la actividad de esclerosis múltiple en dicho sujeto.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método comprende además detectar en dicha muestra de ensayo obtenida de dicho sujeto un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) y un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ), y comparar los niveles de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo con los niveles de dicho anticuerpo en una muestra de control, en el que dicha muestra de control se deriva de uno o más individuos cuya progresión de la enfermedad de esclerosis múltiple es conocida, determinando de esta manera la progresión de la enfermedad en dicho paciente.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método comprende además detectar un segundo anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc, un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc, un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcNAc, un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -Glc, un anticuerpo anti- $\beta$ -Ga., un anticuerpo anti-Glc( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti-GlcNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Araf, un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Rha, un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)[GlcNAc( $\beta$ 1,6)]GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcA y un anticuerpo anti- $\alpha$ -Xyl, y comparar los niveles del segundo anticuerpo en dicha muestra de ensayo con los niveles del segundo anticuerpo en una muestra de control, en el que dicha muestra de control se selecciona de entre el grupo que consiste de uno o más individuos que presentan síntomas de esclerosis múltiple y que presentan un estado de esclerosis múltiple conocido, y uno o más individuos que no manifiestan síntomas de esclerosis múltiple, diagnosticando de esta manera la esclerosis múltiple en dicho sujeto.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el segundo anticuerpo es un anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc, un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) o un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc.
8. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos que:
- (a) presentan síntomas de esclerosis múltiple con un estado de esclerosis múltiple conocido, o
  - (b) presentan una enfermedad autoinmunitaria diferente de la esclerosis múltiple, o
  - (c) presentan una enfermedad neurológica diferente de la esclerosis múltiple.
9. Método según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de tipo IgM.
10. Método según la reivindicación 6, en el que:
- (a) dicho anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc es un anticuerpo de tipo IgM, o
  - (b) dicho anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) es un anticuerpo de tipo IgM, o
  - (c) dicho anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc es un anticuerpo de tipo IgM.

11. Método según la reivindicación 1, en el que dicho diagnóstico es un diagnóstico precoz de esclerosis múltiple.
- 5 12. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo se detecta utilizando un oligosacárido que incluye un glicano que contiene un Glc(α1,2)Glc(α) (GAGA2) o Glc(α1,3)Glc(α) (GAGA3) o Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6).
13. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo se detecta utilizando un polímero que incluye un glicano que contiene un Glc(α1,2)Glc(α) (GAGA2) o Glc(α1,3)Glc(α) (GAGA3) o Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6).
- 10 14. Método según la reivindicación 13, en el que:  
 (a) dicho polímero es un polisacárido, o  
 (b) dicho polímero es un lipopolisacárido (LPS), o  
 (c) dicho polímero es un polímero natural, o  
 (d) dicho polímero es un polímero sintético.
- 15 15. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de control se determina utilizando una evaluación de escala extendida de estado de discapacidad (EDSS) o una evaluación mediante obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI).
- 20 16. Método según la reivindicación 2 ó 6, en el que:  
 (a) dicho método comprende detectar por lo menos dos de dichos anticuerpos, o  
 (b) dicho método comprende detectar por lo menos cuatro de dichos anticuerpos, o  
 (c) dicho método comprende detectar por lo menos seis de dichos anticuerpos.
- 25 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 4 ó 5, en el que dicho método comprende detectar tres de dichos anticuerpos en dicha muestra.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que dicha muestra de control consiste esencialmente de:  
 30 (a) una población de uno o más individuos en estado de remisión de esclerosis múltiple que no muestran síntomas de una exacerbación de esclerosis múltiple, y se diagnostica una exacerbación de esclerosis múltiple en dicho sujeto en el caso de que se encuentre más de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo que en dicha muestra de control, o  
 35 (b) una población de uno o más individuos que presentan un estado de exacerbación de esclerosis múltiple, que manifiestan síntomas de una exacerbación de esclerosis múltiple, y se diagnostica una exacerbación de esclerosis múltiple en dicho sujeto en el caso de que se encuentren niveles similares de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo y en dicha muestra de control.
- 40 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra de ensayo es un líquido biológico.
20. Método según la reivindicación 19, en el que dicho líquido biológico es sangre completa, suero, plasma, líquido de médula espinal, orina, lágrimas o saliva.
- 45 21. Método según la reivindicación 19, en el que dicho líquido biológico es suero.
22. Método según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho diagnóstico es un diagnóstico precoz de exacerbación de esclerosis múltiple.
- 50 23. Método según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho sujeto ha sido tratado mediante:  
 (a) administración subcutánea de interferón beta, o  
 (b) administración subcutánea de acetato de glatirámero.
- 55 24. Método según la reivindicación 5, en el que dicha muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos en estado de remisión de esclerosis múltiple que no manifiestan síntomas de una exacerbación de esclerosis múltiple, y se diagnostica una exacerbación de esclerosis múltiple en dicho sujeto en el caso de que se encuentre más de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo que en dicha muestra de control.
- 60 25. Método para identificar un sujeto con un primer suceso neurológico (FNE) que es probable que progrese a esclerosis múltiple de recaída-remisión (RRMS), comprendiendo el método:  
 proporcionar una muestra de ensayo de un sujeto con un FNE,  
 detectar en dicha muestra de ensayo de dicho sujeto con un FNE, un anticuerpo anti-Glc(α1,6)Glc(α) (GAGA6), y  
 comparar los niveles de dicho anticuerpo en dicha muestra de ensayo con los de una muestra de control cuyo estado de RRMS es conocido,  
 65 identificando de esta manera un sujeto de FNE que es probable que progrese a RRMS.

26. Método según la reivindicación 25, en el que dicho sujeto con un FNE presenta síntomas de un síndrome clínicamente aislado (CIS).
- 5 27. Método según la reivindicación 25, en el que dicho método comprende además detectar un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) GAGA4.
- 10 28. Método según la reivindicación 25, en el que dicha muestra de control consiste esencialmente de una población de uno o más individuos que no manifiestan RRMS, y se identifica que el sujeto es probable que progrese a RRMS en el caso de que dicho anticuerpo se encuentre presente a niveles más altos en dicha muestra de ensayo que en dicha muestra de control.
- 15 29. Método según la reivindicación 28, en el que dicha muestra de control incluye sujetos con otra enfermedad neurológica (OND).
30. Método según la reivindicación 25, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de tipo IgM.
31. Método según la reivindicación 27, en el que dichos anticuerpos son anticuerpos de tipo IgM.
- 20 32. Método según la reivindicación 25, en el que dicho anticuerpo se detecta utilizando:
- (a) un glicano que contiene Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) (GAGA6), o
- (b) un oligosacárido que incluye un glicano que contiene un Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) (GAGA6), o
- (c) un polímero que incluye un glicano que contiene un Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) (GAGA6).
- 25 33. Método según la reivindicación 32, en el que dicho polímero es:
- (a) un polisacárido, o
- (b) un LPS, o
- (c) un polímero natural, o
- 30 (d) un polímero sintético.
34. Método para identificar un sujeto con un primer suceso neurológico (FNE) que es probable que progrese a esclerosis múltiple de recaída-remisión (RRMS), comprendiendo el método:
- 35 obtener una muestra de suero de un sujeto con un FNE,
- detectar en dicha muestra de suero de dicho sujeto con un FNE un anticuerpo IgM anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ) (GAGA6), y
- detectar un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) GAGA4,
- comparar los niveles de dichos anticuerpos en dicha muestra de ensayo con los de una muestra de control que es conocido que presenta RRMS,
- 40 en el que un nivel elevado de dichos anticuerpos en dicha muestra de ensayo en comparación con los de dicha muestra de control indica que dicho sujeto de FNE es probable que progrese a RRMS.
35. Kit para el diagnóstico de síntomas asociados, que determinan la prognosis o que evalúan la actividad de la esclerosis múltiple en un sujeto, comprendiendo el kit:
- 45 un primer reactivo que detecta específicamente un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ),
- un segundo reactivo que detecta específicamente un segundo anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de un anticuerpo anti- $\alpha$ -Glc, un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -GlcNAc, un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcNAc, un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -Glc, un anticuerpo anti- $\beta$ -Gal, un anticuerpo anti-Glc( $\beta$ 1,4)Glc( $\beta$ ), un anticuerpo anti-GlcNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Araf, un anticuerpo anti- $\alpha$ -L-Rha, un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)[GlcNAc( $\beta$ 1,6)]GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GalNAc( $\alpha$ ), un anticuerpo anti-Gal( $\beta$ 1,3)GlcNAc( $\beta$ ), un anticuerpo anti- $\beta$ -GlcA y un anticuerpo anti- $\alpha$ -Xyl.
- 50
36. Kit según la reivindicación 35, que comprende además un reactivo que detecta específicamente un anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste de un anti-Glc( $\neg$  $\alpha$ 1,2)Glc( $\alpha$ ) y un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ).
- 55
37. Kit según la reivindicación 35, que comprende además un reactivo que detecta específicamente un anticuerpo de tipo IgM.
- 60 38. Kit según la reivindicación 35, en el que dicho segundo reactivo detecta específicamente un anticuerpo anti-Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ) (GAGA4).
- 65 39. Composición purificada que comprende:
- un glicano que contiene Glc( $\alpha$ 1,2)Glc( $\neg$  $\alpha$ ),
- un glicano que contiene Glc( $\alpha$ 1,3)Glc( $\alpha$ ), y
- un glicano que contiene Glc( $\alpha$ 1,6)Glc( $\alpha$ ).

40. Composición según la reivindicación 39, que comprende además un glicano que contiene Glc( $\alpha$ 1,4)Glc( $\alpha$ ).
- 5 41. Composición según la reivindicación 39, que comprende además un glicano que contiene  $\alpha$ -GlcNAc.
42. Composición según la reivindicación 39, en la que por lo menos uno de dichos glicanos se proporciona en un oligosacárido compuesto de entre 1 y 20, entre 2 y 18, entre 3 y 15 ó entre 5 y 12 monómeros.
- 10 43. Composición según la reivindicación 39, en la que por lo menos se encuentra presente uno de dichos glicanos:
- (a) en un polisacárido, o  
(b) en un lipopolisacárido (LPS).
- 15 44. Composición según la reivindicación 39, en la que por lo menos uno de dichos glicanos se inmoviliza sobre un sustrato sólido.



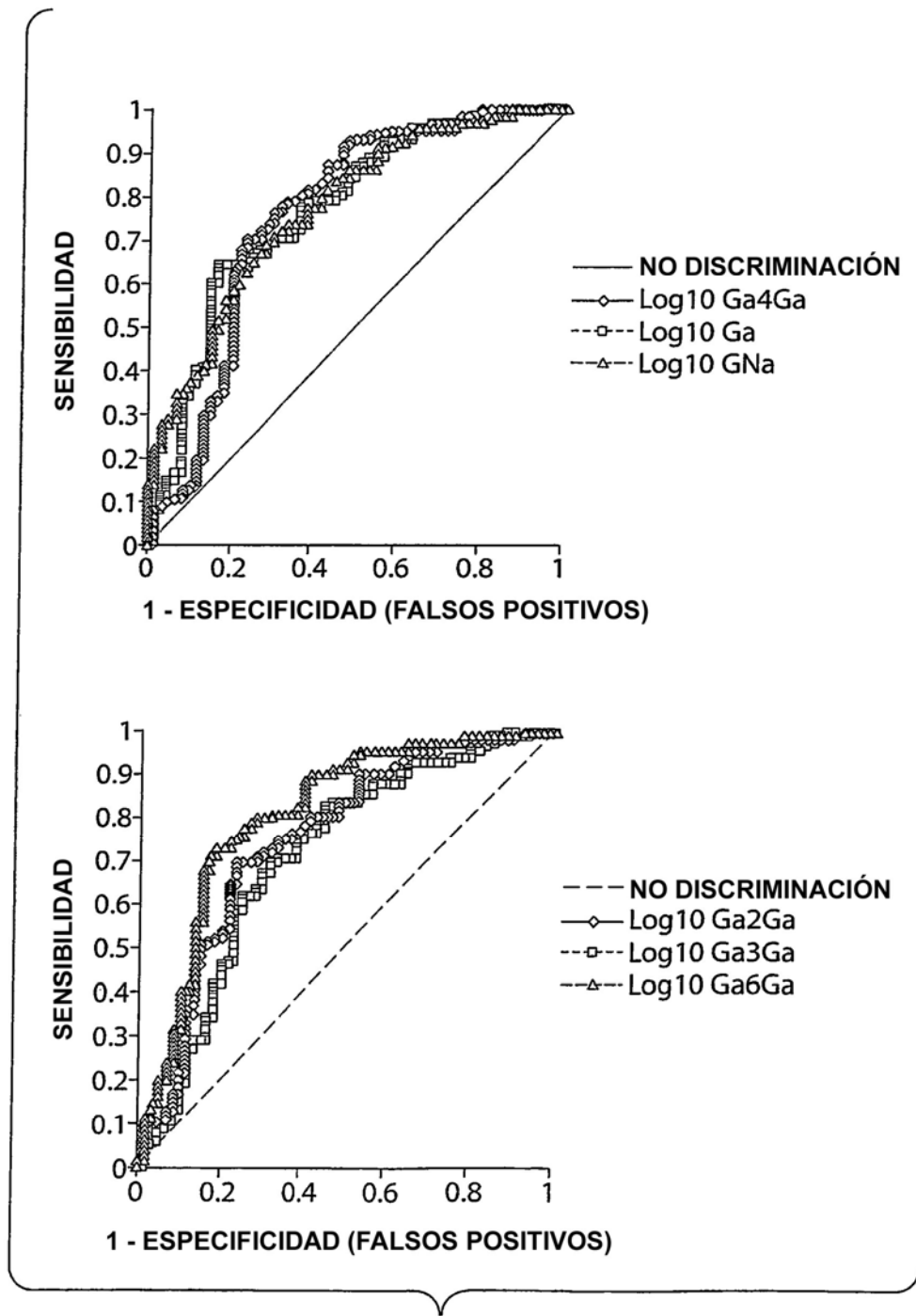


Fig. 1



Fig. 2

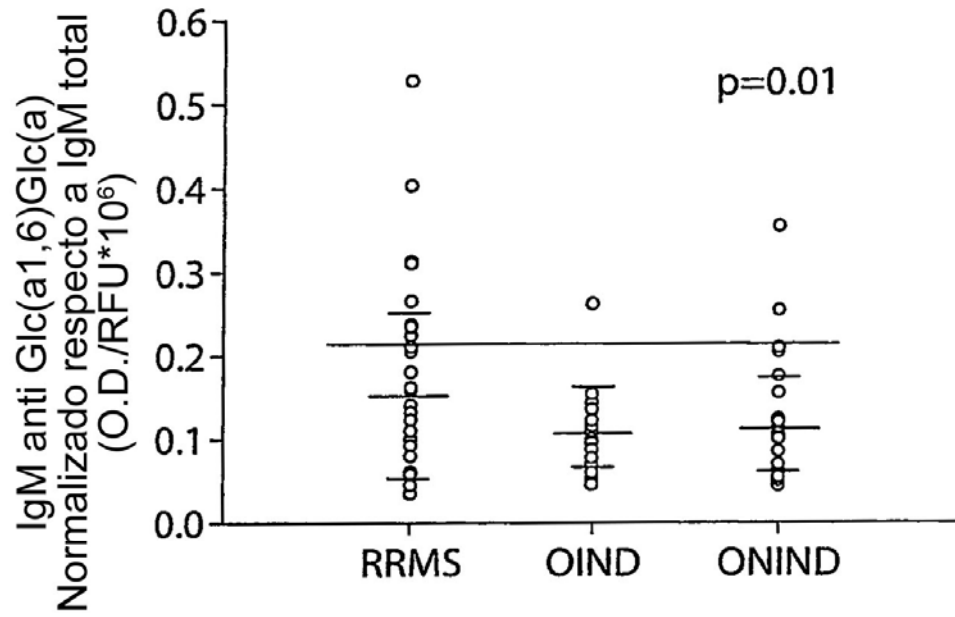


Fig. 3A

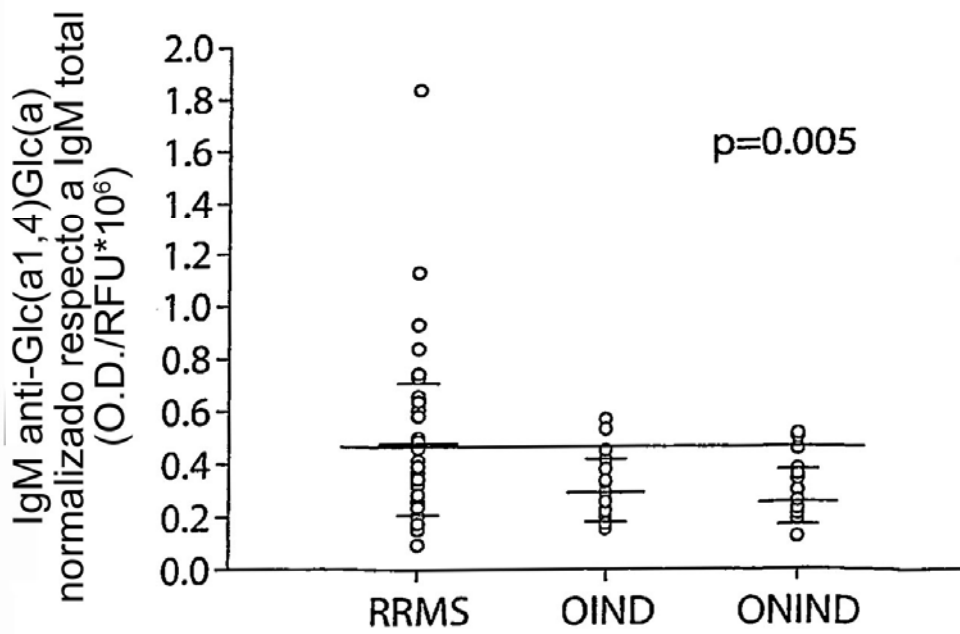


Fig. 3B

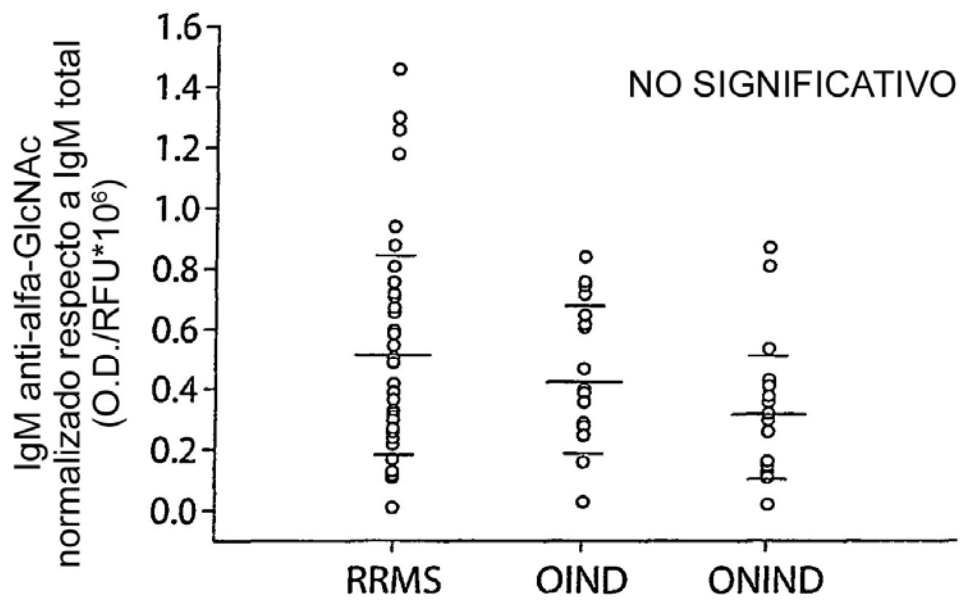


Fig. 3C

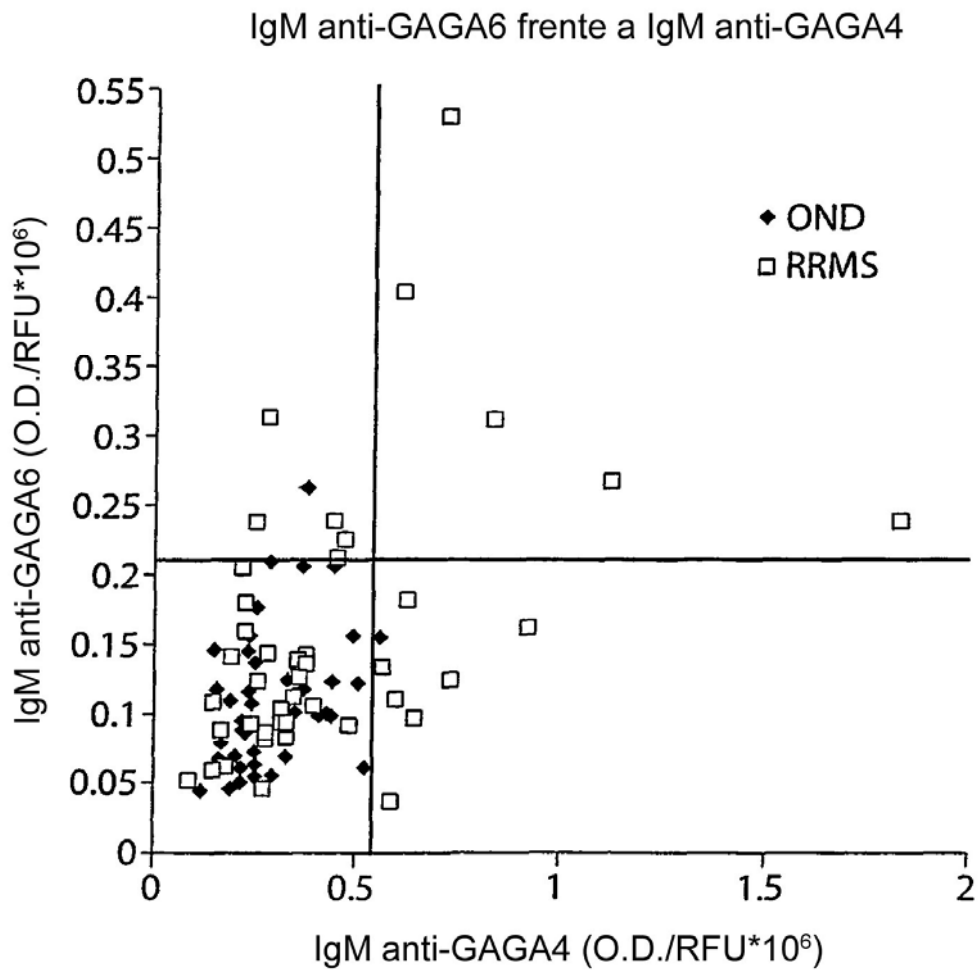


Fig.4

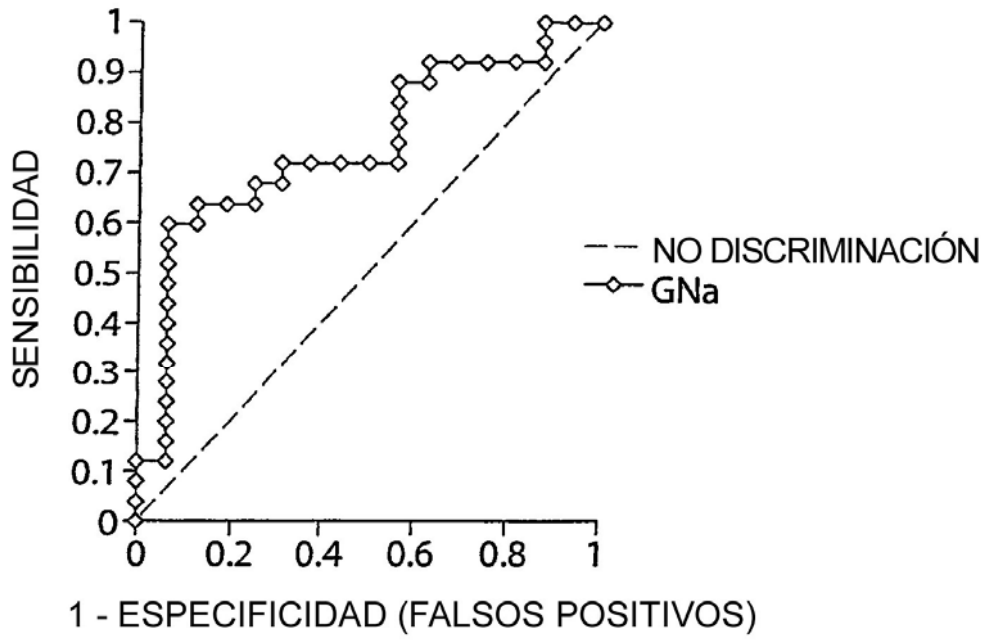


Fig. 5A

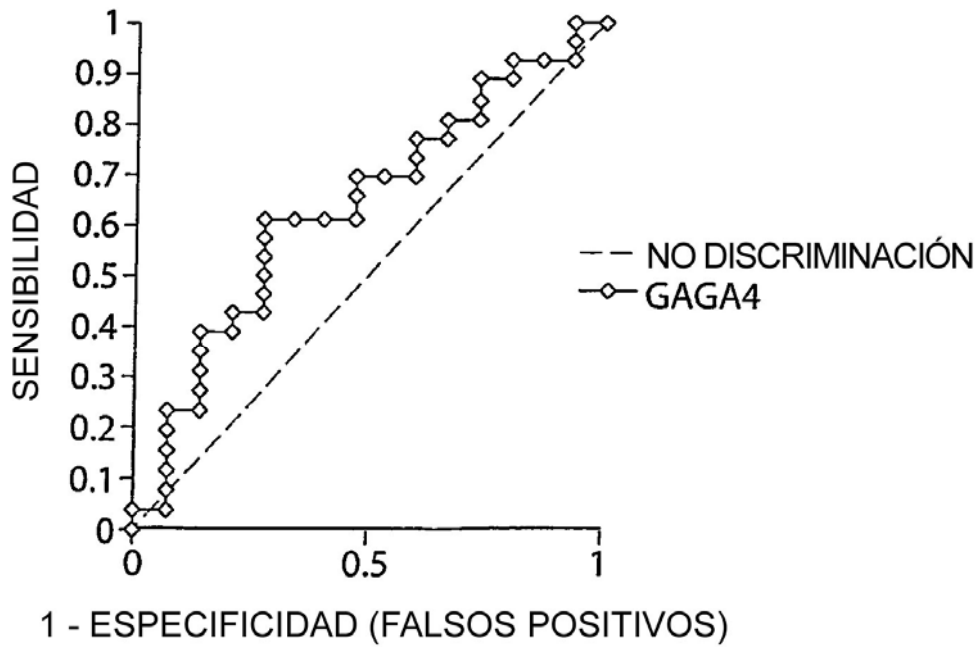


Fig. 5B