

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 490**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61K 35/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 35/24** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2007 E 07836873 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2057466**

54 Título: **Métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la encefalitis autoinmune o la epilepsia**

30 Prioridad:

**15.08.2006 US 837624 P**

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

**19.02.2014**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (50.0%)  
3160 Chestnut Street, Suite 200  
Philadelphia, PA 19104-6283, US y  
CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DALMAU, JOSEP;  
ROSENFELD, MYRNA y  
LYNCH, DAVID R.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 443 490 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de la encefalitis autoinmune o la epilepsia.

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona métodos para diagnosticar o determinar una causa de una encefalitis autoinmune o una epilepsia en un sujeto y para diagnosticar un tumor en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las alteraciones de la memoria, del comportamiento, de la cognición, y las crisis epilépticas pueden resultar de la encefalitis inmunomediada. Una causa de la encefalitis autoinmune es la manifestación paraneoplásica de un neoplasma. Hasta la fecha la mayoría de las encefalitis se han asociado con los anticuerpos a proteínas intracelulares onconeuronales y células-T citotóxicas presuntamente contra las mismas proteínas. Estos padecimientos generalmente se asocian con tumores malignos y una pobre respuesta a las inmunoterapias o a los tratamientos del cáncer.

15

20

En años recientes una encefalitis grave pero generalmente reversible de etiología desconocida que afecta predominantemente a mujeres jóvenes se ha reconocido cada vez más. El trastorno ha recibido varios nombres, incluyendo meningoencefalitis linfocítica difusa aguda, encefalitis límbica reversible aguda, encefalitis femenil juvenil no herpética aguda, o encefalitis no herpética aguda juvenil. Todavía no se ha establecido una asociación con infecciones, cáncer, o autoanticuerpos específicos, pero considerando que la mayoría de los pacientes desarrollan una enfermedad prodrómica de apariencia viral, se ha postulado una etiología pos infecciosa inmunomediada.

25

Los pacientes afectados fueron mujeres que desarrollaron síntomas psiquiátricos prominentes, crisis epilépticas, déficits de memoria, y disminución en los niveles de conciencia que con frecuencia requieren de soporte de ventilación. Tres características sobresalientes incluyeron pacientes jóvenes, la asociación con teratomas del ovario, y la detección de anticuerpos de antígenos desconocidos predominante expresados en la membrana celular de las neuronas del hipocampo (también conocido como un subgrupo de antígenos neurópilo).

30

Un mejor entendimiento de la función paraneoplásica de los antígenos neuronales (u onconeuronales) junto con la simulación PND en animales resulta en estrategias de tratamiento mejoradas. Sin embargo, para el clínico que actualmente se enfrenta a estos pacientes, la mejor probabilidad de afectar el resultado neurológico depende de: (1) el rápido diagnóstico de la enfermedad, (2) el descubrimiento y el tratamiento temprano del tumor, y (3) el uso de inmunoterapia. En consecuencia, existe la necesidad de un método de diagnóstico confiable para la presencia de la encefalitis autoinmune y la posibilidad de que las crisis epilépticas observadas sean ocasionadas por tumores (a veces ocultos).

35

40

Esta invención proporciona métodos para diagnosticar o determinar una causa de una encefalitis o una epilepsia autoinmune en un sujeto y para diagnosticar un tumor en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA.

45

En una realización, la presente invención proporciona un método para determinar la causa de una encefalitis en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA (NMDAR), determinando por lo tanto una causa de una encefalitis en un sujeto. En otra realización, la presencia de un anticuerpo a una subunidad NR en el líquido corporal indica que la encefalitis es de etiología autoinmune. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

50

En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar una causa de una encefalitis autoinmune en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, determinando por lo tanto una causa de una encefalitis autoinmune en un sujeto. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. En otra realización, el tumor es una causa de la encefalitis autoinmune. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

55

En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar una causa de una encefalitis en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, determinando por lo tanto una causa de una epilepsia en un sujeto. En otra realización, el anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. En otra realización, el tumor es una causa de la epilepsia. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

60

5 En otra realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, determinando por lo tanto un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, diagnosticando por lo tanto un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

15 Figura 1: Anticuerpos de las neuronas del hipocampo en LE de etiología poco clara. Las secciones sagitales del cerebro de la rata reaccionaron con los sueros de varios pacientes LE. Fila superior: 3 casos mostraron reactividad intensa con el neuropilo del hipocampo. Los casos N<sup>o</sup>. 2 y 6 compitieron por los mismos epítomos (no se muestran); el caso N<sup>o</sup>. 2 tenía un anticuerpo adicional contra un subconjunto de neuronas en la parte interna de la circunvolución dentada (se muestra en la fila del medio). Las filas del medio e inferiores a ampliación alta muestran la reactividad de los casos N<sup>o</sup>. 1, 2, 5, 7 y un control anti-Hu. Comparar la reactividad intracelular del caso N<sup>o</sup>. 7 y anti-Hu con la reactividad predominante del neuropilo de los casos N<sup>o</sup> 1, 2 y 5 que no afectan el núcleo y el citoplasma de las neuronas (con excepción del N<sup>o</sup>. 2 que etiqueta un subconjunto de células). Sólo el caso N<sup>o</sup>.1 tuvo anticuerpos VGKC. Las flechas apuntan a las circunvoluciones dentadas para permitir la comparación entre paneles. (Fila superior x5, filas del medio e inferior x 200).

25 Figura 2. Etiquetado inmune de neuronas con anticuerpos nobles de un paciente con LE. Cultivos de neuronas del hipocampo de rata: (A) incubados con el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes, (B) co-etiquetados con sinaptofisina o (C) con espinofilina. Los anticuerpos de los pacientes (rojos en todos los paneles en el original) muestran una reactividad intensa con la membrana celular, con una colocalización limitada con la espinofilina (amarillos en C en el original) y menos con la sinaptofisina (B). (x800 aceite).

30 Figura 3. La reactividad de los anticuerpos de los pacientes con el hipocampo y el prosencéfalo, y la colocalización con la subunidad NR2B del receptor del N-metilo - D - aspartato (NMDAR). (A) Sección sagital del cerebro de una rata inmunotiquetada con el líquido cefalorraquídeo del paciente. Note la reactividad robusta con el hipocampo y la leve reactividad con el prosencéfalo. El cerebelo se escatima en gran parte. (B) Mayor ampliación de la capa molecular del hipocampo (flecha en A); este patrón de reactividad es idéntico al anteriormente reportado en pacientes con encefalitis paraneoplásica y teratomas del ovario. 4 (C-E) Inmunotiquetación doble de los cultivos de neuronas del hipocampo de ratas usando anticuerpos del paciente (C, verde) y un anticuerpo contra NR2B de la NMDAR (E, rojo); note la importante colocalización de reactividades (D, amarillo). Estos hallazgos sugirieron que los anticuerpos de los pacientes estaban dirigidos contra el NMDAR. Estudios posteriores demostraron que el paciente tenía también anticuerpos contra NR2A (no se muestran), lo cual explica, en parte, la colocalización parcial de las reactividades. Ampliación original X2,5 (A) y X400 (B), ambas contrateñidas con hematoxilina; X800 (lente de aceite), inmunofluorescencia (C-E).

45 Figura 4. Teratoma ovárico de una paciente con LE. (A) Vista macroscópica muestra la presencia de grasas y cabellos (flecha). (B) Región microscópica mostrando tejido nervioso con apariencia normal (la flecha apunta hacia las neuronas). x200 H&

50 Figura 5: Hallazgos a partir de la generación de imágenes por resonancia magnética (RM) del cerebro en tres pacientes. (A, B) RM del Paciente 1 en la presentación de síntomas (A) y después de una mejora clínica parcial y normalización de líquido cefalorraquídeo con inmunoterapia (B); note que la mejora clínica y la RM empezaron a ocurrir antes de la resección del tumor. (C, D) RM del Paciente 2 en la presentación de síntomas (C) y 4 meses después (D); este paciente desarrolló rápidamente un deterioro neurológico progresivo que no respondió a la inmunoterapia. La autopsia demostró que el quiste ovárico era un teratoma maduro del ovario. (E, F) RM del Paciente 3 en la presentación de síntomas; note la leve inversión atenuada por el líquido de la hiperintensidad de recuperación en los lóbulos temporales intermedios y en la corteza frontal derecha. Después de la inmunoterapia y la resección del tumor, la RM fue normal (no se muestra).

60 Figura 6: Aumento de intervalo del tamaño del tumor durante la encefalitis. (A) Tomografía computarizada del Paciente 1 muestra una lesión de un quiste ovárico de 5 cm (flecha) que duplicó su tamaño en 2 meses (B). La lesión no se eliminó inicialmente debido al pobre estado clínico del paciente y a la apariencia benigna de la masa ovárica. Después de una mejora clínica parcial con inmunoterapia, la masa se eliminó (teratoma inmaduro).

Figura 7: Los anticuerpos del paciente reaccionaron con los heterómeros de las subunidades NR2B y NR2A del receptor N-metilo - D - aspartato (NMDAR). Las células HEK293 que expresaron heterómeros (NR1/NR2B o NR1/NR2A) transfectadas con subunidades sencillas NR1 o NR2B del NMDAR fueron incubadas con el suero o el líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente. (fila superior) Los paneles demuestran que el LCR del Paciente 7 reacciona con las células que expresaron heterómeros (receptores funcionales) de NR1/NR2B y NR1/NR2A, pero no con las células transfectadas con las subunidades sencillas (NR1, NR2B). Las células transfectadas con NR2A o con plásmido simple sin inserción no reaccionaron con los anticuerpos del paciente (no se muestra). (fila inferior) Los paneles demuestran la reactividad del LCR de los Pacientes 1 y 3 con NR1/NR2B. En el tercer panel (N<sup>o</sup>.7 + NR2B), las células se coincubaron con LCR del Paciente 7 y un anticuerpo específico para NR2B, mostrando la colocalización de reactividades. El cuarto panel (C (-)) corresponde al LCR de un individuo sin encefalitis paraneoplásica (control negativo). La ampliación original 0 800, inmunofluorescencia; núcleo de las células demostrada con 4 diamidino -2- fenilindol (DAPI), excepto para "#7 + NR2B", en donde no se usó DAPI.

Figura 8: Los anticuerpos de los pacientes reaccionaron con las subunidades NR2 de los receptores N-metilo - D - aspartato (NMDAR) expresados por tejido nervioso presente en el tumor. (A, B) Paneles corresponden a los teratomas del ovario de Pacientes 3 y 5 inmunoetiquetados con MAP2 (teñido café), un marcador específico para neuronas y procesos dendríticos. Note la reactividad intensa con las células similares a neuronas y una red de procesos de células que están mejor desarrolladas en A. (B, recuadro) Algunas células neuronales inmaduras a mayor ampliación. (C-E) Paneles corresponden al tumor del Paciente 2 inmunoetiquetado con los anticuerpos del paciente (C, verde) y un anticuerpo específico para NR2B (E, rojo). Note que existe colocalización de reactividades (D, amarillo), indicando que los anticuerpos del paciente reaccionaron con el NR2B expresado en el tumor (hallazgos similares se observaron con el NR2A, no se muestran). (F-H) Paneles corresponden al tumor del Paciente 5 inmunoetiquetado con los anticuerpos del paciente (F, verde) y un anticuerpo específico para NR2B (H, rojo). Existe también colocalización de reactividades (G, amarillo), indicando que los anticuerpos del paciente reconocieron el NR2B expresado en el tumor (hallazgos similares se observaron con el NR2A, no se muestran). Ampliación original X200, contrateñidas con hematoxilina (A, B); X400, inmunofluorescencia (C-H).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una realización, la presente invención proporciona un método para determinar la causa de una encefalitis en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, determinando por lo tanto una causa de una encefalitis en un sujeto. En otra realización, la presencia de un anticuerpo a una subunidad NR en el líquido corporal indica que la encefalitis es de etiología autoinmune. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En una realización, el término "subunidad" es intercambiable con el término "heterómero".

En una realización, los métodos y composiciones proporcionados en el presente facilitan el reconocimiento de una forma grave de encefalitis autoinmune que frecuentemente responde al tratamiento. En otra realización, los métodos y composiciones descritos en el presente enfatizan la idea de que la autoinmunidad puede afectar el comportamiento, y particularmente aquella de los anticuerpos a heterómeros que contienen las subunidades NR2B y NR2A del NMDAR pueden alterar la emoción, en una realización, o la memoria, la conciencia o su combinación en otras realizaciones independientes.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar una causa de una encefalitis autoinmune en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, determinando por lo tanto una causa de una encefalitis autoinmune en un sujeto. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. En otra realización, el tumor es una causa de la encefalitis autoinmune. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar una encefalitis autoinmune paraneoplásica en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, diagnosticando por lo tanto una encefalitis autoinmune paraneoplásica en un sujeto.

La muestra biológica usada en los métodos descritos en el presente es un líquido corporal sometido a pruebas por métodos de la presente invención, en otra realización, un líquido cefalorraquídeo (LCR). En otra realización, el líquido corporal es plasma. En otra realización, el líquido corporal es otro tipo de fluido conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En otra realización, la muestra biológica es fluido amniótico, sangre, suero, saliva o su combinación en otra realización.

[0025] La encefalitis autoinmune de métodos y composiciones de la presente invención es, en otra realización, una encefalitis autoinmune. En otra realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis paraneoplásica. En otra

realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis no paraneoplásica. En otra realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis autoinmune paraneoplásica. En otra realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis autoinmune no paraneoplásica. En otra realización, la encefalitis autoinmune es cualquier tipo de encefalitis autoinmune conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

[0026] En una realización, la frecuencia de la encefalitis paraneoplásica anti-NMDAR, diagnosticada por los métodos descritos en el presente, es desconocida. En otra realización la encefalitis paraneoplásica anti-NMDAR es frecuentemente no reconocida. Esto se puede deber a diversas características que hacen que este trastorno sea único entre la encefalitis paraneoplásica, incluyendo en una realización, el involucramiento de mujeres relativamente jóvenes entre la 2a y 5a década, o, en otra realización, la presentación poco usual con manifestaciones psiquiátricas prominentes, o en otra realización, hallazgos atípicos o normales de RM, los cuales en el 75% de los casos consisten de T2 leve y pasajero o anomalías FLAIR fuera de los lóbulos temporales intermedios, con una mejora cortical en ciertas realizaciones, y en otras realizaciones, la apariencia benigna de tumores ováricos. En una realización, cualquiera de los sujetos que presentan los síntomas descritos anteriormente son diagnosticados usando los métodos descritos en el presente.

La encefalitis anti-NMDAR es diferente de otros tipos de encefalitis paraneoplásica en varias formas: resulta en un síndrome con altas características; generalmente afecta a mujeres jóvenes; responde al tratamiento; y está relacionado con tumores que pueden ser benignos. Otra diferencia mostrada aquí es que a pesar de la presencia del tumor, no se mantiene la respuesta inmune. Esto trae bajo consideración un papel de contribución del trastorno prodromático de apariencia viral, el cual por sí mismo o en combinación con un teratoma parte o mejora la respuesta inmune. En una realización, los métodos proporcionados aquí se usan para diferenciar la encefalitis anti-NMDAR de otros tipos de encefalitis paraneoplásica.

En otra realización, la encefalitis autoinmune de los métodos y composiciones de la presente invención se compone de una encefalitis límbica. En otra realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis límbica. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un trastorno límbico. En otra realización, la encefalitis autoinmune no está asociada con un trastorno límbico. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En una realización, la encefalitis límbica ocasiona déficits impresionantes que son dominados característicamente por una pérdida rápida y grave de la memoria a corto plazo. En otra realización, los pacientes mostraron encefalitis subcutánea en la vida adulta posterior, afectando principalmente las áreas límbicas con evidencia de cáncer en una realización. En una realización, el término "encefalitis límbica" se refiere a un sujeto que exhibe una pérdida grave de memoria a corto plazo y demencia en asociación con carcinoma bronquial.

En otra realización, la encefalitis autoinmune de los métodos y composiciones de la presente invención está asociada con crisis epilépticas. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un síndrome diencefálico. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un síntoma psiquiátrico. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con una anomalía en la cognición. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con una anomalía en el comportamiento.

En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con la amnesia. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un déficit de memoria. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con problemas de memoria. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un síndrome hipocinético.

En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un trastorno del movimiento. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con movimientos anormales. En otra realización, la enfermedad del movimiento es el síndrome del hombre/persona rígida. En otra realización, el trastorno de movimiento es cualquier otro trastorno del movimiento conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con una disminución del nivel de percepción. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con la hipoventilación.

En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con la disfunción de cualquier parte del cerebro o de la médula espinal. En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con una combinación de cualquiera de los síntomas o trastornos arriba señalados. Cada tipo de encefalitis representa una realización separada de la presente invención.

- En otra realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un tumor. En otra realización, el tumor es un teratoma del ovario. En otra realización, el tumor es un tumor tímico.
- 5 En otra realización, el tumor es un tumor testicular. En otra realización, el cáncer asociado con la encefalitis es un tumor de cáncer cervical. En otra realización, el cáncer es un tumor de cáncer de la cabeza y el cuello. En otra realización, el cáncer es un tumor de cáncer de seno. En otra realización, el cáncer es un tumor de cáncer del ano-genital.
- 10 En otra realización, el cáncer es un melanoma. En otra realización, el cáncer es un sarcoma. En otra realización, el cáncer es un carcinoma. En otra realización, el cáncer es un linfoma. En otra realización, el cáncer es una leucemia. En otra realización, el cáncer es un mesotelioma. En otra realización, el cáncer es un glioma. En otra realización, el cáncer es un tumor de células germinales. En otra realización, el cáncer es un coriocarcinoma. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 15 En otra realización, el cáncer es un cáncer pancreático. En otra realización, el cáncer es un cáncer ovárico. En otra realización, el cáncer es un cáncer gástrico. En otra realización, el cáncer es una lesión carcinomatosa del páncreas. En otra realización, el cáncer es un adenocarcinoma pulmonar. En otra realización, el cáncer es un adenocarcinoma colorectal. En otra realización, el cáncer es un adenocarcinoma escamoso pulmonar. En otra realización, el cáncer es un adenocarcinoma gástrico. En otra realización, el cáncer es una neoplasia epitelial en la superficie del ovario (p.ej., una variedad benigna, proliferante o maligna del mismo). En otra realización, el cáncer es un carcinoma de células orales escamosas. En otra realización, el cáncer es un carcinoma de cáncer de pulmón de células no pequeñas. En otra realización, el cáncer es un carcinoma endometrial. En otra realización, el cáncer es cáncer de vejiga. En otra realización, el cáncer es un cáncer de la cabeza y el cuello. En otra realización, el cáncer es un carcinoma de próstata.
- 20 En otra realización, el cáncer es un cáncer de la cabeza y el cuello. En otra realización, el cáncer es un carcinoma de próstata.
- 25 En otra realización, el cáncer es una leucemia mielógena grave (LMG). En otra realización, el cáncer es un síndrome mielodisplásico (SMD). En otra realización, el cáncer es un cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). En otra realización, el cáncer es un tumor de Wilm. En otra realización, el cáncer es una leucemia. En otra realización, el cáncer es un linfoma. En otra realización, el cáncer es un tumor dermoepitelial de células pequeñas y redondas.
- 30 En otra realización, el cáncer es un mesotelioma (p.ej., mesotelioma maligno). En otra realización, el cáncer es cáncer gástrico. En otra realización, el cáncer es cáncer de colon. En otra realización, el cáncer es cáncer de pulmón. En otra realización, el cáncer es cáncer de seno. En otra realización, el cáncer es un tumor de células germinales. En otra realización, el cáncer es un cáncer ovárico. En otra realización, el cáncer es cáncer uterino. En otra realización, el cáncer es cáncer de tiroides. En otra realización, el cáncer es un carcinoma hepatocelular. En otra realización, el cáncer es cáncer de tiroides. En otra realización, el cáncer es cáncer del hígado. En otra realización, el cáncer es cáncer renal. En otra realización, el cáncer es un kaposi. En otra realización, el cáncer es un sarcoma. En otra realización, el cáncer es otro carcinoma o sarcoma.
- 35 En otra realización, el tumor es cualquier otro tipo de tumor conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 40 En otra realización, el tumor es cualquier otro tipo de tumor conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 45 En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar una causa de una epilepsia en un sujeto, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a un anticuerpo o subunidad NR del receptor NMDA, en donde el anticuerpo indica una presencia de un tumor, en donde un tumor es una causa de la epilepsia.
- 50 La epilepsia de métodos y composiciones de la presente invención es, en otra realización, una epilepsia idiopática. En otra realización, la epilepsia responde a la terapia de reducción IgG. En otra realización, la epilepsia está asociada con crisis epilépticas parciales. En otra realización, la epilepsia está asociada con crisis epilépticas parciales simples. En otra realización, la epilepsia está asociada con crisis epilépticas parciales complejas. En otra realización, la epilepsia está asociada con crisis epilépticas generalizadas. En otra realización, la epilepsia está asociada con la ausencia de crisis epilépticas (petit mal). En otra realización, la epilepsia está asociada con crisis epilépticas mioclónicas. En otra realización, la epilepsia está asociada con crisis epilépticas tónicas-clónicas (grand mal).
- 55 En otra realización, la epilepsia está asociada con el síndrome de West. En otra realización, la epilepsia está asociada con el síndrome de Lennox-Gastaut. En otra realización, la epilepsia está asociada con cualquier otro síntoma conocido en la técnica.
- 60 En otra realización, la epilepsia es de causas desconocidas. En otra realización, la epilepsia es cualquier otro tipo de epilepsia conocido en la técnica. Cada tipo de epilepsia representa una realización separada de la presente invención.

- 5 "Causa de" una encefalitis autoinmune, epilepsia, etc., se refiere, en otra realización, a una causa primaria del trastorno. En otra realización, el término se refiere a una causa contribuyente del trastorno. En otra realización, el término se refiere a una causa indirecta. En otra realización, el término se refiere a una causa a través de una respuesta inmune inducida por el tumor. En otra realización, el término se refiere a una causa importante del trastorno. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 10 En otra realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, determinando por lo tanto un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 15 En otra realización, la presente invención proporciona un método para detectar un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, detectando por lo tanto un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 20 En una realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA, determinando por lo tanto un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 25 En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia, el cual consta en ensayar el líquido corporal del sujeto para detectar un anticuerpo a una subunidad NR del receptor NMDA (N-metilo D aspartato), detectando por lo tanto un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 30 En una realización, sorprendentemente, todos los pacientes que tienen anticuerpos a NMDAR que contienen el NR2B, y en un grado menor la subunidad NR2A. En otra realización, los NMDAR están formados a partir de heterómeros de NR1 (los cuales ligan la glicinia) y las subunidades NR2 (las cuales ligan el glutamato). Ambas subunidades son requeridas para crear un receptor funcional con la probabilidad de contener dos subunidades NR1 y dos NR2. Existen cuatro subunidades NR2 (NR2A-D) las cuales tienen 50 a 70% de secuencia de identidad en el dominio extracelular (NR2B es 70% idéntica a NR2A, y de 55 a 58% idéntica a NR2C y NR2D). Estas subunidades NR2 están codificadas por cuatro genes diferentes y muestran una variabilidad de desarrollo y regional. NR2B se expresó a altos prenatalmente y disminuye postnatalmente. Durante su declive, los niveles de expresión de NR2A y NR2C aumentan en ciertas realizaciones.
- 35 En adultos, el NR2A se encontró en la mayoría de las regiones del cerebro, NR2B en el hipocampo y el prosencéfalo, NR2C en el cerebelo, y NR2D en subconjuntos limitados de neuronas. NR1 está distribuido de forma omnipresente en el cerebro. Con la madurez muchos receptores NR1/NR2B se convierten mayormente en extrasinápticos en las neuronas del hipocampo y NR1/NR2A/NR2B se convierten en los receptores sinápticos principales en el hipocampo y el prosencéfalo. Por lo tanto, en una realización, la reactividad predominante de los anticuerpos de los sujetos con el hipocampo y el prosencéfalo se correlaciona con la distribución de heterómeros que contienen NR2B. En una realización, los anticuerpos acceden fácilmente a los epítopes de la superficie de las neuronas vivas, y solamente reaccionan con las células HEK293 que expresan receptores funcionales (heterómeros de NR1/NR2B o NR1/NR2A).
- 40 En una realización, la reactividad es identificada cuando cada subunidad es expresada individualmente (aun cuando NR1 en particular se ensambla en receptores homoméricos estables pero inactivos en las células HEK293) o en otra realización, con inmunotransferencia de células que expresan el receptor funcional. Estos hallazgos sugieren que los epítopes principales están en el dominio extracelular de las subunidades NR2B y NR2A, y que probablemente son conformacionales. En otra realización, los sujetos albergaron anticuerpos a heterómeros funcionales de NR2C y NR2D (consistentes con la homología de 55 a 58% entre estas subunidades y NR2B). En una realización, no se observó ningún aumento de inmunotiquetado del cerebro usando los métodos descritos en el presente en sueros o LCR de estos sujetos, indicando que en ciertas realizaciones estos anticuerpos ocurren a muy bajas titulaciones.
- 45 En una realización, la reactividad es identificada cuando cada subunidad es expresada individualmente (aun cuando NR1 en particular se ensambla en receptores homoméricos estables pero inactivos en las células HEK293) o en otra realización, con inmunotransferencia de células que expresan el receptor funcional. Estos hallazgos sugieren que los epítopes principales están en el dominio extracelular de las subunidades NR2B y NR2A, y que probablemente son conformacionales. En otra realización, los sujetos albergaron anticuerpos a heterómeros funcionales de NR2C y NR2D (consistentes con la homología de 55 a 58% entre estas subunidades y NR2B). En una realización, no se observó ningún aumento de inmunotiquetado del cerebro usando los métodos descritos en el presente en sueros o LCR de estos sujetos, indicando que en ciertas realizaciones estos anticuerpos ocurren a muy bajas titulaciones.
- 50 En una realización, la reactividad es identificada cuando cada subunidad es expresada individualmente (aun cuando NR1 en particular se ensambla en receptores homoméricos estables pero inactivos en las células HEK293) o en otra realización, con inmunotransferencia de células que expresan el receptor funcional. Estos hallazgos sugieren que los epítopes principales están en el dominio extracelular de las subunidades NR2B y NR2A, y que probablemente son conformacionales. En otra realización, los sujetos albergaron anticuerpos a heterómeros funcionales de NR2C y NR2D (consistentes con la homología de 55 a 58% entre estas subunidades y NR2B). En una realización, no se observó ningún aumento de inmunotiquetado del cerebro usando los métodos descritos en el presente en sueros o LCR de estos sujetos, indicando que en ciertas realizaciones estos anticuerpos ocurren a muy bajas titulaciones.
- 55 En una realización, la reactividad es identificada cuando cada subunidad es expresada individualmente (aun cuando NR1 en particular se ensambla en receptores homoméricos estables pero inactivos en las células HEK293) o en otra realización, con inmunotransferencia de células que expresan el receptor funcional. Estos hallazgos sugieren que los epítopes principales están en el dominio extracelular de las subunidades NR2B y NR2A, y que probablemente son conformacionales. En otra realización, los sujetos albergaron anticuerpos a heterómeros funcionales de NR2C y NR2D (consistentes con la homología de 55 a 58% entre estas subunidades y NR2B). En una realización, no se observó ningún aumento de inmunotiquetado del cerebro usando los métodos descritos en el presente en sueros o LCR de estos sujetos, indicando que en ciertas realizaciones estos anticuerpos ocurren a muy bajas titulaciones.
- 60 La subunidad NR de métodos y composiciones de la presente invención es, en otra realización, una subunidad NR2B. En otra realización, la subunidad NR es una subunidad GRIN2B (receptor glutamato, ionotrópico, subunidad N-metilo-D-aspartato 2B). En otra realización, la subunidad NR2B es parte de un heterómero NMDA. En otra realización, el heterómero es un heterómero funcional. En otra realización, la subunidad NR es una subunidad

5 NR2A. En otra realización, la subunidad NR es una subunidad GRIN2A (receptor glutamato, ionotrópico, (receptor glutamato, ionotrópico, subunidad N-metilo-D-aspartato 2A). En otra realización, la subunidad NR2A es parte de un heterómero NMDA. En otra realización, el heterómero es un heterómero funcional. En otra realización, la subunidad NR es una subunidad NR2C. En otra realización, la subunidad NR es una subunidad GRIN2C (receptor glutamato, ionotrópico, subunidad N-metilo-D-aspartato 2C). En otra realización, la subunidad NR2C es parte de un heterómero NMDA. En otra realización, el heterómero es un heterómero funcional en otra realización, la subunidad NR es cualquier otra subunidad NR conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

10 La subunidad NR2B tiene, en otra realización, la secuencia:

15 **MKPRAECCSPKFWLVLA VLA VSGSRARSQKSPPSIGIAVILVGTSDVEAIKDAHEKDDFFHLSVV**  
**VELVAMNETDPKSITRICDLMSDRKIQGVVFADDDQEAIAQILDFISAQTLTPILGIHGGSSMIMADKDE**  
**MFFQFGPSIEQQASVMLNIMEEYDWYIFSIYTYFPGYQDFVNKIRSTIENSFVVGWELEEVLLLDMSLDDC**  
**SKIQNQLKQLQSPILLYCTKEEATYIFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDITDTPAEFPTGLISVSYDEV**  
**YGLPARVRDGLAIIITTAASDMLSEHSFIPEPKSSCYNTHKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSEDGYQI**  
**PKLVIILLNKERKWERVVGKWKDKSLQMKYVWPRMCPETEEQEDDHLISIVTLEEAPFVIVESVDPLSGT**  
20 **MRNTVPCQKRIVTENKTDEEPGYIKCCKGFCIDILKIKSVKFTYDLYLVNKGKHKKINGTWNGMIC**  
**VVMKRAYMAVGSLTINEERSEVVDFSVPFIETGISVMVSRNGTVSPSAFLEPFSADVWMMFVMLLIV:**  
**VAVFVFEYFSPVGYNRCLADGREPGGSPFTIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAV**  
**LASYTANLAAFMIQEEYVDQVSGLSDKKFKRPNDFSPFRFGTVPNGSTERNIRNRYAEMHAYMGKFN**  
25 **GVDDALLSLKTGKLDAFIYDAAVLNYMAGRDEGCKLVTIGSGKVFSTGYGIAIQKDSGWKRQVDLAI**  
**LFGDGEMEELEALWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLGAAMALSLITFICEHLFYWQFRHCF**  
**VCSGKPGMVFSISRGYSCIHGVAATEERQSVMSPTATMNNTHSNILRLLRTAKNMANLSGVNGSPQSAL**  
**IRRESSVYDISEHRRSFTHSDCKSYNNPPCEENLFSYIYSEVERTFGNLQLKDSNVYQDHYHHHRPHSIG**  
**SSIDGLYDCDNPFFTQSRSSISKKPLDIGLPSSKHSQSLDLYGKFSFKSDRYSGHDDLIRSDVSDISTHTVTY**  
30 **NIEGNAAKRRKQYKDSLKRPASAKSRREFDEIELAYRRRPPRSPDHKRYFRDKEGLRDFYLDQFRTK**  
**SPHWEHVLDLDIYKERSDDFKRDSISGGGPCTNRSHIKHGTGDKHGVVSGVPAPWEKNLTNVEWEDRS**  
**NFCRSCPSKLHNYSTTVTGQNSGRQACIRCEACKAGNLYDISEDNSLQELDQPAAPVAVTSNASTTKY**  
**SPTNSKAQKKNRNKLRRQHSYDTFVDLQKEEAALAPRSVSLKDKGRFMDGSPYAHMFEMSAGESTFAI**  
35 **KSSVPTAGHHHNNPGGGYMLSLSLYPDRVTQNPFIFGDDQCLLHGSKSYFFRQPTVAGASKARPDF**  
**ALVTNKPVVSALHGA VPARFQKDICIGNQSNPCVPNNKNPRAFNGSSNGHVYEKLSIESDV (SEQ ID No:**

**1).**

40 En otra realización, la subunidad NR2B es un homólogo de la SEQ con N°. de ID: 1. En otra realización, la subunidad NR2B es una variante de la SEQ con N°. de ID: 1. En otra realización, la subunidad NR2B es un isómero de la SEQ con N°. de ID: 1. En otra realización, la subunidad NR2B es un fragmento de la SEQ con N°. de ID: 1. En otra realización, la subunidad NR2B consiste de la SEQ con N°. de ID: 1. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

45 En otra realización, la subunidad NR2B está codificada por una secuencia de nucleótido con la secuencia:



5 acggc~~aaattt~~ccctcaagagcgcaccgctacagtgccaccgacgactgatccgctccgatgtcttgacatctcaaccacaccgtcacctatgggaacafcgaagg  
aatgccgccaagaggcgtaagcagcaatataaggacacgctgaaagaagcggcctgcccggccaagtccccgagggagtttgacgagatcgagctggcctaccg  
ccgaccgccccgctcccctgaccacaagcgctacttcaggggacaaggaaggctacgggacttclacctggaccagtccgaacaagggagaactcaccctcctg  
10 agcacgtagacctgaccgacatctacaaggagcgggagtgatgacttaagcgcgactccatcagcggagggggccctgtaccaacaggctcacatcaagcacg  
cgggcgaca~~aacac~~ggcgtggtcagcggggctacctgcaccttgggagaagaacctgaccaacgtggagtgggaggaccggctccgggggcaacttctccgca  
tccctccaagctgcacaactactccacgacgggtgacgggtcagaactcgggcaggcagggctgcacccgggtgaggcttgaagaagcaggcaacctgtatga  
cagtgaggacaactccctgcagggaactggaccagccggctgccccagtgccgggtgacgtcaaacgcctccaccactaagtacctcagagcccgactaattccaa  
15 ccagaagaagaaccggaacaactgcgccggcagcactcctacgacaccttctggacctgcagaaggagaagccgccctggccccgcgagcgtaaagcctg  
gacaaggccgaltcatggatgggagcccctacgccacatgtttgagatgcagctggcgagagcacctttgccacaacaagtcctcagtgcccactgccggac  
accaccacaacaacccccggcggcggtatagctcagcaagtcgctctaccctgaccgggtcacgcaaacctttcatccccacttttggggacgaccagtgtt  
catggcagcaaatcctacttctcaggcagcccaggtggcggggcgctgaaagccaggccggacttccggcccttgcaccaacaagccgggtgctcggcc  
catggggccgtgccagcccgtttccagaaggacatctgtatagggaaccagtccaaccctgtgtgcctaacaacaaaacccccagggtttcaatggctccagca  
20 gcatgttatgagaacttctagtattgagctgatgtctga (SEQ ID No: 2).

En otra realización, la subunidad NR2B está codificada por una molécula de nucleótido en lugar de un homólogo de la SEQ con N°. de ID: 2. En otra realización, la molécula del nucleótido es una variante de la SEQ con N°. de ID: 2. En otra realización, la molécula del nucleótido es un isómero de la SEQ con N°. de ID: 2. En otra realización, la molécula del nucleótido es un fragmento de la SEQ con N°. de ID: 2. En otra realización, la molécula del nucleótido consiste de la SEQ con N°. de ID: 2. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otras realizaciones, la subunidad NR2B tiene una secuencia establecida en 1 de las siguientes entradas GenBank: U28861, U28862, U28758, U90278, U11287, U88963, BC113618, BC113620, y AB208850. En otras realizaciones, la subunidad NR2B tiene una secuencia que es una variante de 1 de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2B tiene una secuencia que es un homólogo de 1 de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2B tiene una secuencia que es un homólogo de 1 de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2B tiene una secuencia que es un fragmento de 1 de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2B tiene una secuencia que consiste de 1 de las secuencias de arriba. En otra realización, la subunidad NR2B está codificada por una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. En otra realización, la subunidad NR2B está codificada por un homólogo de una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. En otra realización, la subunidad NR2B está codificada por una variante de una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. En otra realización, la subunidad NR2B está codificada por un isómero de una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. Cada secuencia, cada posibilidad, representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la subunidad NR2A de los métodos y composiciones de la presente invención tiene la secuencia:

40 MGRVGYWTL~~L~~VLPALLVWRGPAPSAAAEKGPALNIAVMLGSHSDVTERELRTLWGPEQAAG

LDVNVVALLMNRTDPKSLITHVCDLMSGARIHGLVFGDDTDQEA VAQMLDFISSHTFVPILGIHGGASMI  
 ADKDPTSTFFQFGASIQQATVMLKIMQDYDWHVFSLVTTIFPGYREFISFVKTTVDNSFVGWDMQNVT  
 5 DTSFEDAQTQVQLKKIHSSVILLYCSKDEAVLILSEARSLGLTG YDFFWVPSLVSGNTELPKEFPSGLISV  
 DDWDYSLEARVRDGIGILTTAASSMLEKFSYIPEAKASCYQMERPEVPMHTLHPFMVNVVTWDGKDLS  
 EEGYQVHPRLVVIVLNKDREWEKVGK WENHTLSLRHAVWPRYKSFSDCEPDDNHL SIVTLEEAPFVIVE  
 DPLTETCVRNTVPCRKFVKINNSTNEGMNVKKCKGFCIDILK KLSRTVKFTYDLYLV TNGKHGKKNV  
 10 WNGMIGEVVYQRAVMAVGSLTINEERSEVDFSVPFVETGISVMVSRN GTVSPSAFLEPPSASVWVMN  
 VMLLIVSAIAVVFVEYFSPVGYNRNLAKGKAPHGPSFTIGKAIWLLWGLVFNNSVPVQNPKGTT SKIMVS  
 WAFFAVIFLASYTANLA AFMIQE EFVDQVTGLSDKKFQRP HDYSPFFRFGTVPNGSTERNIRN NYPYMHK  
 MTKFNQKGVEDALVSLKTGKLDAFYDAAVLNYKAGRDEGCKLVTIGSGYIFATTGYGIALQKGPWKI  
 15 IDLALLQFVG DGEMEELETLWLTGICHNEKNEVMSSQLDIDNMAGVFYMLAAAMALSLITFTWEHLFYW  
 LRFCTGVCSDRPGLLFSISRGIYSCIHG VHIIEKKKSPDFNL TGSQSNMLKLLRSAKNISSMSNMNSSRMI  
 PKRAADFIQRGSLMDMVSDKGNLMYSDNRSFQ GKESIFGDNMNELQTFVANRQKDNLN NYVFQGGHI  
 20 TLNESNPNTVEVA VSTESKANSRPRQLWKKSVDSIRQDSLSQNPVSQRDEATAENRTHSLKSPRYLPEEN  
 HSDISETSNRATCHREPDNSKNHKTKDNFKRSVASKYPKDCSEVERTYLKTKSSSPRDKIYTIDGEKEPGI  
 LDPPQFVENVTLPENVD FPDYQDPSENFRKGDSTLPMNRNPLHNEEGLSNNDQYKLYSKHFTLKDKGS  
 SETSERYRQNSTHCRSCLSNMPTYSGHFTMRSPFKCDA CLRMGNLYDIDEDQMLQETGNPATGEQVYQ  
 25 WAQNNALQLQKNKLRSRQHSYDNIVDKPRELDLSRPSRSISLKDRE RLLLEGNFYGLS LFSVPSSKLSGKK  
 FPQGLEDSKRSKSLLPDHTSDNPF LSHRDDQRLVIGRCPSPDYKHS LPSQAVNDSYLRS SLRSTASYCSF  
 SRGHNDVYISEHVMPYAANKNNMYSTPRVLN SCSNRRVYKKMPSIESDV (SEQ ID No: 3).

30 En otra realización, la subunidad NR2A es un homólogo de la SEQ con N°. de ID: 3. En otra realización, la subunidad NR2A es una variante de la SEQ con N°. de ID: 3. En otra realización, la subunidad NR2A es un isómero de la SEQ con N°. de ID: 3. En otra realización, la subunidad NR2A es un fragmento de la SEQ con N°. de ID: 3. En otra realización, la subunidad NR2A consiste de la SEQ con N°. de ID: 3. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.



En otras realizaciones, la subunidad NR2A tiene una secuencia establecida en 1 de las siguientes entradas GenBank: U09002, U90277, BC117131, AB209695, y NP\_000824. En otras realizaciones, la subunidad NR2A tiene una secuencia que es una variante de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2A tiene una secuencia que es un homólogo de 1 de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2A tiene una secuencia que es un isómero de 1 de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2A tiene una secuencia que es un fragmento de 1 de las secuencias de arriba. En otras realizaciones, la subunidad NR2A tiene una secuencia que consiste de 1 de las secuencias de arriba. En otra realización, la subunidad NR2A está codificada por una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. En otra realización, la subunidad NR2A está codificada por un homólogo de una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. En otra realización, la subunidad NR2A está codificada por una variante de una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. En otra realización, la subunidad NR2A está codificada por un isómero de una secuencia establecida en 1 de las entradas de arriba. Cada secuencia, cada posibilidad, representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la subunidad NR2C de los métodos y composiciones de la presente invención tiene la secuencia:

**RGQGGDTRSKGTRQPEPPGASRDPARSCWDPPVDMGGALGPALLLTSLFGAWAGLPGQGEQC  
 TVA VVFSSSGPPQAQFRARLTPQSFLDLPLEIQPLTVGVNTNPPSSLLTQICGLLGAHVHGVFEDNVDI  
 VAQILDFISSQTHVPILSISGGSVVLTLPKEPGSAFLQLGVSLEQQQLQVLFKVLVEEYDWSAFVITSLHPGH  
 FLEGVRAVADASHVSWRLLDVVTLELPGGPRARTQRLLRQLDAPVFVA YCSREEAEVLF AEAAQAGL  
 GPGHVWLVPNLALGSTDAPPATFPVGLISVVTESWRLSLRQKVRDGVAILALGAHSYWRQHGTLPAPAC  
 CRVHPPGVSPAREAFYRHLNVTWEGRDFSFSPGGYL VQPTMVVIALNRHRLWEMVGRWEHGVL YMF  
 PVWPRYSASLQP VVDSRHLTVATLEERPFVIVESPDPTGGCVNTPVPCRRQSNHTFSSGDVAPYTKLCC  
 GFCIDLKKLARVVKFSYDLYLVTNGKHGKRVRGVWNGMIGEVYK RADMAIGSLTINEERSEIVDFSV  
 VETGISVMVARSNGTVSPSAFLEPYSPA VVMMFMCLTVVAITVFMFEYFSPVSYNQLTRGKKSGG  
 FTIGKSVWLLWALVFNNVPIENPRGTTSKIMVLVWAFFAVIFLASYTANLA AFMIQEYIDTVSGLSDKI  
 QRPQDQYPPFRFGTVPNGSTERNIRSNYRDMHMHMVKFNQRSVEDALTS LKMGKLD AFIYDAAVLNYM  
 GKDEGCKLVTIGSGKV FATTGYGIAMQKDSHWKRAIDLALLQFLGDGETQKLETVWLSGICQNEKNEV  
 SKLDIDNMAGVFYMLLVAMGLALLVFAWEHLVYWKLRHSVPNSSQLDFLLAFSRVGAHPSPHRPFK (SEQ  
 ID No: 5).**

En otra realización, la subunidad NR2C es un homólogo de la SEQ con N°. de ID: 5. En otra realización, la subunidad NR2C es una variante de la SEQ con N°. de ID: 5. En otra realización, la subunidad NR2C es un isómero de la SEQ con N°. de ID: 5. En otra realización, la subunidad NR2C es un fragmento de la SEQ con N°. de ID: 5. En otra realización, la subunidad NR2C consiste de la SEQ con N°. de ID: 5. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la subunidad NR2C está codificada por una secuencia de nucleótido con la secuencia:



- El hallazgo de anticuerpos relacionados con NR2B en el suero y el LCR de todos los pacientes proporciona en una realización una prueba de diagnóstico para la paraneoplásica y el trastorno de encefalitis anti-NMDAR, y proporciona un mecanismo noble inmunomediado de disfunción NMDAR. En una realización, los papeles críticos de los NMDAR incluyen la transmisión y remodelación sináptica, o brotes dendríticos, y la potenciación del hipocampo a largo plazo en otras realizaciones además de un paradigma de formación de memoria y aprendizaje. En otra realización, los NMDAR son también el mediador principal de la excitotoxicidad, y su disfunción se ha asociado con la esquizofrenia, epilepsia y varios tipos de demencia. Los fármacos que interactúan con los NMDAR pueden resultar en paranoia en una realización, o alucinaciones y disquinecias en ciertas realizaciones, todos síntomas frecuentes en sujetos diagnosticados usando los métodos descritos en el presente.
- En una realización, la expresión ectópica de las subunidades NR2 por el tejido nervioso contenido en los teratomas contribuye a romper la tolerancia inmune. En otra realización, una combinación de factores como un efecto adyuvante de la enfermedad prodrómica de apariencia viral que ocurre en la mayoría de los sujetos, y una predisposición genética en ciertas realizaciones, juegan papeles adicionales en la iniciación de la respuesta inmune sometida a pruebas para usar los métodos de diagnóstico descritos en el presente.
- Un posible papel patogénico de los anticuerpos NR2 en la encefalitis paraneoplásica anti-NMDAR se muestra por la correlación entre los síntomas del paciente y los litros de anticuerpo en una realización o, en otra realización, por la demostración de depósitos de IgG en el hipocampo y la amígdala de una autopsia de paciente, en un patrón que mostró una impactante semejanza a la inmunotiquetación del cerebro de rata por anticuerpos del paciente (ver figura 6). Mientras que en otra encefalitis paraneoplásica (p.ej., Hu, Ma2) los infiltrados perivasculares e intersticiales de células T son prominentes,<sup>34, 35</sup> la encefalitis con anticuerpos NR2 se asocia con una proliferación microglial, degeneración neuronal variable, e infiltrados raros inflamatorios (figura 7). En estos pacientes y en un caso previamente reportado (#11)<sup>8</sup> las anomalías predominaron en el hipocampo y la amígdala, y en menor grado en otras áreas del neuroeje.
- En otra realización, el sujeto ha exhibido anticuerpos que reaccionan con SIZN1 (proteína del dedo de zinc con interacción Smad expresada en el sistema nervioso).
- En otra realización, el sujeto exhibe anticuerpos que reaccionan con un antígeno VGKC.
- En otra realización, el sujeto exhibe anticuerpos que reaccionan con un antígeno neuronal extracelular. En otra realización, el sujeto exhibe anticuerpos que reaccionan con un antígeno expuesto sobre la superficie de la célula de una neurona. Como se proporciona aquí (Ejemplo 9), los pacientes con anticuerpos a antígenos extracelulares exhiben, bajo las condiciones usadas en el presente, una respuesta mejorada a la inmunoterapia.
- En otra realización, un método de la presente invención utiliza, detecta, o realiza pruebas para un antígeno objetivo (diferente a una subunidad NR2B) identificado por un método divulgado en el presente. En otra realización, el antígeno objetivo se identificó por una técnica de evaluación de biblioteca. En otra realización, el antígeno objetivo se identificó por una evaluación de la biblioteca cADN. En otra realización, el antígeno objetivo se identificó por reactividad con las neuronas cultivadas. En otra realización, el antígeno objetivo se identificó por un protocolo establecido en el Ejemplo 8. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- Los métodos para realizar pruebas de una reactividad de un suero contra los antígenos neuronales son bien conocidos en la técnica. En otra realización, uno de los métodos enumerados en los ejemplos en el presente documento fue utilizado. En otra realización, el tejido neuronal se fijó con PFA. En otra realización, se utilizó cualquier otro método conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- Los métodos y kits para la detección de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Ances BM et al (Tratamiento que responde a la encefalitis límbica identificada por los anticuerpos del neurópilo: correlaciones RM y PET. *Brain* 2005, 128: 1764-1777) y Vitaliani et al (Encefalitis paraneoplásica, síntomas psiquiátricos, e hiperventilación en el teratomas del ovario. *Ann Neurol* 2005; 58:594-604.).
- Los métodos para diagnosticar la encefalitis límbica (LE) son bien conocidos en la técnica. En otra realización, los pacientes con LE desarrollaron una confusión subaguda, irritabilidad, depresión, perturbaciones del sueño, ataques repentinos, pérdida de memoria a corto plazo y/o demencia. En otra realización, el sustrato patológico de LE es un trastorno inflamatorio que involucra predominantemente el sistema límbico (hipocampo, amígdala y circunvolución cingulada). En otra realización, los estudios de biopsias y autopsias demostraron infiltrados intersticiales y perivasculares de células T, y con menos frecuencia células B, junto con la activación microglial, degeneración neural, y/o gliosis. En otra realización, los infiltrados inflamatorios se encuentran en áreas distantes del sistema límbico. En otra realización, los infiltrados permanecen leves y clínicamente silentes. En otra realización, los infiltrados se convierten en prominentes y se desarrollan en un trastorno llamado encefalomielitis. Los métodos

adicionales para diagnosticar LE se describen, por ejemplo, en Gultekin SH et al (Encefalitis límbica paraneoplásica: síntomas neurológicos, descubrimientos inmunológicos y asociación de tumores en 50 pacientes. Brain 2000;123:1481-1494). Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

5 En otra realización, un antígeno de la presente invención es homólogo a un péptido divulgado en el presente. Los términos "homología", "homólogo", etc., cuando hacen una referencia a cualquier proteína o péptido, se refiere, en una realización, a un porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los  
10 residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de homología, y no considerar cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. Los métodos y programas de computación para la alineación son bien conocidos en la técnica.

La homología es, en otra realización, determinada por un algoritmo de computadora para la secuencia de alineación, por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un análisis del algoritmo de computadora de la homología de  
15 la secuencia del ácido nucleico puede incluir la utilización de cualquier número de paquetes de software disponibles, como, por ejemplo, el BLAST DOMAIN, BEAUTY (Utilidad de alineación mejorada BLAST), paquetes GENPEPT y TREMBL.

En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una secuencia seleccionada de la SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 70%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una secuencia seleccionada de la SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 72%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 75%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una secuencia  
20 seleccionada de la SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 78%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 80%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 82%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una secuencia seleccionada de la SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 83%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 85%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 87%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una secuencia seleccionada de la SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 88%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 90%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 92%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 93%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 95%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 96%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 97%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 98%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 mayor del 99%. En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad a una de SEQ de N°. de ID: 1 a 6 del 100%. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

40 En otra realización, la homología se determina a través de la determinación de la secuencia candidato de hibridación, métodos bien conocidos en la técnica (Ver, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridation" Hames, B.D., y Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y). En otras realizaciones, los métodos de hibridación se llevaron a cabo bajo condiciones moderadas a rigurosas, al complemento de una codificación ADN a un péptido caspasa nativo. Las condiciones de hibridación son, por ejemplo, la incubación durante la noche a 42 °C en una solución que consiste de: formamida 10-20 %, 5 X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato trisódico), 50 mM fosfato de sodio (pH 7. 6), 5 X solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextran, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cizallado.

50 La homología a proteína y/o péptido para cualquier secuencia de AA listada en el presente se determinó, en otra realización, por métodos conocidos en la técnica, incluyendo análisis de inmunotransferencia, o a través de análisis de algoritmo del ordenador de las secuencias de AA, utilizando cualquier número de paquetes de software disponibles, a través de métodos establecidos. Algunos de estos paquetes incluyen los paquetes FASTA, BLAST, MPsrch o Scanps, y, en otra realización, emplea el uso del algoritmo Smith y Waterman, y/o alineaciones globales/locales de BLOQUES para análisis, por ejemplo. Cada método para determinar la homología representa una realización separada de la presente invención.

60 En otra realización de la presente invención, los "ácidos nucleicos" o "nucleótidos" se refieren a una cadena de al menos dos combinaciones de la base azúcar-fosfato. El término incluye, en una realización, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en una realización, a las unidades monoméricas de los polímeros del ácido nucleico. El ARN está, en una realización, en la forma de un tARN (ARN de transferencia), snARN (ARN nuclear pequeño), rARN (ARN ribosoma), mARN (ARN mensajero), ARN antisentido, ARN pequeño inhibidor (siARN), ARN micro

(miARN) y ribosomas. Ya se ha descrito el uso de siARN y miARN (Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96 y referencias citadas en el mismo). El ADN puede estar, en otras realizaciones, en la forma de ADN plásmido, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosomal o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden ser de hebras simples, dobles, triples o cuádruples. El término también incluye, en otra realización, ácidos nucleicos artificiales que contienen otros tipos de estructuras fundamentales pero con las mismas bases. En una realización, el ácido nucleico artificial es un ANP (ácido nucleico péptido). El ANP contiene estructuras fundamentales de péptido y bases de nucleótido y son capaces de unirse, en una realización, a ambas moléculas de ADN y ARN. En otra realización, el nucleótido es oxiteno modificado. En otra realización, el nucleótido es modificado al remplazar uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra realización, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la estructura fundamental del fosfato de ácidos nucleicos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos fosforotioatos y ANP son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica, y se describen en, por ejemplo, Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; y Raz NK et al Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos es conocida por aquellos con experiencia en la técnica y se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook y Russell, Ed. y Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio y G.C. Fareed. Cada derivado de ácidos nucleicos representa una realización separada de la presente invención.

#### SECCIÓN DE DETALLES EXPERIMENTALES

#### 20 EJEMPLO 1: Encefalitis paraneoplásica del receptor anti-NMDA asociada con el teratoma del ovario MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

##### Selección de pacientes

25 Los pacientes incluyen 12 mujeres con encefalitis paraneoplásica asociada con teratomas. Las 6 pacientes identificadas más recientemente y los descubrimientos neuropatológicos (2 casos) se describen a detalle en los archivos suplementarios, las características clínicas de las otras 6 pacientes se ha reportado previamente. El suero congelado o líquido cefalorraquídeo estaba disponible para todas las 12 pacientes. Los tejidos para estudios inmunológicos incluyeron tumores de 5 pacientes (1 tejido congelado, 4 incorporados en parafina), y un cerebro obtenido en la autopsia de 1 paciente y 2 individuos neurológicamente normales. Los sueros o LCR de 200 individuos, incluyendo donantes de sangre y pacientes con diversas encefalitis paraneoplásicas y no paraneoplásicas sirvieron como controles. Los estudios fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Pensilvania.

##### 35 Tejido animal, anticuerpos, y biotilación de IgG

Se sacrificaron ratas Wistar omitiendo la perfusión con sustancias salinas o fijadoras; se extrajo el cerebro, se sumergió en paraformaldeido al 4% (PFA) a 4°C por 24 horas, se preservaron criogénicamente con sacarosa al 40%, se seccionó sagitalmente y se congeló instantáneamente con nitrógeno líquido. Los siguientes anticuerpos se usaron en las diluciones indicadas: anti-MAP2 de pollo (Covance, Princeton, NJ; 1:20,000); anti-NR 1 de conejo (aminoácidos 1-20) y anti-NR2A de conejo (aminoácidos 1265-1464) (ambos de Upstate biotechnology, Lake Placid, NY, ambos a 1:50); anti-NR2B de conejo (secuencia de 251 aminoácidos de la porción terminal de NMDAR; Zymed, San Francisco, CA, 1:50); CD3, CD19 y CD68 (DakoCytomation, Carpinteria, CA, todos 1:100).

45 Para evitar la reactividad con IgG endógeno, todos los estudios inmunohistoquímicos con el tejido del tumor utilizaron IgG purificado del suero de los pacientes y etiquetado con biotina.

##### Inmunohistoquímica

50 El tejido incorporado en parafina fue desparafinado y se recuperaron los antígenos, como se reportó<sup>10</sup>. Secciones de tejido congelado de siete micrones de grosor (o parafina de 4 micrones de grosor) se incubaron en serie con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% por 20 minutos, suero de cabra al 10% por 1 hora, y suero del paciente (1: 250), LCR (1: 10) o IgG biotilado (0,2 mg/ml), o los anticuerpos comprados indicados durante la noche a 4°C. Después de usar los anticuerpos secundarios adecuados (todos 1: 2000), se desarrollaron reactividades con el método avidina-biotina-peroxidasa. El anticuerpo secundario se omitió cuando se usó el IgG biotilado del paciente. El suero humano normal y el IgG biotilado, y el suero normal de cabra sirvieron como controles. Se realizó un inmunoetiquetado doble con los anticuerpos IgG, MAP2 y NR2 del paciente usando los anticuerpos secundarios Alexa Fluor adecuados diluidos 1: 2000 (Molecular Probes, OR); los resultados se fotografiaron bajo un microscopio fluorescente usando software Zeiss Axiovision.

##### 60 Inmunocitoquímica

Los cultivos de las neuronas del hipocampo de la rata se prepararon como se reportó<sup>11</sup>. 11 neuronas vivas crecidas sobre cubreobjetos se expusieron por 1 hora a 37°C al suero de las pacientes o al de control (dilución final 1:1000) o LCR (1:100). Después de retirar el medio y tras un lavado intenso, las neuronas se fijaron con PFA al 4%, y se realizó un inmunotiquetado sencillo o doble, como se indicó arriba. La reactividad de los anticuerpos comerciales a las subunidades NR1 y NR2 se vio mejor con la permeabilización de la célula (Triton al 0,1%) después de PFA.

Las células HEK293 se transfectaron con plásmidos que contenían subunidades NR1, NR2A o NR2B del NMDAR (>90% homólogos a las subunidades humanas en los dominios extracelulares) del roedor o plásmidos sin inserto (control), como se reportó. En otros experimentos las células fueron co-transfectadas con NR1 y NR2A (o NR1 y NR2B) en proporciones equimolares. Las células se crecieron por 24 horas después de la transfección antes de la evaluación. Todas las células se crecieron rutinariamente en la presencia de antagonistas NMDAR (500 mM ketamina) para evitar la muerte de las células después de la transfección<sup>15</sup>. Las células transfectadas fueron incubadas con el suero del paciente (1:400) o LCR (1:10) durante la noche a 4°C, y los anticuerpos secundarios correspondientes Alexa Fluor, como se indica arriba.

## RESULTADOS

### Hallazgos neurológicos

La edad media de las pacientes era de 27 años (rango de 14 a 44 años). En 11 pacientes los síntomas neurológicos antecedían al diagnóstico del teratoma por 3 semanas-4 meses (media de 2 meses) y en 1 paciente ocurrieron después de haber detectado radiológicamente un quiste de ovario un mes antes. Diez pacientes tenían un síndrome prodrómico de apariencia viral con hipertermia; (7 casos) y dolores de cabeza frecuentes (6 casos) (Tabla 1).

Tres de las 12 pacientes presentaron pérdida de memoria a corto plazo, seguido de síntomas psiquiátricos o confusión y una disminución en el nivel de consciencia (Tabla 1). Las otras 9 pacientes presentaron un síndrome psiquiátrico agudo, incluyendo cambios de personalidad y comportamiento, agitación o pensamientos paranoicos. En general, 6 de las pacientes fueron evaluadas por psiquiatras y 5 fueron admitidas a unidades psiquiátricas. Once pacientes desarrollaron crisis epilépticas complejas generalizadas o parciales. Después de controlar las crisis epilépticas, 10 de las pacientes requirieron de ventilación mecánica debido a una disminución en el nivel de consciencia e hipoventilación en 9 casos, y un embolismo pulmonar en 1; el tiempo medio en que las pacientes estuvieron bajo ventilación mecánica fue de 12 semanas (2 a 16 semanas). Durante ese tiempo, múltiples EEG mostraron una desaceleración difusa generalizada en 7 pacientes, y una desaceleración generalizada con actividad epiléptica ocasiona en las otras 3.

Durante el transcurso de la enfermedad, 8 pacientes desarrollaron episodios de hipertermia alterándose en 1 caso con hipotermia (Tabla 1). 7 pacientes desarrollaron movimientos anormales que incluían uno o más de los siguientes: coreoatetosis, movimientos mioclónicos y balísticos, movimientos distónicos, disquinesias en la cara y los brazos, contracciones rítmicas de la pared abdominal, posturas similares a opistótonos, y episodios similares al estado catatónico. 5 pacientes tuvieron señales de inestabilidad autónoma incluyendo episodios de midriasis, taquicardia, taquipnea, diaforesis o hipertensión los cuales en 1 caso se alternaban con hipotensión. 4 pacientes desarrollaron una disfunción transitoria del sueño mientras se recuperaban de la encefalitis

Tabla 1: Características clínicas

Caso Sexo/ edad	Teratoma: histología, lado, tamaño	Tiempo diagnóstico de tumor	Pródromo	Síntomas que se presentan	Otros síntomas y hallazgos durante el transcurso del padecimiento
# 1 F/30	inmaduro, ovario derecho, 10 cm	2 meses	dolor de cabeza, hipertermia	STMD, nivel disminuido de consciencia, "epilepsia parcial continua" por 2 semanas. Sedación, ventilación mecánica, PEG	Inquietud, movimientos involuntarios hipertermia
# 2 F/35	maduro, ovario izquierdo, 3,5 cm	4 meses (autopsia)	dolor de cabeza, nauseas, sin fiebre; recibió acetaminofén	STMD, convulsión tónico-clónica generalizada seguida de estado refractario epiléptico. Sedación, ventilación mecánica y PEG	Convulsiones motoras parciales en el lado izquierdo de la extremidad; movimientos distónicos; hipertermia.
# 3 F/25	maduro, ovario izquierdo, 6cm	6 semanas	hipertermia	STMD, ataques de pánico, confusión, alucinaciones (internada en centro psiquiátrico). Posteriormente, crisis epilépticas parciales complejas, TPN, PEG.	Episodios de miradas fijas; reacción mínima al estímulo. Episodios similares a catatónicos. Inestabilidad autónoma: taquicardia, hipertensión.
# 4 F/17	inmaduro, ovario izquierdo, 7 cm	4 semanas	hipertermia	Comportamiento extraño, pensamiento desorganizado, inquietud, rondar sin objetivo, alucinaciones, episodios similares a los catatónicos (2internaciones en centros psiquiátricos). Posteriormente, estado epiléptico. Sedación, ventilación mecánica.	Habla incoherente; episodios de miradas fijas, catatonía, crisis oculogíricas, movimientos coreoatetósicos. Inestabilidad autónoma: hipertermia; midriasis durante episodios de inquietud y agitación.

(continuación)

Caso Sexo/ edad	Teratoma: histología, lado, tamaño	Tiempo diagnóstico de tumor	a Prodomo	Síntomas que se presentan	Otros síntomas y hallazgos durante el transcurso del padecimiento
# 5 F/32	maduro, ovario derecho, 6cm	2 meses	NC	Desarrollo agudo de cambio de personalidad, comportamiento anormal, confuso, agitado, divagando (internaciones psiquiátricas). convulsiones tónico-clónicas generalizadas, convulsiones motores parciales, encefalopatía grave general, PEG.	Incapaz de hablar y seguir ordenes por 2 meses; episodios de "tics faciales".
# 6 F/24	maduro, ovario derecho, 1,5 cm	3 meses (autopsia)	dolor de cabeza, hipenhermia, nauseas, vómito, diarrea	Pensamientos paranoicos, alucinaciones auditivas, agitación (internación psiquiátrica). Posteriormente, convulsiones tónico-clónicas generalizadas, sedación, ventilación mecánica, PEG. Permaneció con un nivel reducido de consciencia y dependiendo del ventilador.	Movimientos mioclónicos y disquinecias en brazos y cara. Inestabilidad autónoma: hipohipertermia alternante; hipohipertensión. Durante los periodos de vigilia, taquipnea; durante los periodos de sueño, problema que activa el ventilador.
<b>Pacientes previamente reportados</b>					
# 76 F/19	inmaduro, ovario derecho, 22 cm	4 meses	dolor de cabeza, hipertermia	Cambio de personalidad agudo, comportamiento agresivo (visto en el centro psiquiátrico). Confusión progresiva, disminución del nivel de consciencia. Crisis epilépticas generales y parciales, estado refractario epiléptico. Sedación, ventilación mecánica, PEG.	Episodios de "masticar, muecas"; movimientos mioclónicos y balísticos con las extremidades; contracciones rítmicas de la pared abdominal. Movimientos distónicos del tronco y extremidades;

					postura similar a opistótono; insomnio-hipersomnia.
# 84 F/26	quiste dermoide ovario izquierdo por CT*, 1,6 cm	3 semanas	anorexia e insomnio (3 semanas)	Síndrome psiquiátrico, crisis epilépticas generalizadas, ventilación mecánica, PEG	Habla incomprensible, nivel reducido de consciencia, STMD, Hipertermia
# 94 F/40	maduro, ovario izquierdo, 6,0 cm	3 semanas	NC	Crisis epilépticas generalizadas secundarias, síndrome psiquiátrico, ventilación mecánica, PEG	Nivel reducido de consciencia, STMD

(continuación)

<b>Pacientes previamente reportados</b>					
# 104,8 F/14	inmaduro, ovario izquierdo, 1,9 cm	2 meses	hipertermia, dolor de cabeza, rinorrea	Síndrome psiquiátrico (alucinaciones, pánico extremo), crisis epilépticas generalizadas, ventilación mecánica, PEG	Habla incomprensible, movimientos coreoatetósicos, hipersomnia, hipertermia, inestabilidad autónoma
# 114,7 F/28	1º: maduro, ovario derecho, 14 cm;  2º: "benigno", izquierdo, 2 cm;  3º: "benigno", izquierdo, 1,7 cm	1 mes después del tumor	tos, sin fiebre; recibió antibióticos	1 <sup>er</sup> episodio síndrome psiquiátrico (pensamiento delirante, cambio de personalidad), alucinaciones auditivas, STMD, disfagia, nistagmo horizontal, parálisis de la mirada vertical, ventilación mecánica 2º episodio disartria; 3 <sup>er</sup> episodio: diplopia, insensibilidad facial, disfagia, ataxia.	1 <sup>er</sup> episodio: hipersomnia, comatosa, paraplejia flácida.
# 125 F/44	maduro, mediastino, 6,5 cm	3 semanas	hipertermia, dolor de cabeza	Internación psiquiátrica por agitación aguda, cambio de personalidad, pérdida de memoria,	Dificultad para encontrar palabras, hemiparesis leve derecha, episodios de diaforesis, hiperinsomnio, dolor

				convulsiones tónico-clónicas generalizadas, ventilación mecánica por embolismo pulmonar, PEG	de cabeza.
--	--	--	--	--	------------

Pruebas auxiliares

- 5 Todas las pacientes se sometieron a varios MRI del cerebro en la etapa temprana del trastorno (Tabla 2): 3 tenían hiperintensidades FLAIR del lóbulo temporal medio bilateral (1 con el involucramiento de la corteza parietal derecha) (Figura 5), 5 tenían una áreas punteadas de hiperintensidad FLAIR o T2 en la corteza frontal o parietal (2 con involucramiento del cerebelo) y una leve mejora de las meninges superpuestas; 1 tenía hiperintensidad T2 transitoria en la médula y médula espinal, y tuvo hallazgos normales o no específicos.
- 10 Se identificó pleocitosis linfocítica LCR en todos los pacientes (9-219 células/1h, media 24), y 4 tenían una concentración elevada de proteína (56-129 mg/dL, media 67); la concentración de glucosa fue normal en todas las instancias (Tabla 2). Se identificaron bandas oligoclonales en 3 de 6 pacientes examinados. Todas las pacientes tuvieron pruebas de extensas de diagnóstico de suero y CSF con resultados negativos o normales para infecciones virales, bacterianas, micóticas, trastornos autoinmunes colágeno-vasculares, autoinmunidad tiroidea, y paneles exhaustivos de anticuerpos paraneoplásicos y VGKC.
- 15

Tabla 2: Pruebas de diagnóstico, tratamiento y resultado

Caso	MRI en la presentación	LCR	Lista cronológica de tratamientos (inmunoterapia y tumor)	Mejora inicial	Resultado (duración del seguimiento)
#1	Hiperintensidad FLAIR y T2 en los lóbulos medios temporales	40 WBC, proteína 67	corticoesteroides, intercambio de plasma, IVIg  (extirpación del tumor)	Mejora parcial clínica y MRI antes de la cirugía. Mejora adicional 4 semanas después de la cirugía	De regreso al trabajo como un residente de medicina interna; MRI normal (12 meses)
#2	Hiperintensidad FLAIR y T2 en los lóbulos medios temporales	189 WBC, proteína 68  (+) OGB	corticoesteroides, intercambio de plasma, IVIg, ciclofosfamida	Sin cirugía (no mejoró)	MRI de seguimiento: atrofia grave principalmente en los lóbulos temporales. Murió 4 meses después de la presentación de síntomas.
#3	MRI inicial normal. MRI subsecuente: FLAIR hiperintensidad en los lóbulos medios temporales y la corteza frontal derecha	15 WBC, proteína normal  (-) OGB	corticoesteroides, (extirpación del tumor), intercambio de plasma	Tres días después de la cirugía	examen normal; MRI normal (12 meses).
#4	Anormalidad punteada FLAIR	26 WBC,	intercambio de plasma,	12 días después de la cirugía,	De regreso a la escuela

ES 2 443 490 T3

	única en el lóbulo frontal derecho. Dos MRI subsecuentes: normal	proteína normal	IVIg, (extirpación del tumor), corticoesteroides y ciclofosfamida	y 3 días postcorticosteroides y bolo de ciclofosfamida: mejora sorprendente, capaz de comunicarse y ser desentubada	preparatoria con buenas calificaciones. Examen norma; MRI normal (7 meses).
# 5	Dos MRI normales	20 WBC, proteína 56	corticoesteroides intercambio de plasma (2 días) (extirpación de tumor), intercambio de plasma (3 días)	2 días después del intercambio de plasma (1 día antes de la cirugía). Tres días después de la cirugía: capaz de sentarse, hablar, comer.	Examen normal; MRI normal (7 meses).
# 6	Hiperintensidad T2 en la cisura de los hemisferios parietales; leve mejora de las meninges superpuestas.	219 WBC, proteína 129, (+) OGB	corticoesteroides	Sin cirugía (no mejoró)	Murió 3 meses después de la presentación de síntomas.

(continuación)

# 7 <sup>6</sup>	Pequeña anomalía FLAIR en el cerebelo. Mejora leve de las meninges de los surcos cerebrales.	12 WBC, proteína normal	Corticoesteroides, IVlg,  (extirpación de tumor) y quimioterapia	4 semanas después de la cirugía	Insomnio hipersomnia alternante por 7 meses. Recuperación total de la función motora, pero MMSE 24/30 (leve STMD). MRI: atrofia frontotemporal (16 meses).
# 8 <sup>4</sup>	Hiperintensidades FLAIR/T2 en la corteza cerebral y el cerebelo; mejora leve cortical cerebral.	49 WBC, proteína 67	Corticoesteroides	~ 7 semanas	Total recuperación; MRI normal (24 meses).
# 9 <sup>4</sup>	Anormalidades FLAIR que involucran el cíngulo y la materia gris de los lóbulos frontales	9 WBC, proteína normal	extirpación del tumor	~ 6 semanas	Disfunción cognitiva residual y problema de memoria, MMSE 28/30 (6 años).
# 10 <sup>4,8</sup>	Tres MRI normales	115 WBC, proteína 92  (+) OGB	extirpación del tumor, intercambio de plasma, corticoesteroides, IVlg	transferida a una instalación de cuidado crónico con ventilación mecánica (sin mejora importante)	Muerte inesperada después de leve mejora, ~ 6 meses después de la presentación de síntomas.
# 11 <sup>4,7</sup>	Hiperintensidad T2 en el aspecto dorsal de la médula y 3 áreas similares en la médula espinal.	<u>1<sup>er</sup> episodio:</u> 23 WBC, proteína 61  <u>2<sup>o</sup>, 3<sup>er</sup> episodios:</u> normal.  (-) OGB	<u>cada episodio:</u> extirpación de tumor, IVlg, corticoesteroides	<u>1<sup>er</sup> episodio:</u> 8 semanas <u>2<sup>o</sup> episodio:</u> 6 semanas <u>3<sup>er</sup> episodio:</u> 2 semanas	<u>1<sup>er</sup> episodio:</u> recuperó la memoria y la función cognitiva; leves discstesias troncales residuales (6 meses) <u>2<sup>o</sup>, 3<sup>er</sup> episodios:</u> recuperación completa (22 meses)
# 12 <sup>6</sup>	Focos dispersos no específicos de hiperintensidad	15 WBC, proteína 18, (-) OGB	extirpación del tumor	~1 semana después de la cirugía	Total recuperación; MRI sin cambiar, 4 años.

	T2 en los lóbulos frontales. No mejora contrastante				
--	---	--	--	--	--

Tumores asociados

5 TC del pecho, abdomen y pelvis reveló una masa en el ovario en 10 pacientes, un tumor en el mediastino anterior en 1, y ninguna evidencia de tumores en 1 (el tumor se demostró en la autopsia). El tamaño radiológico de los tumores varió de 1,5 a 22 cm (diámetro más grande medio 6,5 cm) (Tabla 1). Dos pacientes (casos #1 y 7) tuvieron un crecimiento importante durante el proceso de encefalitis (Figura 6A y B). Solamente un paciente tuvo niveles elevados de EA, CA125 y  $\alpha$ -fetoproteína. Un paciente tenía un historial de un teratoma contralateral reseccionado (sin encefalitis acompañante), y otro paciente tuvo 3 episodios de síntomas neurológicos, cada uno anunciando un teratoma nuevo o maduro recurrente (se midieron anticuerpos NR2 en la última recurrencia)

10 Nueve pacientes tuvieron una resección completa del tumor y 3 no tuvieron cirugía (el tumor de 2 de estos casos se estudió en la autopsia). En general, los estudios patológicos mostraron que 7 pacientes tenían un teratoma maduro (6 ovario, 1 mediastino) y 4 teratomas inmaduros. La revisión de las placas de los 8 teratomas del ovario demostraron en todos los casos un tejido nervioso entremezclado con tejidos derivados de las otras capas germinales; el tejido de estos 5 tumores estuvo disponible para estudios inmunológicos (descritos a continuación).

20 Tratamiento y resultado

Se trataron siete pacientes con una resección de tumor e inmunosupresores (1 con quimioterapia adicional): 6 se recuperaron y 1 murió inesperadamente en una instalación de cuidados crónicos después de una leve mejora (Tabla 2). 5 de los 6 pacientes que se recuperaron, regresaron a trabajar y los MRI de seguimiento fueron normales; el sexto paciente tuvo una recuperación parcial (MMSE 24/30) y desarrolló una atrofia leve fronto-temporal.

30 Las otras 5 pacientes fueron tratadas solamente con cirugía (2 casos) o inmunosupresores (3). Tres pacientes se recuperaron (2 regresaron a trabajar; 1 con recuperación parcial MMSE 28/30 y las otras 2 murieron de progresión neurológica (ambas sin extirpación del tumor). En una de estas pacientes (caso #2), los corticoesteroides, el intercambio de plasma y el IVIg no tuvieron efecto sobre los síntomas y la pleocitosis en el LCR; múltiples MRI revelaron una atrofia progresiva, especialmente en los lóbulos temporales y el hipocampo. Siete semanas antes de su muerte, ella recibió ciclofosfamida que resultó en la normalización de LCR pero no en una recuperación clínica. En la otra paciente fallecida (caso #6) el teratomas del ovario se descubrió en la autopsia; entre muchas pruebas diagnósticas esta paciente se había sometido a una biopsia de cerebro. Los hallazgos neuropatológicos de estas 2

35 Los anticuerpos de los pacientes reaccionan con los antígenos de la membrana celular neuronal preferentemente expresada en el hipocampo

40 El LCR y el suero de todas las 12 pacientes, pero no los controles, mostraron un patrón distintivo de reactividad con el neurópilo del hipocampo de las ratas, la reactividad con las otras regiones del prosencéfalo fueron menos intensas, y difícilmente visibles en el cerebelo (Figura 3 A). La inmunoetiquetación ocurrió predominantemente con la membrana celular de neuronas y fue muy intensa en la capa molecular del hipocampo (Figura 3 B). La adición de LCR o suero de los pacientes, pero no de los controles, a los cultivos de neuronas vivas del hipocampo de rata, produjo un inmunoetiquetado sorprendente de la superficie celular y las dendritas (Figura 3 C). Los anticuerpos de control a antígenos intracelulares (p.ej., HuD) no produjeron reactividad con neuronas vivas, pero mostraron reactividad intracelular con las neuronas permeabilizadas (no se muestran los datos). Estos hallazgos indican que los anticuerpos de las pacientes reconocen los epitopes expuestos sobre la superficie de la célula.

50 Usando tejido de cerebro de rata y diluciones en serie de IgG total normalizado en muestras pares de suero y LCR, 8 de 11 pacientes tuvieron evidencia de síntesis intratecal de anticuerpos (en 2 pacientes los anticuerpos muy apenas se detectaban en el suero). Titulaciones del anticuerpo del suero se realizaron en 8 pacientes: todos los 7 pacientes con mejora neurológica tuvieron una disminución de título (en 5 se convirtió en no detectable), y 1 que murió de progresión neurológica tuvo un aumento de título (desde 1:200 a 1:1,600).

55 Los antígenos principales son heterómeros funcionales de NMDAR

La doble inmunotiquetación de neuronas del cerebro y del hipocampo ratas usando los anticuerpos del paciente y los diversos marcadores de los auto antígenos del candidato demostraron una colocalización importante con la subunidad NR2B del NMDAR (Figura 3CE). Debido a que esta subunidad se expresó preferencialmente en el hipocampo y el prosencéfalo (y ausente del cerebelo) formando heterómeros con NR1 o con NR1 y NR2A, examinamos subsecuentemente la reactividad de los anticuerpos de los pacientes con las células HEK293 expresando subunidades individuales (NR1, NR2A o NR2B) o una combinación de subunidades requeridas para un receptor funcional (heterómeros NR1/NR2B o NR1/NR2A). Estos estudios demostraron que el suero y el LCR de todas las 12 pacientes reaccionó con los heterómeros NR1/NR2 que contenían NR2B; los sueros y LCR de 8 pacientes también reconocieron los heterómeros que contenían NR1/NR2A (Figura 7). El suero no reaccionó con las células transfectadas con las subunidades individuales (NR1, NR2A o NR2B). Estos anticuerpos no fueron identificados en un grupo extenso de los sueros y LCR de control, incluyendo, entre otros, 6 pacientes con teratomas testiculares y encefalitis anti-Ma2 paraneoplásica.

La inmunotransferencia de las proteínas de la membrana aislada de las neuronas del hipocampo o las células HEK293 que expresan heterómeros NR1/NR2B o NR1/NR2A mostraron reactividad con los anticuerpos disponibles comercialmente (NR1, NR2A, NR2B) pero no reaccionaron con el LCR o el suero de los pacientes (no se muestran los datos). En general, estos hallazgos indican que los anticuerpos de las pacientes reconocen los heterómeros NR1/NR2 que contienen la subunidad NR2B (y en menor grado NR2A) del NMDAR, y sugieren que los epitopes son conformacionales.

Posteriormente se examinó si los tumores de las pacientes contenían tejido nervioso expresando NMDAR y si estos receptores eran reconocidos por los anticuerpos de las pacientes. Cinco de los 5 tumores examinados mostraron neuronas de apariencia madura e inmadura a lo largo de la red densa variable de fibras expresando MAP2 (un marcador de neuronas y procesos dendríticos) (Figura 8A y B). Este tejido nervioso atípico tenía intensas expresiones de las subunidades NR2 de NMDAR; se observó la colocalización de las reactividades cuando los tumores se incubaban con anticuerpos contra NR2B o NR2A disponibles comercialmente y con anticuerpos de las pacientes (Figura 8C-H).

## EJEMPLO 2: IDENTIFICACIÓN DE RESPUESTAS INMUNES EN PACIENTES CON ENCEFALITIS AUTOINMUNE DE ETIOLOGÍA DESCONOCIDA

### MATERIALES Y MÉTODO EXPERIMENTAL

Tejido fijo en paraformaldehído (PFA).

Las ratas fueron anestesiadas y eutanizadas por decapitación sin perfusión de tejido; se extrajeron los cerebros y se mantuvieron por 10 días en PFA al 4% a 4°C. Posteriormente, los cerebros se protegieron criogénicamente con sacarosa al 30% durante 48 hr, se incrustaron en un medio congelante, y se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido.

Otros procesamientos del tejido

Los cerebros de las ratas desarrollados con PFA al 4% fueron removidos y se mantuvieron en PFA al 4% por 1 hr, y posteriormente protegidos criogénicamente e incrustados en medio congelante como se indica arriba. Los cerebros de ratas no desarrollados se sacaron y se incrustaron directamente en el medio congelante sin fijador.

Inmunotransferencia e inmunohistoquímica

El suero (diluido 1:500) y el LCR (1:10) fueron examinados por anticuerpos usando la prueba de peroxidasa avidina-biotina de inmunotransferencia, como se reportó. La inmunotransferencia incluyó extractos de proteínas (100 microgramos (mcg)/ml) de neuronas corticales humanas purificadas, células Purkinje y proteínas combinadas, HuD, Cdr2, Nova, Ma1, Ma2, CRMP5 y amfifisina.

Se llevaron a cabo pruebas inmunohistoquímicas con secciones criocortadas de 7 mm de grosor montadas directamente sobre los portaobjetos. Se incubó tejido no prefijado por 10 min con acetona o metanol-acetona a 4 °C. Posteriormente, todas las secciones de tejido se incubaron en serie con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,25% por 20 min, suero de cabra al 10% por 30 min, el suero o el LCR del paciente a las diluciones indicadas en de suero de cabra al 10% durante la noche a 4 °C, IgG antihumano de cabra biotinilado (1: 2000) por 2 hr y peroxidasa avidina-biotina por 1 hr, y la reactividad se desarrolló con diaminobencidina. Otros anticuerpos primarios usados en las secciones de tejido consecutivas incluyeron: anticuerpos de conejo policlonales contra VGKC Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6 (dilución 1:50, todos de Sigma, St. Louis, MO); un anticuerpo monoclonal contra Kv1.2 (1:50; Upstate Laboratories, Lake Placid, NY); un anticuerpo policlonal contra sinaptofisin (1:1000, Sigma); un anticuerpo monoclonal contra espinofilina (1:50 Upstate Laboratories); y suero de control humano con amfifisina y anticuerpos Hu (1:500).

La síntesis intratecal de anticuerpos se determinó usando muestras de sueros y de LCR normalizadas con la misma concentración de IgG y se diluyó en serie en paralelo. Se consideró que los pacientes tienen síntesis intratecal de anticuerpos si el punto de dilución final de LCR mostraba reactividad que ya no estaba presente en el suero emparejado que contenía la misma cantidad de IgG.

## RESULTADOS

Varias pacientes que mostraban encefalitis de etiología desconocida o "LE paraneoplásica posible" fueron sometidos a pruebas para inmunidad anti-Ma. Mientras que algunas pacientes resultaron positivas a Ma, las pruebas serológicas en muchos de los casos resultaron negativas para todos los anticuerpos paraneoplásicos conocidos al igual que para otros anticuerpos que se pueden asociar con la encefalitis, perturbaciones de la memoria o crisis epilépticas, como los anticuerpos contra el VGKC, anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea, anticuerpos contra decarboxilasa del ácido glutámico (GAD), y anticuerpos asociados con trastornos como el lupus y Sjogren. Debido a que la sospecha de una etiología paraneoplásica era alta, se llevaron a cabo evaluaciones de cáncer a pesar de la ausencia de anticuerpos paraneoplásicos conocidos. Un TC del cuerpo con FDG-PET en 7 de las primeras pacientes estudiadas demostró un tumor en 4. Estos hallazgos, junto con la detección de anomalías de LCR similares a aquellas encontradas en los trastornos inmunomediados y en la mejora de algunas pacientes con la inmunoterapia, nos condujeron a la postulación de que los mecanismos inmunes estaban involucrados pero los métodos de evaluación actuales eran insensibles a los mismos.

Entonces se diseñaron varios métodos inmunohistoquímicos y estrategias de fijación de tejido diferentes. Por ejemplo, además de usar cerebro desarrollado de rata, se usó cerebro no desarrollado fijo en paraformaldehído (PFA) y protegido criogénicamente con sacarosa, y también el inmunotiquetado de cultivos vivos de las neuronas de la rata (del hipocampo, corteza, etc.). Estos métodos permitieron visualizar los anticuerpos que eran apenas detectables o que no se detectaban completamente con otros fijadores (p.ej., los anticuerpos contra la amfifisina, el GAD o el VGKC no se detectaban con acetona o metanol-acetona). El examen de los sueros o del LCR de las 7 pacientes que dieron resultados negativos a anticuerpos por la evaluación rutinaria revelaron que 6 tenían una intensa reactividad predominantemente concentrada en el neuropilo del hipocampo o del cerebelo, involucrando regiones enriquecidas en dendritas y sinapsis y en gran medida evitando las neuronas del citoplasma y del núcleo (Figura 1). La apariencia inmunohistoquímica de la membrana celular, teñido dendrítico y sináptico (Figura 2A) fue soportado por colocalización parcial con marcadores conocidos, incluyendo entre otros, espinofilina (espinas dendríticas), sinaptofisina (sinapsis), psd95 (marcador post-sinapsis), y con menos frecuencia sv2 (marcados pre-sinapsis) (Figuras 2B-C). Solo 1/7 pacientes tuvo anticuerpos contra VGKC (confirmado por el doble etiquetado con anticuerpos específicos Kv1.1 y Kv1.2, y una prueba inmunoradiológica de dendrotoxina). Los estudios de inmunocompetencia demostraron que 3 / 5 de los casos con anticuerpos nobles a antígenos de la membrana celular compitieron por los mismos epítopes; por ejemplo, la pre-incubación del tejido o células con suero de una paciente anulaban la reactividad de los otros IgG biotinilados de la paciente sugiriendo que tienen como objetivo el mismo o los mismos auto-antígenos.

Posteriormente, se reclutaron sujetos con LE. Dentro de la categoría de pacientes con LE y anticuerpos de membrana celular noble, se identificó un grupo de mujeres jóvenes con teratomas del ovario. La cohorte inicial fue 4 mujeres jóvenes, de edades de 14 a 40 años, quienes presentaron un episodio psicótico agudo grave que se creía que era secundario a fingir estar enferma o a un abuso de drogas no corroborado. Estas pacientes tenían agitación, paranoia y pensamientos ilusorios, pérdida de memoria, crisis epilépticas, disminución progresiva del nivel de consciencia e hiperventilación central. Todas tenían evidencia de involucramiento del lóbulo temporal MRI o FDGPET y anomalías inflamatorias del LCR, pero ninguna tenía anticuerpos del suero o del LCR contra proteínas Ma u otros antígenos bien caracterizados. Usando los métodos inmuno-histoquímicos modificados, se encontró que el suero y/o LCR de las 4 pacientes contenía anticuerpos con dos propiedades únicas: 1) los antígenos objetivo estaban altamente enriquecidos en el hipocampo (Figura 7), y 2) los anticuerpos eran más detectables en el LCR (con síntesis intratecal) que en los sueros.

Las pruebas de competencia inmune entre los anticuerpos de las pacientes mostraron que estos bloqueaban parcialmente la reactividad del hipocampo de los demás, indicando que algunos, pero no todos los epítopes son objetivos comunes. La asociación temporal de la dosis entre la presentación de la encefalitis y el diagnóstico de teratomas del ovario (media, 3 meses) y la correlación en un caso entre tres episodios de relapso neurológico y recurrencia de tumor muestra que el tumor jugó un papel en desencadenar la respuesta inmune.

## EJEMPLO 3: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES ADICIONALES PARA ENCEFALITIS AUTOINMUNE RECEPTIVA AL TRATAMIENTO

### MATERIALES Y MÉTODO EXPERIMENTAL

Exploración inmune de las bibliotecas cADN:

5 Las bibliotecas Uni-ZZAP-XR™ límbicas y del cerebelo (Stratagene) son examinadas a una densidad de placa 5 x 104 pfu/ 150 mm. Los filtros de nitrocelulosa con placas fago son incubados con suero (recopilado de 5 pacientes con anticuerpos similares, cada uno diluido 1: 1. 000) o LCR (diluido 1: 5) durante la noche a 4 °C, luego se incubó secuencialmente con IgG antihumano de cabra biotilina (1: 2000) por 2 horas y avidina-biotina-peroxidasa por 1 hora, y desarrollado bajo la orientación visual directa con diaminobencidina al 0,05%. Los clones que produjeron resultados positivos son purificados por varias series de evaluación de anticuerpos hasta que se obtiene una placa positiva al 100%. Los clones fago se vuelven a subclonar en pBluescript usando un protocolo de rescate de fago de escisión *en vivo* (Stratagene) y secuenciado.

Preabsorción del suero:

15 Para reducir la reactividad de antecedentes y reactividad no específica, el suero recolectado (o individual) a evaluarse es preabsorbido con proteínas *E. coli*. *E. coli* XL-1 azul se crece durante la noche en 25 ml de medio LB y se pelletiza. Los pellets se lisan en 1% Triton-X 100 y los residuos celulares se eliminan por centrifugación. El suero de las pacientes se incuba con el sobrenadante que contiene las proteínas *E. coli* (proporción de 1 a 10) por 1 hora. Antes de la evaluación de detección, la mezcla de suero y proteínas *E. coli* se diluye con PBS para que la dilución final del suero de cada paciente sea 1:1000.

20 Evaluación del suero/CFS usando las técnicas de placas fago e inmunotransferencia:

25 Después de sacar un clone, se determina mediante pruebas la habilidad con que cuenta cada suero o LCR individual en el grupo para reconocer el clon usando un enfoque de ensayos rápidos de detección. El clon fago de interés se mezcla con un clon fago irrelevante (negativo) en una proporción de 50/50 y se coloca en placas de agar produciendo un sembrado de placas fago que son 50% de placas de interés y 50% placas irrelevantes. Luego estas placas son transferidas a filtros de nitrocelulosa que están cortados en secciones e incubados con el suero (1:1000) o LCR (1:10) de cada paciente individual o de control, seguido por el método IgG antihumano de cabra biotilina y el método avidina-biotina-peroxidasa. Los sueros positivos reaccionan fuertemente con ~50% de las placas; los sueros negativos muestran una reactividad de antecedentes leve o nula con 100% de las placas. La yuxtaposición de las placas negativa y positiva proporciona una señal visual clara que reduce de manera importante las lecturas positivas falsas. Cuando un clon es identificado por anticuerpos de varios pacientes, este clon se considera una prioridad para retirarlo y hacer estudios adicionales.

35 Inmunoprecipitación de proteínas neuronales radioetiquetadas solubilizadas o sinaptosomas de cerebro de rata biotilina.

40 Células neuronales: Para etiquetar las células, el medio se elimina de los cultivos neuronales de neuronas de hipocampo de 3 semanas de edad, y las células se lavan en PBS y se incuban en un medio neurobasal libre de metionina (Gibco-invitrogen) suplementadas con suero B27 libre de suplemento y 50 U/ml de penicilina-estreptomiciina con 1% de albumina de suero bovino por 60 minutos. Las células se lavan e incuban con DMEM libre de metionina con [S]-L-metionina 0,5 mCi/ml<sup>35</sup> por 60 minutos a 37°C, se colocaron en hielo, y se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo. Esto fue seguido por solubilización por cualquiera de los siguientes métodos. La opción del método se basa inicialmente en la ubicación presumida del antígeno usando técnicas de inmunotiquetado doble con proteínas bien caracterizadas (pre-sinápticas, post-sinápticas, espinas dendríticas, etc.).

50 Método A: Usado para antígenos que son proteínas de membrana neuronal. Emplea Triton X-114, el cual se somete a precipitación en el punto de enturbiamiento a 30°C, produciendo una fase de detergente en la cual la membrana y otras proteínas hidrofóbicas se dividen preferentemente. Las células se solubilizan en Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, Triton-X 114 al 0,5% (p/v), con inhibidores de proteasa (1 mM PMSF y tampón CLAP a 1 a 1000). La precipitación en el punto de enturbiamiento se lleva a cabo al colocar la mezcla sobre una cama de sacarosa al 6% (p/v) e incubarla por 3 minutos a 30°C, o hasta que la solución esté turbia seguida de centrifugación. La fase de detergente se elimina de debajo de la sacarosa y se vuelve a suspender en Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, PMDF 1 mM al volumen original.

55 Método B: Se usó para antígenos que son proteínas neuronales que se disuelven libremente y algunas proteínas de la membrana. Las células son lisadas en 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, Triton-X 100 al 0,5% (p/v), y PMSF 1 mM.

60 Sinaptosomas: Usado para antígenos que son enriquecidos en sinaptosomas. La región de interés se disecciona del cerebro de la rata y se homogeniza en sacarosa 0,32M en Tris-HCl 5 mM, pH 7,4 con EDTA 2 mM. Después de la centrifugación (750 g) el sobrenadante se saca y se centrifuga a 17.000 g. El pellet se lisa en Tris-HCl pH 82 con EDTA 1 mM y se homogeniza, seguido por una centrifugación a 100.000 g. El pellet se vuelve a suspender en KCl

0,1 M, Tris HCl 10 mM, pH 7,4, Triton X-100 1% y EDTA 2 mM y se centrifuga de nuevo a 100.000 g. El sobrenadante que contiene el sinaptosoma se saca y se almacena hasta su uso. Todos los tampones contienen una mezcla de varios inhibidores de proteasa. Para la biotilación de las sinaptosomas, se agregan 3 mg de biotina (como una solución de 50 µg/µl en DMSO) por cada 1mg de proteína sinaptosoma, y se incuban a 4 °C durante la noche, y se dializa contra PBS. Los sinaptosomas biotilados se incuban con el anticuerpo primario en BSA al 0,1% en PBS (proporción de 5 µl del suero del paciente, o 50 µl LCR, a 100 µg de proteína).

Los extractos de proteína solubilizados son preabsorbidos al incubarlos con 30 µl de cuentas A/G Sepharose de proteína y 4 µl de suero humano normal por 3 horas. Se retiran los extractos preabsorbidos y se incuban en el suero del paciente o LCR a una proporción de 5 µl suero (50 µl LCR) a 100 µl de extracto y 25 µl de cuentas A/G proteína durante la noche a 4°C, lavadas, suspendidas de nuevo en un tampón Laemmli y procesadas mediante inmunotransferencia SDS-PAGE. Después de que la proteína se transfiere a la nitrocelulosa, la proteína se visualizó mediante autoradiografía XR o avidina-biotina-peroxidasa y diaminobencidina.

[0123] Si es necesario optimizar más la inmunoprecipitación, cada una de las fracciones celulares (membrana celular, citosólica, sinaptosomas) se fracciona adicionalmente. Antes de realizar la precipitación sobre las subfracciones, se usan transferencias de puntos como un ensayo de detección rápido y simple de pequeñas cantidades de material, y así solo se generaron fracciones positivas.

Controles:

Las cuentas Sepharose son peletizadas después de la pre-absorción con suero humano normal, lavadas, vueltas a suspender en Laemmli y procesadas mediante SDS-PAGE como un control para aglutinaciones no específicas. Los controles positivos para la localización incluyen la vesícula sináptica 2, Kv1.2 VGKC, y amfifisina; la última ubicada en el lado citoplásmico de la membrana celular).

Identificación de antígenos:

Las bandas de interés de proteínas (bandas comunes precipitadas por más de un suero en un grupo) son extirpadas y sometidas a espectroscopia de masa de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-MS) usando la instalación de Química de Proteína del Centro de Cáncer de la Universidad de Pensilvania.

## RESULTADOS

Los ensayos de detección con la biblioteca de cADN y la inmunoprecipitación (IP) con las proteínas del hipocampo de la rata extirpadas del cerebro o cultivos neuronales (Figura 11) se usaron para identificar antígenos paraneoplásicos adicionales. Neuronas del hipocampo de 3 semanas de edad, que están enriquecidas con muchos de los auto-antígenos que se aislaron en el presente, se usaron para purificar las proteínas del hipocampo. Estos antígenos son expresados predominantemente en el hipocampo y cerebelo de la rata, y en la membrana celular de las neuronas en el cultivo (Figura 5-6). Los estudios se enfocan en antígenos que son el objetivo de varios anticuerpos de los pacientes, como se determinó mediante estudios de competencia inmunohistoquímica y/o inmunotransferencia.

Los auto-antígenos nobles son sometidos a prueba para ver la asociación con sub-fenotipos específicos de LE. Los ensayos para identificar los auto-antígenos nobles incluyen técnicas de inmunotransferencia, IP, y ELISA.

EJEMPLO 4: HETERÓMEROS NR2B Y NR2A DEL RECEPTOR NMDA SON LOS ANTÍGENOS DE ENCEFALITIS ASOCIADA CON EL TERATOMA DEL OVARIO

## MATERIALES Y MÉTODO EXPERIMENTAL

Los anticuerpos del suero/LCR fueron analizados usando cultivos neuronales, como se describió arriba, y células HEK293 expresando subunidades NR del receptor NMDA.

## RESULTADOS

Once pacientes hembra (14 a 40 años) desarrollaron encefalitis sub-aguda caracterizada por síntomas psiquiátricos prominentes, crisis epilépticas, y complicaciones de vida o muerte (síntomas psiquiátricos, amnesia, crisis epilépticas, disquinecias, y disminución del nivel de consciencia que requería soporte de ventilación). Todas las pacientes exhibieron anticuerpos que reaccionaban con los epítopes conformacionales extracelulares de las subunidades NR2B (11/11) y NR2A (7/11) del receptor NMDA. NR2B une el glutamato y forma heterómeros (NR1/NR2B o NR1/NR2A/NR2B) que son preferentemente expresados en el prosencéfalo/hipocampo de adultos. La co-expresión de los heterómeros funcionales fue requerida para la unión de anticuerpos. Se encontró que todas las pacientes tenían un teratoma del ovario (7 maduro/4 inmaduro); todos los 5 tumores de los 5 sometidos a prueba

contenían tejido nervioso que expresaba enfáticamente NR2B y reaccionó con los anticuerpos del paciente. Por lo tanto, la respuesta patológica inmune fue desencadenada por el tumor.

5 La resección y la inmunoterapia del tumor (estrategias para mermar el IgG) resultaron en la recuperación de 7/8 pacientes, paralelo con una disminución de los títulos de los anticuerpos. 2/3 pacientes sin resección del tumor murieron por deterioro neurológico, como lo muestran los hallazgos de la autopsia.

10 Estos hallazgos demuestran que los anticuerpos del receptor NMDA pueden usarse como una prueba de diagnóstico para la encefalitis autoinmune. Además, estos hallazgos demuestran que es muy probable que los anticuerpos del receptor NMDA jueguen un papel que causa epilepsia y trastornos inmunomediados de la memoria, cognición y comportamiento.

#### EJEMPLO 5: CONFIRMACIÓN DEL PAPEL PATOLÓGICO DE LOS ANTICUERPOS DEL RECEPTOR NMDA

15 En experimentos adicionales, los efectos funcionales de los anticuerpos contra el NMDA y/o otros auto-antígenos identificados de ejemplos previos se examinan en cultivos de neuronas vivas, usando electrofisiología con grabación de célula sencilla y experimentos de fijación de voltaje. Los efectos patológicos proporcionaron información adicional sobre el papel fisiológico de estos anticuerpos en la causalidad de encefalitis, epilepsia y otros trastornos.

#### 20 EJEMPLO 6: PAPEL PATOLÓGICO DE LOS ANTICUERPOS DEL RECEPTOR NMDA EN LA ENCEFALITIS RASMUSSEN

Los pacientes de encefalitis Rasmussen se sometieron a pruebas para ver la presencia de anticuerpos anti-NMDA. Los pacientes con pruebas positivas para los anticuerpos reciben un tratamiento para la disminución de los anticuerpos anti-NMDA.

#### 25 EJEMPLO 7: PAPEL PATOLÓGICO DE LOS ANTICUERPOS DEL RECEPTOR NMDA EN TRASTORNOS DEL SUEÑO ASOCIADOS CON REM

30 Los pacientes con trastornos del sueño asociados con REM se sometieron a pruebas para ver la presencia de anticuerpos anti-NMDA. Los pacientes con pruebas positivas para los anticuerpos reciben un tratamiento para la disminución de los anticuerpos anti-NMDA.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Trustees of the University of Pennsylvania Dalmau, Joseph

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR  
TREATMENT AND DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE  
ENCEPHALITIS OR EPILEPSY

10 <130> P-9055-PC

<150> 60/837, 624  
<151> 2006-08-15

15 <160> 6

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

20 <211> 1484  
<212> PRT  
<213> Human

<400> 1

25 **Met Lys Pro Arg Ala Glu Cys Cys Ser Pro Lys Phe Trp**  
**Leu Val Leu 5 10**  
**1 15**

30 **Ala Val Leu Ala Val Ser Gly Ser Arg Ala Arg Ser Gln**  
**Lys Ser Pro 20 25**  
**30**

35 **Pro Ser Ile Gly Ile Ala Val Ile Leu Val Gly Thr Ser**  
**Asp Glu Val 35 40 45**

40 **Ala Ile Lys Asp Ala His Glu Lys Asp Asp Phe His His**



175

5 Pro Gly Tyr Gln Asp Phe Val Asn Lys Ile Arg Ser Thr  
 Ile Glu Asn 180 185  
 190

10 Ser Phe Val Gly Trp Glu Leu Glu Glu Val Leu Leu Leu  
 Asp Met Ser 195 200 205

15 Leu Asp Asp Gly Asp Ser Lys Ile Gln Asn Gln Leu Lys  
 Lys Leu Gln 210 215 220

20 Ser Pro Ile Ile Leu Leu Tyr Cys Thr Lys Glu Glu Ala  
 Thr Tyr Ile 225 230 235  
 240

25 Phe Glu Val Ala Asn Ser Val Gly Leu Thr Gly Tyr Gly  
 Tyr Thr Trp 245 250  
 255

30 Ile Val Pro Ser Leu Val Ala Gly Asp Thr Asp Thr Val  
 Pro Ala Glu 260 265  
 270

35 Phe Pro Thr Gly Leu Ile Ser Val Ser Tyr Asp Glu Trp  
 Asp Tyr Gly 275 280 285

40

45

ES 2 443 490 T3

	Leu	Pro	Ala	Arg	Val	Arg	Asp	Gly	Ile	Ala	Ile	Ile	Thr
	Thr	Ala	Ala				295					300	
5	Ser	Asp	Met	Leu	Ser	Glu	His	Ser	Phe	Ile	Pro	Glu	Pro
	Lys	Ser	Ser			310					315		
	305		320										
10	Cys	Tyr	Asn	Thr	His	Glu	Lys	Arg	Ile	Tyr	Gln	Ser	Asn
	Met	Leu	Asn		325					330			
			335										
15	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asn	Val	Thr	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Leu
	Ser	Phe	Ser		340				345				
	350												
20	Glu	Asp	Gly	Tyr	Gln	Met	His	Pro	Lys	Leu	Val	Ile	Ile
	Leu	Leu	Asn					360					365
			355										
25	Lys	Glu	Arg	Lys	Trp	Glu	Arg	Val	Gly	Lys	Trp	Lys	Asp
	Lys	Ser	Leu				375					380	
		370											
30	Gln	Met	Lys	Tyr	Tyr	Val	Trp	Pro	Arg	Met	Cys	Pro	Glu
	Thr	Glu	Glu			390					395		
	385		400										
35	Gln	Glu	Asp	Asp	His	Leu	Ser	Ile	Val	Thr	Leu	Glu	Glu
40													



	Phe	Ile	Glu	Thr	Gly	Ile	Ser	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ser
	Asn	Gly	Thr										
		530					535					540	
5													
	Val	Ser	Pro	Ser	Ala	Phe	Leu	Glu	Pro	Phe	Ser	Ala	Asp
	Val	Trp	Val										
	545		560			550					555		
10													
	Met	Met	Phe	Val	Met	Leu	Leu	Ile	Val	Ser	Ala	Val	Ala
	Val	Phe	Val										
		575			565					570			
15													
	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ser	Pro	Val	Gly	Tyr	Asn	Arg	Cys	Leu
	Ala	Asp	Gly										
	590			580					585				
20													
	Arg	Glu	Pro	Gly	Gly	Pro	Ser	Phe	Thr	Ile	Gly	Lys	Ala
	Ile	Trp	Leu										
			595					600					605
25													
	Leu	Trp	Gly	Leu	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	Val	Pro	Val	Gln
	Asn	Pro	Lys										
		610					615					620	
30													
	Gly	Thr	Thr	Ser	Lys	Ile	Met	Val	Ser	Val	Trp	Ala	Phe
	Phe	Ala	Val										
	625		640			630					635		
35													

	Ile Phe Leu Ala Ser Tyr Thr Ala Asn Leu Ala Ala Phe	
	Met Ile Gln	
5	655	645 650
	Glu Glu Tyr Val Asp Gln Val Ser Gly Leu Ser Asp Lys	
	Lys Phe Gln	
10	670	660 665
	Arg Pro Asn Asp Phe Ser Pro Pro Phe Arg Phe Gly Thr	
	Val Pro Asn	
15	675	680 685
	Gly Ser Thr Glu Arg Asn Ile Arg Asn Asn Tyr Ala Glu	
	Met His Ala	
20	690	695 700
	Tyr Met Gly Lys Phe Asn Gln Arg Gly Val Asp Asp Ala	
	Leu Leu Ser	
25	705	710 715
	720	
	Leu Lys Thr Gly Lys Leu Asp Ala Phe Ile Tyr Asp Ala	
	Ala Val Leu	
30	735	725 730
	Asn Tyr Met Ala Gly Arg Asp Glu Gly Cys Lys Leu Val	
	Thr Ile Gly	
35	740	745
	750	
	Ser Gly Lys Val Phe Ala Ser Thr Gly Tyr Gly Ile Ala	



880

5	Gln Ser Val Thr His Ser	Met Asn Ser	Pro Thr	Ala Thr	Met Asn Asn	
	895	885		890		
10	Asn Ile Leu Asn Leu Ser	Arg Leu Leu	Arg Thr	Ala Lys	Asn Met Ala	
	910	900		905		
15	Gly Val Asn Arg Arg Glu	Gly Ser	Pro Gln Ser	Ala Leu	Asp Phe Ile	
		915		920		925
20	Ser Ser Val Thr His Ser	Tyr Asp Ile	Ser Glu	His Arg	Arg Ser Phe	
	930		935		940	
25	Asp Cys Lys Leu Phe Ser	Ser Tyr	Asn Asn Pro	Pro Cys	Glu Glu Asn	
	945		950		955	
		960				
30	Asp Tyr Ile Gln Leu Lys	Ser Glu Val	Glu Arg Thr	Phe Gly	Asn Leu	
	975	965		970		
35	Asp Ser Asn Arg Pro His	Val Tyr Gln	Asp His Tyr	His His His	His His	
	990	980		985		

5	Ser Ile Gly Ser Ala Ser Ser Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Cys Asp Asn 1005 995 1000
10	Pro Pro Phe Thr Thr Gln Ser Arg Ser Ile Ser Lys Lys Pro Leu 1010 1015 1020
15	Asp Ile Gly Leu Pro Ser Ser Lys His Ser Gln Leu Ser Asp Leu 1025 1030 1035
20	Tyr Gly Lys Phe Ser Phe Lys Ser Asp Arg Tyr Ser Gly His Asp 1040 1045 1050
25	Asp Leu Ile Arg Ser Asp Val Ser Asp Ile Ser Thr His Thr Val 1055 1060 1065
30	Thr Tyr Gly Asn Ile Glu Gly Asn Ala Ala Lys Arg Arg Lys Gln 1070 1075 1080
35	Gln Tyr Lys Asp Ser Leu Lys Lys Arg Pro Ala Ser Ala Lys Ser 1085 1090 1095
	Arg Arg Glu Phe Asp Glu Ile Glu Leu Ala Tyr Arg

5	Arg Arg Pro 1100	1105	1110
10	Pro Arg Ser Pro Asp His Lys Arg Tyr Phe Arg Asp Lys Glu Gly 1115	1120	1125
15	Leu Arg Asp Phe Tyr Leu Asp Gln Phe Arg Thr Lys Glu Asn Ser 1130	1135	1140
20	Pro His Trp Glu His Val Asp Leu Thr Asp Ile Tyr Lys Glu Arg 1145	1150	1155
25	Ser Asp Asp Phe Lys Arg Asp Ser Ile Ser Gly Gly Gly Pro Cys 1160	1165	1170
30	Thr Asn Arg Ser His Ile Lys His Gly Thr Gly Asp Lys His Gly 1175	1180	1185
35	Val Val Ser Gly Val Pro Ala Pro Trp Glu Lys Asn Leu Thr Asn 1190	1195	1200
	Val Glu Trp Glu Asp Arg Ser Gly Gly Asn Phe Cys Arg Ser Cys 1205	1210	1215

ES 2 443 490 T3

5	Pro Gly	Ser Gln	Lys Asn	Leu	His	Asn	Tyr	Ser	Thr	Thr	Val	Thr
		1220					1225					1230
10	Ser Lys	Gly Lys	Arg Ala	Gln	Ala	Cys	Ile	Arg	Cys	Glu	Ala	Cys
		1235					1240					1245
15	Gly Gln	Asn Glu	Leu Leu	Tyr	Asp	Ile	Ser	Glu	Asp	Asn	Ser	Leu
		1250					1255					1260
20	Asp Ala	Gln Ser	Pro Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Thr	Ser	Asn
		1265					1270					1275
25	Thr Gln	Lys Lys	Tyr Lys	Pro	Gln	Ser	Pro	Thr	Asn	Ser	Lys	Ala
		1280					1285					1290
30	Asn Thr	Arg Phe	Asn Val	Lys	Leu	Arg	Arg	Gln	His	Ser	Tyr	Asp
		1295					1300					1305
	Asp Ser	Leu Val	Gln Ser	Lys	Glu	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Arg
		1310					1315					1320

5 Leu Lys Asp Lys Gly Arg Phe Met Asp Gly Ser Pro  
 Tyr Ala His 1325 1330 1335

10 Met Phe Glu Met Ser Ala Gly Glu Ser Thr Phe Ala  
 Asn Asn Lys 1340 1345 1350

15 Ser Ser Val Pro Thr Ala Gly His His His His Asn  
 Asn Pro Gly 1355 1360 1365

20 Gly Gly Tyr Met Leu Ser Lys Ser Leu Tyr Pro Asp  
 Arg Val Thr 1370 1375 1380

25 Gln Asn Pro Phe Ile Pro Thr Phe Gly Asp Asp Gln  
 Cys Leu Leu 1385 1390 1395

30 His Gly Ser Lys Ser Tyr Phe Phe Arg Gln Pro Thr  
 Val Ala Gly 1400 1405 1410

35 Ala Ser Lys Ala Arg Pro Asp Phe Arg Ala Leu Val  
 Thr Asn Lys 1415 1420 1425

40 Pro Val Val Ser Ala Leu His Gly Ala Val Pro Ala

45 Arg Phe Gln 1430 1435 1440

50 Lys Asp Ile Cys Ile Gly Asn Gln Ser Asn Pro Cys  
 Val Pro Asn 1445 1450 1455

55 Asn Lys Asn Pro Arg Ala Phe Asn Gly Ser Ser Asn  
 Gly His Val 1460 1465 1470

60 Tyr Glu Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val  
 1475 1480

<210> 2  
 <211> 4455  
 <212> DNA  
 <213> Human  
 <400> 2

	atgaagccca	gagcggagtg	ctgttctccc	aagttctggt
	tggtgttggc	cgctcctggc	60	
5	gtgtcaggca	gcagagctcg	ttctcagaag	agcccccca
	gcattggcat	tgctgtcatc	120	
	ctcgtgggca	cttccgacga	ggtggccatc	aaggatgccc
	acgagaaaga	tgatttccac	180	
10	catctctccg	tggtaccccg	ggtggaactg	gtagccatga
	atgagaccga	cccaaagagc	240	
	atcatcacc	gcattctgtga	tctcatgtct	gaccggaaga
	tccagggggt	ggtgtttgct	300	
15	gatgacacag	accaggaagc	catcgcccag	atcctcgatt
	tcatttccagc	acagactctc	360	
	accccgatcc	tgggcatcca	cgggggctcc	tctatgataa
	tgccagataa	ggatgaatcc	420	
20	tccatgttct	tccagtttgg	cccataatt	gaacagcaag
	cttccgtaat	gctcaacatc	480	
	atggaagaat	atgactggta	catcttttct	atcgtcacca
	cctatttccc	tggctaccag	540	
25	gactttgtaa	acaagatccg	cagcaccatt	gagaatagct
	ttgtgggctg	ggagctagag	600	
	gaggtcctcc	tactggacat	gtccctggac	gatggagatt
	ctaagatcca	gaatcagctc	660	
30	aagaaacttc	aaagccccat	cattcttctt	tactgtacca
	aggaagaagc	cacctacatc	720	
	tttgaagtgg	ccaactcagt	agggctgact	ggctatggct
	acacgtggat	cgtgcccagt	780	
35	ctggtggcag	gggatacaga	cacagtgcct	gcggagtcc
	ccactgggct	catctctgta	840	
	tcatatgatg	aatgggacta	tggcctcccc	gccagagtga
	gagatggaat	tgccataatc	900	
40	accactgctg	cttctgacat	gctgtctgag	cacagcttca
	tccctgagcc	caaaagcagt	960	
	tgttacaaca	cccacgagaa	gagaatctac	cagtccaata
	tgctaaatag	gtatctgatc	1020	
45	aatgtcactt	ttgaggggag	gaatttgtcc	ttcagtgaag
	atggctacca	gatgcacccg	1080	
	aaactgggtga	taattcttct	gaacaaggag	aggaagtggg
	aaaggggtggg	gaagtggaaa	1140	
50	gacaagtccc	tgcagatgaa	gtactatgtg	tggccccgaa
	tgtgtccaga	gactgaagag	1200	
	caggaggatg	accatctgag	cattgtgacc	ctggaggagg

caccatttgt cattgtggaa 1260  
 agtgtggacc ctctgagtgg aacctgcatg aggaacacag  
 5 tcccctgcca aaaacgcata 1320  
 gtcactgaga ataaaacaga cgaggagccg ggttacatca  
 aaaaatgctg caaggggttc 1380  
 tgtattgaca tccttaagaa aatttctaaa tctgtgaagt  
 10 tcacctatga cctttacctg 1440  
 gttaccaatg gcaagcatgg gaagaaaatc aatggaacct  
 ggaatggtat gattggagag 1500  
 gtggctcatga agagggccta catggcagtg ggctcactca  
 15 ccatcaatga ggaacgatcg 1560  
 gaggtggctg acttctctgt gcccttcata gagacaggca  
 tcagtgtcat ggtgtcacgc 1620  
 agcaatggga ctgtctcacc ttctgccttc ttagagccat  
 20 tcagcgtga cgtatgggtg 1680  
 atgatgtttg tgatgctgct catcgtctca gccgtggctg  
 tctttgtctt tgagtacttc 1740  
 agccctgtgg gttataacag gtgcctcgt gatggcagag  
 25 agcctgggtg accctctttc 1800  
 accatcggca aagctatttg gttgctctgg ggtctggtgt  
 ttaacaactc cgtacctgtg 1860  
 cagaacccaa aggggaccac ctccaagatc atggtgtcag  
 30 tgtgggcctt ctttgctgtc 1920  
 atcttcctgg ccagctacac tgccaactta gctgccttca  
 tgatccaaga ggaatatgtg 1980  
 gaccaggttt ctggcctgag cgacaaaaag ttccagagac  
 35 ctaatgactt ctcacccctc 2040  
 ttccgctttg ggaccgtgcc caacggcagc acagagagaa  
 atattcgcga taactatgca 2100

	<b>gaaatgcatg</b>	<b>cctacatggg</b>	<b>aaagttcaac</b>	<b>cagaggggtg</b>
	<b>tagatgatgc</b>	<b>attgctctcc</b>	<b>2160</b>	
5	<b>ctgaaaacag</b>	<b>ggaaactgga</b>	<b>tgctttcatc</b>	<b>tatgatgcag</b>
	<b>cagtgcctgaa</b>	<b>ctatatggca</b>	<b>2220</b>	
	<b>ggcagagatg</b>	<b>aaggctgcaa</b>	<b>gctggtgacc</b>	<b>attggcagtg</b>
	<b>ggaaggctct</b>	<b>tgcttccact</b>	<b>2280</b>	
10	<b>ggctatggca</b>	<b>ttgccatcca</b>	<b>aaaagattct</b>	<b>gggtggaagc</b>
	<b>gccaggtgga</b>	<b>ccttgctatc</b>	<b>2340</b>	
	<b>ctgcagctct</b>	<b>ttggagatgg</b>	<b>ggagatggaa</b>	<b>gaactggaag</b>
	<b>ctctctggct</b>	<b>cactggcatt</b>	<b>2400</b>	
15	<b>tgtcacaatg</b>	<b>agaagaatga</b>	<b>ggtcatgagc</b>	<b>agccagctgg</b>
	<b>acattgacaa</b>	<b>catggcaggg</b>	<b>2460</b>	
	<b>gtctttctaca</b>	<b>tgttgggggc</b>	<b>ggccatggct</b>	<b>ctcagcctca</b>
	<b>tcaccttcat</b>	<b>ctgcgaacac</b>	<b>2520</b>	
20	<b>cttttctatt</b>	<b>ggcagttccg</b>	<b>acattgcttt</b>	<b>atgggtgtct</b>
	<b>gttctggcaa</b>	<b>gcctggcatg</b>	<b>2580</b>	
	<b>gtctttctcca</b>	<b>tcagcagagg</b>	<b>tatctacagc</b>	<b>tgcatccatg</b>
	<b>gggtggcgat</b>	<b>cgaggagcgc</b>	<b>2640</b>	
25	<b>cagtctgtaa</b>	<b>tgaactcccc</b>	<b>caccgcaacc</b>	<b>atgaacaaca</b>
	<b>cacactccaa</b>	<b>catcctgcgc</b>	<b>2700</b>	
	<b>ctgctgcgca</b>	<b>cggccaagaa</b>	<b>catggctaac</b>	<b>ctgtctggtg</b>
	<b>tgaatggctc</b>	<b>accgcagagc</b>	<b>2760</b>	
30	<b>gccctggact</b>	<b>tcattccgacg</b>	<b>ggagtcatcc</b>	<b>gtctatgaca</b>
	<b>tctcagagca</b>	<b>ccgccgcagc</b>	<b>2820</b>	
	<b>ttcacgcatt</b>	<b>ctgactgcaa</b>	<b>atcctacaac</b>	<b>aaccgcctt</b>
	<b>gtgaggagaa</b>	<b>cctcttcagt</b>	<b>2880</b>	
35	<b>gactacatca</b>	<b>gtgaggtaga</b>	<b>gagaacgttc</b>	<b>gggaacctgc</b>
	<b>agctgaagga</b>	<b>cagcaacgtg</b>	<b>2940</b>	
	<b>taccaagatc</b>	<b>actaccacca</b>	<b>tcaccaccgg</b>	<b>ccccatagta</b>
	<b>ttggcagtgc</b>	<b>cagctccatc</b>	<b>3000</b>	

	<b>gatgggctct</b>	<b>acgactgtga</b>	<b>caaccacccc</b>	<b>ttcaccaccc</b>
	<b>agtcacaggtc</b>	<b>catcagcaag</b>	<b>3060</b>	
5	<b>aagcccctgg</b>	<b>acatcggcct</b>	<b>cccctcctcc</b>	<b>aagcacagcc</b>
	<b>agctcagtga</b>	<b>cctgtacggc</b>	<b>3120</b>	
	<b>aaattctcct</b>	<b>tcaagagcga</b>	<b>ccgctacagt</b>	<b>ggccacgacg</b>
	<b>acttgatccg</b>	<b>ctccgatgtc</b>	<b>3180</b>	
10	<b>tctgacatct</b>	<b>caaccacac</b>	<b>cgtcacctat</b>	<b>gggaacatcg</b>
	<b>agggaatgc</b>	<b>cgccaagagg</b>	<b>3240</b>	
	<b>cgtaagcagc</b>	<b>aatataagga</b>	<b>cagcctgaag</b>	<b>aagcggcctg</b>
	<b>cctcggccaa</b>	<b>gtcccgcagg</b>	<b>3300</b>	
15	<b>gagtttgacg</b>	<b>agatcgagct</b>	<b>ggcctaccgt</b>	<b>cgccgaccgc</b>
	<b>cccgtcccc</b>	<b>tgaccacaag</b>	<b>3360</b>	
	<b>cgctacttca</b>	<b>gggacaagga</b>	<b>agggctacgg</b>	<b>gacttctacc</b>
	<b>tggaccagtt</b>	<b>ccgaacaaag</b>	<b>3420</b>	
20	<b>gagaactcac</b>	<b>cccactggga</b>	<b>gcacgtagac</b>	<b>ctgaccgaca</b>
	<b>tctacaagga</b>	<b>gcggagtgat</b>	<b>3480</b>	
	<b>gactttaagc</b>	<b>gcgactccat</b>	<b>cagcggagga</b>	<b>gggccctgta</b>
	<b>ccaacaggtc</b>	<b>tcacatcaag</b>	<b>3540</b>	
25	<b>cacgggacgg</b>	<b>gcgacaaaca</b>	<b>cggcgtggtc</b>	<b>agcggggtac</b>
	<b>ctgcaccttg</b>	<b>ggagaagaac</b>	<b>3600</b>	
	<b>ctgaccaacg</b>	<b>tggagtggga</b>	<b>ggaccggtcc</b>	<b>gggggcaact</b>
	<b>tctgcccag</b>	<b>ctgtcccctc</b>	<b>3660</b>	
30	<b>aagctgcaca</b>	<b>actactccac</b>	<b>gacggtgacg</b>	<b>ggtcagaact</b>
	<b>cgggcaggca</b>	<b>ggcgtgcatc</b>	<b>3720</b>	
	<b>cggtgtgagg</b>	<b>cttgcaagaa</b>	<b>agcaggcaac</b>	<b>ctgtatgaca</b>
	<b>tcagtgagga</b>	<b>caactccctg</b>	<b>3780</b>	
35	<b>caggaactgg</b>	<b>accagccggc</b>	<b>tgccccagtg</b>	<b>gcggtgacgt</b>
	<b>caaacgcctc</b>	<b>caccactaag</b>	<b>3840</b>	
	<b>taccctcaga</b>	<b>gcccgactaa</b>	<b>ttccaaggcc</b>	<b>cagaagaaga</b>

ES 2 443 490 T3

accggaacaa actgcccgg 3900  
 cagcactcct acgacacctt cgtggacctg cagaaggaag 3960  
 aagccgccct ggccccgcgc  
 agcgtaagcc tgaaagacaa gggccgattc atggatggga 4020  
 gccccctacgc ccacatgttt  
 gagatgtcag ctggcgagag cacctttgcc aacaacaagt 4080  
 cctcagtgcc cactgccgga  
 catcaccacc acaacaaccc cggcggcggg tacatgctca 4140  
 gcaagtgcgt ctaccctgac  
 cgggtcacgc aaaacccttt catccccact tttggggacg 4200  
 accagtgcct gctccatggc  
 agcaaactct acttcttcag gcagcccacg gtggcggggg 4260  
 cgtcgaaagc caggccggac  
 ttccgggccc ttgtcaccaa caagccggtg gtctcggccc 4320  
 ttcattggggc cgtgccagcc  
 cgtttccaga aggacatctg tataggaac cagtccaacc 4380  
 cctgtgtgcc taacaacaaa  
 aaccccaggg ctttcaatgg ctccagcaat gggcatgttt 4440  
 atgagaaact ttctagtatt  
 gagtctgatg tctga 4455

<210> 3  
 <211> 1464  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 3

Met Gly Arg Val Gly Tyr Trp Thr Leu Leu Val Leu Pro  
 Ala Leu Leu 5 10  
 1 15

ES 2 443 490 T3

5	Val Gly	Trp Pro	Arg Pro	Gly 20	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys
	30							25					
10	Ala Val	Leu Thr	Asn Glu	Ile 35	Ala	Val	Met	Leu	Gly	His	Ser	His	Asp
							40						45
15	Arg Gly	Glu Leu	Leu Pro	Arg	Thr	Leu	Trp	Gly	Pro	Glu	Gln	Ala	Ala
		50					55					60	
20	Leu Asp	Asp Pro	Val Lys	Asn	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Met	Asn	Arg	Thr
	65		80			70					75		
25	Ser Arg	Leu Ile	Ile His	Thr	His	Val	Cys	Asp	Leu	Met	Ser	Gly	Ala
		95			85					90			
30	Gly Ala	Leu Gln	Val Met	Phe	Gly	Asp	Asp	Thr	Asp	Gln	Glu	Ala	Val
	110			100					105				
35	Leu Gly	Asp Ile	Phe His	Ile	Ser	Ser	His	Thr	Phe	Val	Pro	Ile	Leu
			115					120					125

5	Gly Ser	Gly Thr	Ala Phe	Ser	Met	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Asp	Pro	Thr
		130					135					140	
10	Phe Met	Gln Leu	Phe Lys	Gly	Ala	Ser	Ile	Gln	Gln	Gln	Ala	Thr	Val
	145		160				150				155		
15	Ile Thr	Met Thr	Gln Ile	Asp	Tyr	Asp	Trp	His	Val	Phe	Ser	Leu	Val
		175			165					170			
20	Phe Thr	Pro Val	Gly Asp	Tyr	Arg	Glu	Phe	Ile	Ser	Phe	Val	Lys	Thr
	190			180					185				
25	Asn Leu	Ser Asp	Phe Thr	Val	Gly	Trp	Asp	Met	Gln	Asn	Val	Ile	Thr
			195					200					205
30	Ser Ile	Phe His	Glu Ser	Asp	Ala	Lys	Thr	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Lys
		210					215					220	
35	Ser Leu	Val Ile	Ile Leu	Leu	Leu	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Glu	Ala	Val
	225		240			230					235		
	Ser Phe	Glu Trp	Ala Ile	Arg	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Gly	Tyr	Asp	Phe

ES 2 443 490 T3

				245						250			
	255												
5	Val Lys	Pro Glu	Ser Phe	Leu	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Glu	Leu	Ile	Pro
	270			260					265				
10	Pro Tyr	Ser Ser	Gly Leu	Leu	Ile	Ser	Val	Ser	Tyr	Asp	Asp	Trp	Asp
			275					280				285	
15	Glu Ala	Ala Ala	Arg Ser	Val	Arg	Asp	Gly	Ile	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr
		290					295				300		
20	Ser Ala	Met Ser	Leu Cys	Glu	Lys	Phe	Ser	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ala	Lys
	305		320			310					315		
25	Tyr Leu	Gly His	Gln Pro	Met	Glu	Arg	Pro	Glu	Val	Pro	Met	His	Thr
		335			325					330			
30	Phe Phe	Met Thr	Val Glu	Asn	Val	Thr	Trp	Asp	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser
	350			340					345				
35	Glu Leu	Gly Asn	Tyr Lys	Gln	Val	His	Pro	Arg	Leu	Val	Val	Ile	Val
			355					360				365	

ES 2 443 490 T3

5	Asp Thr	Arg Leu	Glu Ser	Trp	Glu	Lys	Val	Gly	Lys	Trp	Glu	Asn	His	
		370					375					380		
10	Leu Asp	Arg Cys	His Glu	Ala	Val	Trp	Pro	Arg	Tyr	Lys	Ser	Phe	Ser	
	385		400			390					395			
15	Pro Ala	Asp Pro	Asp Phe	Asn	His	Leu	Ser	Ile	Val	Thr	Leu	Glu	Glu	
		415			405					410				
20	Val Val	Ile Arg	Val Asn	Glu	Asp	Ile	Asp	Pro	Leu	Thr	Glu	Thr	Cys	
	430			420					425					
25	Thr Thr	Val Asn	Pro Glu	Cys	Arg	Lys	Phe	Val	Lys	Ile	Asn	Asn	Ser	
			435					440					445	
30	Gly Asp	Met Ile	Asn Leu	Val	Lys	Lys	Cys	Cys	Lys	Gly	Phe	Cys	Ile	
		450					455					460		
35	Lys Tyr	Lys Leu	Leu Val	Ser	Arg	Thr	Val	Lys	Phe	Thr	Tyr	Asp	Leu	
	465		480			470					475			

ES 2 443 490 T3

5	Thr Asn Gly Lys His Gly Lys Lys Val Asn Asn Val Trp Asn Gly Met 495	485	490
10	Ile Gly Glu Val Val Tyr Gln Arg Ala Val Met Ala Val Gly Ser Leu 510	500	505
15	Thr Ile Asn Glu Glu Arg Ser Glu Val Val Asp Phe Ser Val Pro Phe 515	520	525
20	Val Glu Thr Gly Ile Ser Val Met Val Ser Arg Ser Asn Gly Thr Val 530	535	540
25	Ser Pro Ser Ala Phe Leu Glu Pro Phe Ser Ala Ser Val Trp Val Met 545	550	555
30	Met Phe Val Met Leu Leu Ile Val Ser Ala Ile Ala Val Phe Val Phe 575	565	570
35	Glu Tyr Phe Ser Pro Val Gly Tyr Asn Arg Asn Leu Ala Lys Gly Lys 590	580	585
	Ala Pro His Gly Pro Ser Phe Thr Ile Gly Lys Ala Ile Trp Leu Leu		

ES 2 443 490 T3

			595				600					605
5	Trp Pro	Gly Lys 610	Leu Gly	Val	Phe	Asn	Asn	Ser	Val	Pro	Val	Gln Asn 620
							615					
10	Thr Ala 625	Thr Val	Ser Ile	Lys	Ile	Met	Val	Ser	Val	Trp	Ala	Phe Phe 635
			640				630					
15	Phe Ile	Leu Gln	Ala Glu	Ser	Tyr	Thr	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Phe Met 650
			655				645					
20	Glu Phe 670	Phe Gln	Val Arg	Asp	Gln	Val	Thr	Gly	Leu	Ser	Asp	Lys Lys 665
				660								
25	Pro Pro	His Asn	Asp Gly 675	Tyr	Ser	Pro	Pro	Phe	Arg	Phe	Gly	Thr Val 685
								680				
30	Ser His	Thr Gln 690	Glu Tyr	Arg	Asn	Ile	Arg	Asn	Asn	Tyr	Pro	Tyr Met 700
								695				
35	Met Val 705	Thr Ser	Lys Leu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Val	Glu	Asp	Ala Leu 715
			720				710					

5	Lys Thr Gly Lys Leu Asp Ala Phe Ile Tyr Asp Ala Ala Val Leu Asn 735	725	730
10	Tyr Lys Ala Gly Arg Asp Glu Gly Cys Lys Leu Val Thr Ile Gly Ser 750	740	745
15	Gly Tyr Ile Phe Ala Thr Thr Gly Tyr Gly Ile Ala Leu Gln Lys Gly 755	760	765
20	Ser Pro Trp Lys Arg Gln Ile Asp Leu Ala Leu Leu Gln Phe Val Gly 770	775	780
25	Asp Gly Glu Met Glu Glu Leu Glu Thr Leu Trp Leu Thr Gly Ile Cys 785	800	790
30	His Asn Glu Lys Asn Glu Val Met Ser Ser Gln Leu Asp Ile Asp Asn 815	805	810
35	Met Ala Gly Val Phe Tyr Met Leu Ala Ala Ala Met Ala Leu Ser Leu 830	820	825

Ile Thr Phe Ile Trp Glu His Leu Phe Tyr Trp Lys Leu  
 Arg Phe Cys 835 840 845

5

Phe Thr Gly Val Cys Ser Asp Arg Pro Gly Leu Leu Phe  
 Ser Ile Ser 850 855 860

10

Arg Gly Ile Tyr Ser Cys Ile His Gly Val His Ile Glu  
 Glu Lys Lys 865 870 875  
 880

15

Lys Ser Pro Asp Phe Asn Leu Thr Gly Ser Gln Ser Asn  
 Met Leu Lys 885 890  
 895

20

Leu Leu Arg Ser Ala Lys Asn Ile Ser Ser Met Ser Asn  
 Met Asn Ser 900 905  
 910

25

Ser Arg Met Asp Ser Pro Lys Arg Ala Ala Asp Phe Ile  
 Gln Arg Gly 915 920 925

30

Ser Leu Ile Met Asp Met Val Ser Asp Lys Gly Asn Leu  
 Met Tyr Ser 930 935 940

35

Asp Asn Arg Ser Phe Gln Gly Lys Glu Ser Ile Phe Gly  
 Asp Asn Met

	945				950				955				
		960											
5	Asn	Glu	Leu	Gln	Thr	Phe	Val	Ala	Asn	Arg	Gln	Lys	Asp
	Asn	Leu	Asn										
		975			965					970			
10	Asn	Tyr	Val	Phe	Gln	Gly	Gln	His	Pro	Leu	Thr	Leu	Asn
	Glu	Ser	Asn										
				980						985			
	990												
15	Pro	Asn	Thr	Val	Glu	Val	Ala	Val	Ser	Thr	Glu	Ser	Lys
	Ala	Asn	Ser										
			995							1000			
	1005												
20	Arg	Pro	Arg	Gln	Leu	Trp	Lys	Lys	Ser	Val	Asp	Ser	
	Ile	Arg	Gln										
		1010					1015					1020	
25	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Gln	Arg	Asp	
	Glu	Ala	Thr										
		1025					1030					1035	
30	Ala	Glu	Asn	Arg	Thr	His	Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Arg	
	Tyr	Leu	Pro										
		1040					1045					1050	
35	Glu	Glu	Met	Ala	His	Ser	Asp	Ile	Ser	Glu	Thr	Ser	
	Asn	Arg	Ala										
		1055					1060					1065	

	Thr	Cys	His	Arg	Glu	Pro	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	His
	Lys	Thr	Lys				1075					1080
5		1070										
	Asp	Asn	Phe	Lys	Arg	Ser	Val	Ala	Ser	Lys	Tyr	Pro
	Lys	Asp	Cys				1090					1095
10		1085										
	Ser	Glu	Val	Glu	Arg	Thr	Tyr	Leu	Lys	Thr	Lys	Ser
	Ser	Ser	Pro				1105					1110
15		1100										
	Arg	Asp	Lys	Ile	Tyr	Thr	Ile	Asp	Gly	Glu	Lys	Glu
	Pro	Gly	Phe				1120					1125
20		1115										
	His	Leu	Asp	Pro	Pro	Gln	Phe	Val	Glu	Asn	Val	Thr
	Leu	Pro	Glu				1135					1140
25		1130										
	Asn	Val	Asp	Phe	Pro	Asp	Pro	Tyr	Gln	Asp	Pro	Ser
	Glu	Asn	Phe				1150					1155
30		1145										
	Arg	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Leu	Pro	Met	Asn	Arg	Asn
	Pro	Leu	His				1165					1170
		1160										

5	Asn Leu	Glu Tyr	Glu Ser	Gly	Leu	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Tyr	Lys
		1175					1180					1185
10	Lys Ser	His Glu	Phe Thr	Thr	Leu	Lys	Asp	Lys	Gly	Ser	Pro	His
		1190					1195					1200
15	Ser Ser	Glu Cys	Arg Leu	Tyr	Arg	Gln	Asn	Ser	Thr	His	Cys	Arg
		1205					1210					1215
20	Ser Arg	Asn Ser	Met Pro	Pro	Thr	Tyr	Ser	Gly	His	Phe	Thr	Met
		1220					1225					1230
25	Phe Tyr	Lys Asp	Cys Ile	Asp	Ala	Cys	Leu	Arg	Met	Gly	Asn	Leu
		1235					1240					1245
30	Asp Ala	Glu Thr	Asp Gly	Gln	Met	Leu	Gln	Glu	Thr	Gly	Asn	Pro
		1250					1255					1260
35	Glu Ala	Gln Leu	Val Gln	Tyr	Gln	Gln	Asp	Trp	Ala	Gln	Asn	Asn
		1265					1270					1275
	Leu Ser	Gln Tyr	Lys Asp	Asn	Lys	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Gln	His

	1280		1285		1290
5	Asn Ile Val Asp Lys Pro Arg Glu Leu Asp Leu Ser				
	Arg Pro Ser		1300		1305
	1295				
10	Arg Ser Ile Ser Leu Lys Asp Arg Glu Arg Leu Leu				
	Glu Gly Asn		1315		1320
	1310				
15	Phe Tyr Gly Ser Leu Phe Ser Val Pro Ser Ser Lys				
	Leu Ser Gly		1330		1335
	1325				
20	Lys Lys Ser Ser Leu Phe Pro Gln Gly Leu Glu Asp				
	Ser Lys Arg		1345		1350
	1340				
25	Ser Lys Ser Leu Leu Pro Asp His Thr Ser Asp Asn				
	Pro Phe Leu		1360		1365
	1355				
30	His Ser His Arg Asp Asp Gln Arg Leu Val Ile Gly				
	Arg Cys Pro		1375		1380
	1370				
35	Ser Asp Pro Tyr Lys His Ser Leu Pro Ser Gln Ala				
	Val Asn Asp		1390		1395
	1385				
40	Ser Tyr Leu Arg Ser Ser Leu Arg Ser Thr Ala Ser				
	Tyr Cys Ser		1405		1410
	1400				
45	Arg Asp Ser Arg Gly His Asn Asp Val Tyr Ile Ser				
	Glu His Val		1420		1425
	1415				
50	Met Pro Tyr Ala Ala Asn Lys Asn Asn Met Tyr Ser				
	Thr Pro Arg		1435		1440
	1430				
55	Val Leu Asn Ser Cys Ser Asn Arg Arg Val Tyr Lys				
	Lys Met Pro		1450		1455
	1445				
60	Ser Ile Glu Ser Asp Val				
	1460				

<210> 4  
 <211> 4400  
 <212> DNA  
 <213> Human

<400> 4

	atgggcagag	tgggctattg	gaccctgctg	gtgctgccgg
	cccttctggt	ctggcgcggt	60	
	ccggcgccga	gcgcggcggc	ggagaagggg	ccccccgcgc
	taaatattgc	ggtgatgctg	120	
5	ggtcacagcc	acgacgtgac	agagcgcgaa	cttcgaacac
	tgtggggccc	cgagcaggcg	180	
	gcggggctgc	ccctggacgt	gaacgtggta	gctctgctga
	tgaaccgcac	cgaccccaag	240	
10	agcctcatca	cgcacgtgtg	cgacctcatg	tccggggcac
	gcatccacgg	cctcgtgttt	300	
	ggggacgaca	cggaccagga	ggccgtagcc	cagatgctgg
	atTTtatctc	ctccccacacc	360	
15	ttcgtcccca	tcttgggcat	tcattggggg	gcatctatga
	tcattggctga	caaggatccg	420	
	acgtctacct	tcttccagtt	tggagcgtcc	atccagcagc
	aagccacggg	catgctgaag	480	
20	atcatgcagg	attatgactg	gcatgtcttc	tccctgggtga
	ccactatctt	ccctggctac	540	
	agggattca	tcagcttcgt	caagaccaca	gtggacaaca
	gctttgtggg	ctgggacatg	600	
25	cagaatgtga	tcacactgga	cacttccttt	gaggatgcaa
	agacacaagt	ccagctgaag	660	
	aagatccact	cttctgtcat	cttgcctctac	tgttccaaag
	acgaggctgt	tctcattctg	720	
30	agtgaggccc	gctcccttgg	cctcaccggg	tatgatttct
	tctggattgt	ccccagcttg	780	
	gtctctggga	acacggagct	catccccaaa	gagtttccat
	cgggactcat	ttctgtctcc	840	
35	tacgatgact	gggactacag	cctggaggcg	agagtgaggg
	acggcattgg	catcctaacc	900	
	accgctgcat	cttctatgct	ggagaagttc	tcctacatcc
	ccgaggccaa	ggccagctgc	960	
40	tacgggcaga	tggagaggcc	agaggtcccg	atgcacacct
	tgacccatt	tatggtcaat	1020	
	gttacatggg	atggcaaaga	cttatccttc	actgaggaag

5                   gctaccaggt gcaccccagg   1080  
                   ctggtggtga ttgtgctgaa caaagaccgg gaatgggaaa  
                   aggtagggcaa gtgggagaac   1140  
                   catacgctga gcctgaggca cgccgtgtgg cccaggtaca  
                   agtccttctc cgactgtgag   1200  
 10                   ccggatgaca accatctcag catcgtcacc ctggaggagg  
                   ccccattcgt catcgtggaa   1260  
                   gacatagacc ccctgaccga gacgtgtgtg aggaacaccg  
                   tgccatgtcg gaagttcgtc   1320  
 15                   aaaatcaaca attcaaccaa tgaggggatg aatgtgaaga  
                   aatgctgcaa ggggttctgc   1380  
                   attgatattc tgaagaagct ttccagaact gtgaagtta  
                   cttacgacct ctatctgggtg   1440  
 20                   accaatggga agcatggcaa gaaagttaac aatgtgtgga  
                   atggaatgat cggatgaagtg   1500  
                   gtctatcaac gggcagtcac ggcagttggc tcgctcacca  
                   tcaatgagga acgttctgaa   1560  
 25                   gtggtggact tctctgtgcc ctttgtggaa acgggaatca  
                   gtgtcatggt ttcaagaagt   1620  
                   aatggcaccg tctcaccttc tgcttttcta gaaccattca  
                   gcgcctctgt ctgggtgatg   1680  
 30                   atgtttgtga tgctgctcat tgtttctgcc atagctgttt  
                   ttgtctttga afacttcagc   1740  
                   ctggttgat acaacagaaa cttagccaaa gggaaagcac  
                   cccatgggccc ttcttttaca   1800  
 35                   attggaaaag ctatatggct tctttggggc ctggtgttca  
                   ataactccgt gcctgtccag   1860  
                   aatcctaag ggaccaccag caagatcatg gtatctgtat  
                   gggccttctt cgctgtcata   1920

	<b>ttcctggcta</b>	<b>gctacacagc</b>	<b>caatctggct</b>	<b>gccttcatga</b>
	<b>tccaagagga</b>	<b>at ttgtggac</b>	<b>1980</b>	
5	<b>caagt gaccg</b>	<b>gcctcag tga</b>	<b>caaaaag ttt</b>	<b>cagagac ctc</b>
	<b>atgactattc</b>	<b>cccac ctttt</b>	<b>2040</b>	
	<b>cgatttggga</b>	<b>cag tgcctaa</b>	<b>tggaagcacg</b>	<b>gagagaaaaca</b>
	<b>ttc ggaataa</b>	<b>ctatccctac</b>	<b>2100</b>	
10	<b>atgcatcagt</b>	<b>acatgaccaa</b>	<b>atttaatcag</b>	<b>aaaggagtag</b>
	<b>aggacgcctt</b>	<b>ggtcagcctg</b>	<b>2160</b>	
	<b>aaaacgggga</b>	<b>agctggacgc</b>	<b>tttcatctac</b>	<b>gatgccgcag</b>
	<b>tcttgaatta</b>	<b>caaggctggg</b>	<b>2220</b>	
15	<b>agggatgaag</b>	<b>gctgcaagct</b>	<b>ggtgaccatc</b>	<b>gggagtg ggt</b>
	<b>acatcctttgc</b>	<b>caccaccggt</b>	<b>2280</b>	
	<b>tatggaattg</b>	<b>cccttcagaa</b>	<b>aggctctcct</b>	<b>tggaagagggc</b>
	<b>agatcgacct</b>	<b>ggccttgctt</b>	<b>2340</b>	
20	<b>cagtttgtgg</b>	<b>gtgatgg tga</b>	<b>gatggaggag</b>	<b>ctggagaccc</b>
	<b>tgtggctcac</b>	<b>tgggatctgc</b>	<b>2400</b>	
	<b>cacaacgaga</b>	<b>agaacgaggt</b>	<b>gatgagcagc</b>	<b>cagctggaca</b>
	<b>ttgacaacat</b>	<b>ggcgggcgta</b>	<b>2460</b>	
25	<b>ttctacatgc</b>	<b>tggctgccgc</b>	<b>catggccctt</b>	<b>agcctcatca</b>
	<b>ccttcatctg</b>	<b>ggagcacctc</b>	<b>2520</b>	
	<b>ttctactgga</b>	<b>agctgcgctt</b>	<b>ctgtttcacg</b>	<b>ggcgtgtgct</b>
	<b>ccgaccggcc</b>	<b>tgggttgctc</b>	<b>2580</b>	
30	<b>ttctccatca</b>	<b>gcaggggcat</b>	<b>ctacagctgc</b>	<b>attcatggag</b>
	<b>tgcacattga</b>	<b>agaaaagaag</b>	<b>2640</b>	
	<b>aagtctccag</b>	<b>acttcaatct</b>	<b>gacgggatcc</b>	<b>cagagcaaca</b>
	<b>tgttaaaact</b>	<b>cctccggtca</b>	<b>2700</b>	
35	<b>gccaaaaaca</b>	<b>tttccagcat</b>	<b>gtccaacatg</b>	<b>aactcctcaa</b>
	<b>gaatggactc</b>	<b>acc caaaaaga</b>	<b>2760</b>	
	<b>gctgctgact</b>	<b>tcatccaaag</b>	<b>aggttccttc</b>	<b>atcatggaca</b>
	<b>tggtttcaga</b>	<b>taaggggaat</b>	<b>2820</b>	

	<b>ttgatgtact</b>	<b>cagacaacag</b>	<b>gtcctttcag</b>	<b>gggaaagaga</b>
	<b>gcatttttgg</b>	<b>agacaacatg</b>	<b>2880</b>	
5	<b>aacgaactcc</b>	<b>aaacatttgt</b>	<b>ggccaaccgg</b>	<b>cagaaggata</b>
	<b>acctcaataa</b>	<b>ctatgtattc</b>	<b>2940</b>	
	<b>cagggacaac</b>	<b>atcctcttac</b>	<b>tctcaatgag</b>	<b>tccaacccta</b>
	<b>acacggtgga</b>	<b>ggtggccgtg</b>	<b>3000</b>	
10	<b>agcacagaat</b>	<b>ccaaagcgaa</b>	<b>ctctagacce</b>	<b>cggcagctgt</b>
	<b>ggaagaaatc</b>	<b>cgtaggattcc</b>	<b>3060</b>	
	<b>atacgccagg</b>	<b>attcactatc</b>	<b>ccagaatcca</b>	<b>gtctcccaga</b>
	<b>gggatgaggc</b>	<b>aacagcagag</b>	<b>3120</b>	
15	<b>aataggaccc</b>	<b>actccctaaa</b>	<b>gagccctagg</b>	<b>tatcttccag</b>
	<b>aagagatggc</b>	<b>ccactctgac</b>	<b>3180</b>	
	<b>atctcagaaa</b>	<b>cgtaaatcgc</b>	<b>ggccacgtgc</b>	<b>cacagggaac</b>
	<b>ctgacaacag</b>	<b>taagaaccac</b>	<b>3240</b>	
20	<b>aaaaccaagg</b>	<b>acaactttaa</b>	<b>aaggtcagtg</b>	<b>gcctccaaat</b>
	<b>acccaagga</b>	<b>ctgtagtgag</b>	<b>3300</b>	
	<b>gtcgagcgca</b>	<b>cctacctgaa</b>	<b>aaccaaataca</b>	<b>agctccccta</b>
	<b>gagacaagat</b>	<b>ctacactata</b>	<b>3360</b>	
25	<b>gatggtgaga</b>	<b>aggagcctgg</b>	<b>tttccactta</b>	<b>gatccacccc</b>
	<b>agtttgttga</b>	<b>aaatgtgacc</b>	<b>3420</b>	
	<b>ctgcccgaga</b>	<b>acgtggactt</b>	<b>cccggacccc</b>	<b>taccaggatc</b>
	<b>ccagtgaaaa</b>	<b>cttccgcaag</b>	<b>3480</b>	
30	<b>ggggactcca</b>	<b>cgctgccaat</b>	<b>gaaccggaac</b>	<b>cccttgcata</b>
	<b>atgaagaggg</b>	<b>gctttccaac</b>	<b>3540</b>	
	<b>aacgaccagt</b>	<b>ataaactcta</b>	<b>ctccaagcac</b>	<b>ttcaccttga</b>
	<b>aagacaaggg</b>	<b>ttccccgcac</b>	<b>3600</b>	
35	<b>agtgagacca</b>	<b>gcgagcgata</b>	<b>ccggcagaac</b>	<b>tccacgcact</b>
	<b>gcagaagctg</b>	<b>cctttccaac</b>	<b>3660</b>	
	<b>atgcccacct</b>	<b>atccaggcca</b>	<b>cttcaccatg</b>	<b>aggtccccct</b>

**tcaagtgcga tgcctgcctg 3720**  
**cggatgggga acctctatga catcgatgaa gaccagatgc 3780**  
**ttcaggagac aggtaacca**  
**gccaccgggg agcaggtcta ccagcaggac tgggcacaga 3840**  
**acaatgccct tcaattaca**  
**aagaacaagc taaggattag ccgtcagcat tcctacgata 3900**  
**acattgtcga caaacctagg**  
**gagctagacc ttagcaggcc ctcccggagc ataagcctca 3960**  
**aggacagggga acggcttctg**  
**gagggaaatt tttacggcag cctgtttagt gtcccctcaa 4020**  
**gcaaaactctc ggggaaaaaa**  
**agctcccctt tcccccaagg tctggaggac agcaagagga 4080**  
**gcaagtctct cttgccagac**  
**cacacctccg ataaccctt cctccactcc cacagggatg 4140**  
**accaacgctt ggttattggg**  
**agatgccctt cggaccctta caaacactcg ttgccatccc 4200**  
**aggcggtgaa tgacagctat**  
**cttcggtcgt ccttgaggtc aacggcatcg tactgttcca 4260**  
**gggacagtcg gggccacaat**  
**gatgtgtata tttcggagca tgttatgcct tatgctgcaa 4320**  
**ataagaataa tatgtactct**  
**acccccaggg ttttaaattc ctgcagcaat agacgcgtgt 4380**  
**acaagaaaat gcctagtatc**  
**gaatctgatg tttaaaaatc 4400**

35 <210> 5  
 <211> 907  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 40 <400> 5

ES 2 443 490 T3

	Arg	Gly	Gln	Gly	Gly	Asp	Thr	Arg	Ser	Lys	Gly	Thr	Arg
	Gln	Pro	Glu										
5	1	15			5					10			
	Pro	Pro	Gly	Ala	Ser	Arg	Asp	Pro	Ala	Arg	Ser	Cys	Trp
10	Asp	Pro	Pro										
	30			20					25				
	Val	Asp	Met	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu
15	Thr	Ser	Leu										
			35					40					45
	Phe	Gly	Ala	Trp	Ala	Gly	Leu	Gly	Pro	Gly	Gln	Gly	Glu
20	Gln	Gly	Met										
		50					55					60	
	Thr	Val	Ala	Val	Val	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Pro	Pro	Gln
25	Ala	Gln	Phe										
	65		80			70					75		
	Arg	Ala	Arg	Leu	Thr	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Asp	Leu	Pro
30	Leu	Glu	Ile										
		95			85					90			
	Gln	Pro	Leu	Thr	Val	Gly	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser
35	Ser	Leu	Leu										
	110			100					105				

ES 2 443 490 T3

5	Thr Gly	Gln Ile	Ile Val 115	Cys	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	His	Val	His	120	125
10	Phe Leu	Glu Asp	Asp Phe 130	Asn	Val	Asp	Thr	Glu	Ala	Val	Ala	Gln	Ile	135	140
15	Ile Gly	Ser Gly	Ser Ser 160	Gln	Thr	His	Val	Pro	Ile	Leu	Ser	Ile	Ser	145	155
20	Ala Leu	Val Gln	Val Leu 175	Leu	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Gly	Ser	Ala	Phe	165	170
25	Gly Val	Val Leu	Ser Glu 180	Leu	Glu	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	190	185
30	Glu His	Tyr Pro	Asp Gly 195	Trp	Ser	Ala	Phe	Ala	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	200	205
35	His Ala	Ala Ser	Leu His 210	Phe	Leu	Glu	Gly	Val	Arg	Ala	Val	Ala	Asp	215	220
	Val Gly	Ser Pro	Trp Gly	Arg	Leu	Leu	Asp	Val	Val	Thr	Leu	Glu	Leu		

ES 2 443 490 T3

	225		240		230		235						
5	Gly Asp	Pro Ala	Arg Pro	Ala	Arg	Thr	Gln	Arg	Leu	Leu	Arg	Gln	Leu
		255			245					250			
10	Val Leu	Phe Phe	Val Ala	Ala	Tyr	Cys	Ser	Arg	Glu	Glu	Ala	Glu	Val
	270			260					265				
15	Glu Trp	Ala Leu	Ala Val	Gln	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Pro	Gly	His	Val
			275					280					285
20	Pro Thr	Asn Phe	Leu Pro	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asp	Ala	Pro	Pro	Ala
		290					295					300	
25	Val Ser	Gly Leu	Leu Arg	Ile	Ser	Val	Val	Thr	Glu	Ser	Trp	Arg	Leu
	305		320				310				315		
30	Gln Ala	Lys His	Val Ser	Arg	Asp	Gly	Val	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly
			335		325					330			
35	Tyr Asp	Trp Cys	Arg Arg	Gln	His	Gly	Thr	Leu	Pro	Ala	Pro	Ala	Gly
	350			340					345				

5	Val His Pro Gly Pro Val Ser Pro Ala Arg Glu Ala Phe Tyr Arg His 355	360	365
10	Leu Leu Asn Val Thr Trp Glu Gly Arg Asp Phe Ser Phe Ser Pro Gly 370	375	380
15	Gly Tyr Leu Val Gln Pro Thr Met Val Val Ile Ala Leu Asn Arg His 385	390	395
20	Arg Leu Trp Glu Met Val Gly Arg Trp Glu His Gly Val Leu Tyr Met 415	405	410
25	Lys Tyr Pro Val Trp Pro Arg Tyr Ser Ala Ser Leu Gln Pro Val Val 430	420	425
30	Asp Ser Arg His Leu Thr Val Ala Thr Leu Glu Glu Arg Pro Phe Val 435	440	445
	Ile Val Glu Ser Pro Asp Pro Gly Thr Gly Gly Cys Val Pro Asn Thr 450	455	460

ES 2 443 490 T3

5	Val 465	Pro Asp	Cys Val	Arg	Arg	Gln	Ser	Asn	His	Thr	Phe	Ser	Ser
			480			470					475		
10	Ala 495	Pro Ile	Tyr Leu	Thr	Lys	Leu	Cys	Cys	Lys	Gly	Phe	Cys	Ile
					485					490			
15	Lys 510	Lys Leu	Leu Val	Ala	Arg	Val	Val	Lys	Phe	Ser	Tyr	Asp	Leu
				500					505				
20	Thr 525	Asn Gly	Gly Met	Lys	His	Gly	Lys	Arg	Val	Arg	Gly	Val	Trp
			515					520					525
25	Ile 540	Gly Ser	Glu Leu	Val	Tyr	Tyr	Lys	Arg	Ala	Asp	Met	Ala	Ile
		530					535					540	
30	Thr 555	Ile Pro	Asn Phe	Glu	Glu	Arg	Ser	Glu	Ile	Val	Asp	Phe	Ser
	545		560			550					555		
35	Val 575	Glu Thr	Thr Val	Gly	Ile	Ser	Val	Met	Val	Ala	Arg	Ser	Asn
					565					570			
	Ser Trp	Pro Val	Ser Met	Ala	Phe	Leu	Glu	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ala	Val



5 Pro Gln Asp Gln Tyr Pro Pro Phe Arg Phe Gly Thr Val  
 Pro Asn Gly 710 715  
 705 720

10 Ser Thr Glu Arg Asn Ile Arg Ser Asn Tyr Arg Asp Met  
 His Thr His 725 730  
 735

15 Met Val Lys Phe Asn Gln Arg Ser Val Glu Asp Ala Leu  
 Thr Ser Leu 740 745  
 750

20 Lys Met Gly Lys Leu Asp Ala Phe Ile Tyr Asp Ala Ala  
 Val Leu Asn 755 760 765

25 Tyr Met Ala Gly Lys Asp Glu Gly Cys Lys Leu Val Thr  
 Ile Gly Ser 770 775 780

30 Gly Lys Val Phe Ala Thr Thr Gly Tyr Gly Ile Ala Met  
 Gln Lys Asp 785 790 795  
 800

35 Ser His Trp Lys Arg Ala Ile Asp Leu Ala Leu Leu Gln  
 Phe Leu Gly 805 810  
 815

40 Asp Gly Glu Thr Gln Lys Leu Glu Thr Val Trp Leu Ser  
 Gly Ile Cys 820 825  
 830

45 Gln Asn Glu Lys Asn Glu Val Met Ser Ser Lys Leu Asp  
 Ile Asp Asn 835 840 845

50 Met Ala Gly Val Phe Tyr Met Leu Leu Val Ala Met Gly  
 Leu Ala Leu 850 855 860

55 Leu Val Phe Ala Trp Glu His Leu Val Tyr Trp Lys Leu  
 Arg His Ser 865 870 875  
 880

60 Val Pro Asn Ser Ser Gln Leu Asp Phe Leu Leu Ala Phe  
 Ser Arg Val 885 890  
 895

Gly Ala His Pro Ser Pro His Arg Pro Lys Phe  
 900 905

<210> 6  
 <211> 2724  
 <212> DNA

ES 2 443 490 T3

<213> Human

<400> 6

```

5      cgcgggcagg gcggggacac gcggagcaaa ggcacccggc
      aacctgaacc cccaggtgcg          60

      tcccgcgacc ctgcaaggag ctgctggggac cctccggtgg
      acatgggtgg ggccctgggg          120

10     ccggccctgt tgctcacctc gctcttcggt gcctgggcag
      ggctgggtcc ggggcagggc          180

      gagcagggca tgacgggtggc cgtggtggtt agcagctcag
      ggccgccccca ggcccagttc          240

15     cgtgcccggc tcacccccca gagcttcctg gacctacccc
      tggagatcca gccgctcaca          300

      gttgggggtca acaccaccaa ccccagcagc ctctcacc
      agatctgctgg cctcctgggt          360

20     gctgcccacg tccacggcat tgtctttgag gacaacgtgg
      acaccgaggc ggtggcccag          420

      atccttgact tcatctcctc ccagacccat gtgcccattc
      tcagcatcag cggaggctct          480

25     gctgtgggtc tcacccccaa ggagccgggc tccgccttcc
      tgcagctggg cgtgtccctg          540

      gagcagcagc tgcaggtgct gttcaagggt ctggaagagt
      acgactggag cgccttcgcc          600

30     gtcattacca gcctgcaccc gggccacgcg ctcttcctgg
      agggcgctgcg cgccgctcgcc          660

      gacgccagcc acgtgagttg gcggctgctg gacgtggtca
      cgctggagct gggcccggga          720

35     gggccgcgcg cgcgcacgca gcgcctgctg cgccagctcg
      acgcgcccgt gtttgtggcc          780

      tactgctcgc gcgaggaggc cgagggtgctc ttcgccgagg
      cggcgaggc cggctcgggtg          840

40     gggcccggcc acgtgtggct ggtgcccac ctggcgctgg
      gcagcaccga tgcgcccccc          900

      gccaccttcc ccgtgggcct catcagcgtc gtcaccgaga
      gctggcgctc cagcctgcgc          960

```

ES 2 443 490 T3

	<b>cagaaggtgc</b>	<b>gcgacggcgt</b>	<b>ggccattctg</b>	<b>gcccctgggcg</b>
	<b>cccacagcta</b>	<b>ctggcgccag</b>	<b>1020</b>	
5	<b>catggaaccc</b>	<b>tgccagcccc</b>	<b>ggccggggac</b>	<b>tgccgtgttc</b>
	<b>accctgggcc</b>	<b>cgtcagccct</b>	<b>1080</b>	
	<b>gcccgggagg</b>	<b>ccttctacag</b>	<b>gcacctactg</b>	<b>aatgtcacct</b>
	<b>gggagggccg</b>	<b>agacttctcc</b>	<b>1140</b>	
10	<b>ttcagccctg</b>	<b>gtgggtacct</b>	<b>ggtcagccc</b>	<b>accatggtgg</b>
	<b>tgatcgccct</b>	<b>caaccggcac</b>	<b>1200</b>	
	<b>cgccctctggg</b>	<b>agatgggtggg</b>	<b>gcgctgggag</b>	<b>catggcgctcc</b>
	<b>tatacatgaa</b>	<b>gtaccccgtg</b>	<b>1260</b>	
15	<b>tgccctcgct</b>	<b>acagtgcctc</b>	<b>tctgcagcct</b>	<b>gtggtggaca</b>
	<b>gtcggcacct</b>	<b>gacggtggcc</b>	<b>1320</b>	
	<b>acgctggaag</b>	<b>agcggccctt</b>	<b>tgtcatctg</b>	<b>gagagccctg</b>
	<b>accctggcac</b>	<b>aggaggctgt</b>	<b>1380</b>	
20	<b>gtccccaaca</b>	<b>ccgtgccctg</b>	<b>ccgcaggcag</b>	<b>agcaaccaca</b>
	<b>ccttcagcag</b>	<b>cggggacgtg</b>	<b>1440</b>	
	<b>gccccctaca</b>	<b>ccaagctctg</b>	<b>ctgtaagga</b>	<b>ttctgcatcg</b>
	<b>acatcctcaa</b>	<b>gaagctggcc</b>	<b>1500</b>	
25	<b>agagtgggtca</b>	<b>aatttccta</b>	<b>cgacctgtac</b>	<b>ctggtgacca</b>
	<b>acggcaagca</b>	<b>tggcaagcgg</b>	<b>1560</b>	
	<b>gtgcgcggcg</b>	<b>tatggaacgg</b>	<b>catgattggg</b>	<b>gaggtgtact</b>
	<b>acaagcgggc</b>	<b>agacatggcc</b>	<b>1620</b>	
30	<b>atcggctccc</b>	<b>tcaccatcaa</b>	<b>tgaggaacgc</b>	<b>tccgagatcg</b>
	<b>tagacttctc</b>	<b>tgtacccttt</b>	<b>1680</b>	
	<b>gtggagacgg</b>	<b>gcatcagtgt</b>	<b>gatggtggct</b>	<b>cgcagcaatg</b>
	<b>gcaccgtctc</b>	<b>cccctcggcc</b>	<b>1740</b>	
35	<b>ttcttggagc</b>	<b>catatagccc</b>	<b>tgcaagtgtg</b>	<b>gtgatgatgt</b>
	<b>ttgtcatgtg</b>	<b>cctcactgtg</b>	<b>1800</b>	
	<b>gtggccatca</b>	<b>ccgtcttcat</b>	<b>gttcgagtac</b>	<b>ttcagccctg</b>
	<b>tcagctacaa</b>	<b>ccagaacctc</b>	<b>1860</b>	

ES 2 443 490 T3

	accagaggca	agaagtccgg	gggcccagct	ttcactatcg
	gcaagtccgt	gtggctgctg	1920	
5	tgggcgctgg	tcttcaacaa	ctcagtgcc	atcgagaacc
	cgcggggcac	caccagcaag	1980	
	atcatgggtc	tggctctggg	cttctttgct	gtcatcttcc
	tcgccagcta	cacggccaac	2040	
10	ctggccgcct	tcatgatcca	agagcaatac	atcgacactg
	tgtcgggcct	cagtgacaag	2100	
	aagtttcagc	ggcctcaaga	tcagtaacca	cttttccgct
	tcggcacggt	gccaacggc	2160	
15	agcacggagc	ggaacatccg	cagtaactac	cgtgacatgc
	acaccacat	ggtcaagttc	2220	
	aaccagcgct	cggtggagga	cgcgctcacc	agcctcaaga
	tggggaagct	ggatgccttc	2280	
20	atctatgatg	ctgctgtcct	caactacatg	gcaggcaagg
	acgagggctg	caagctggtc	2340	
	accattgggt	ctggcaagg	ctttgctacc	actggctacg
	gcatcgccat	gcagaaggac	2400	
25	tcccactgga	agcggggccat	agacctggcg	ctcttgcaagt
	tcctggggga	cggagagaca	2460	
	cagaaaactgg	agacagtgtg	gctctcaggg	atctgccaga
	atgagaagaa	cgaggtgatg	2520	
30	agcagcaagc	tggacatcga	caacatggca	ggcgtcttct
	acatgctgct	ggaggccatg	2580	
	gggctggccc	tgctggtcct	cgcttgggag	cacctggtct
	actggaagct	gcgccactcg	2640	
35	gtgcccact	catcccagct	ggacttcctg	ctggctttca
	gcagggtggg	tgcccacccc	2700	
	tccccacaca	ggccaaagt	taa	

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para diagnosticar un receptor anti-NMDA de encefalitis en un sujeto, consiste del paso de pruebas de una muestra biológica obtenida del sujeto para detectar la presencia de un anticuerpo contra la subunidad NR de un receptor NMDA, en donde una presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica indica dicho receptor anti-NMDA de encefalitis, y en donde el receptor anti-NMDA de encefalitis está asociado con movimiento distónico, disquinesias, o inestabilidad autónoma, diagnosticando por lo tanto a dicho receptor anti-NMDA de encefalitis en dicho sujeto.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la subunidad NR es NR1 o NR2.
- 15 3. Un método para diagnosticar la encefalitis autoinmune asociada con un tumor en un sujeto, consiste del paso de pruebas de una muestra biológica obtenida del sujeto para un anticuerpo a un heterómero NR de un receptor NMDA, en donde una presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica indica una encefalitis autoinmune asociada con un tumor, determinando por lo tanto una causa de dicha encefalitis en un sujeto.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde dicho tumor es un teratoma del ovario.
- 25 5. Un método de diagnosticar un tumor oculto asociado con una encefalitis autoinmune en un sujeto, consiste del paso de pruebas de un líquido corporal obtenido de un sujeto para un anticuerpo a un heterómero NR del receptor NMDA, donde una presencia de dicho anticuerpo indica una presencia de un tumor oculto en dicho sujeto y que dicho tumor es una causa de dicha encefalitis autoinmune.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, donde dicha encefalitis autoinmune es  
 (i) una encefalitis autoinmune paraneoplásica, o  
 (ii) una encefalitis autoinmune que consiste de una encefalitis límbica; o  
 (iii) una encefalitis autoinmune que está asociada con crisis epilépticas; o  
 (iv) una encefalitis autoinmune que está asociada con síntomas patológicos.
- 35 7. El método de la reivindicación 6 (iv), donde dichos síntomas patológicos son síntomas psiquiátricos; una anomalía en cognición y comportamiento, un trastorno del movimiento; una disminución del nivel de consciencia; inestabilidad autónoma; hipoventilación; amnesia o un déficit de memoria; o una combinación de los mismos.
- 40 8. Un método para diagnosticar epilepsia en un sujeto, consiste del paso de pruebas de un líquido corporal obtenido del sujeto para la presencia de un anticuerpo a un heterómero NR del receptor NMDA, donde una presencia de dicho anticuerpo indica una presencia de un tumor en dicho sujeto y que dicho tumor es una causa de dicha epilepsia, diagnosticando por lo tanto la epilepsia en dicho sujeto.
- 45 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, donde dicho heterómero NR es heterómero NR1 y NR2.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, donde dicho heterómero NR  
 (i) es un heterómero NR2A; o  
 (ii) es un heterómero NR2B; o  
 (iii) es un heterómero NR2C.
- 55 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el líquido corporal es líquido cefalorraquídeo (LCR).
12. Un método de diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene epilepsia, consiste del paso de pruebas de un líquido corporal obtenido del sujeto para un anticuerpo a un heterómero NR del receptor NMDA, donde una presencia de dicho anticuerpo indica una presencia de un tumor en dicho sujeto, por lo tanto diagnosticando un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia.
13. El método de la reivindicación 12, donde el heterómero NR del receptor NMDA es un heterómero NR1, NR2 o ambos.
14. El método de la reivindicación 13, donde dichos heterómero NR2 es una subunidad NR2B, una subunidad NR2A o una subunidad NR2C.

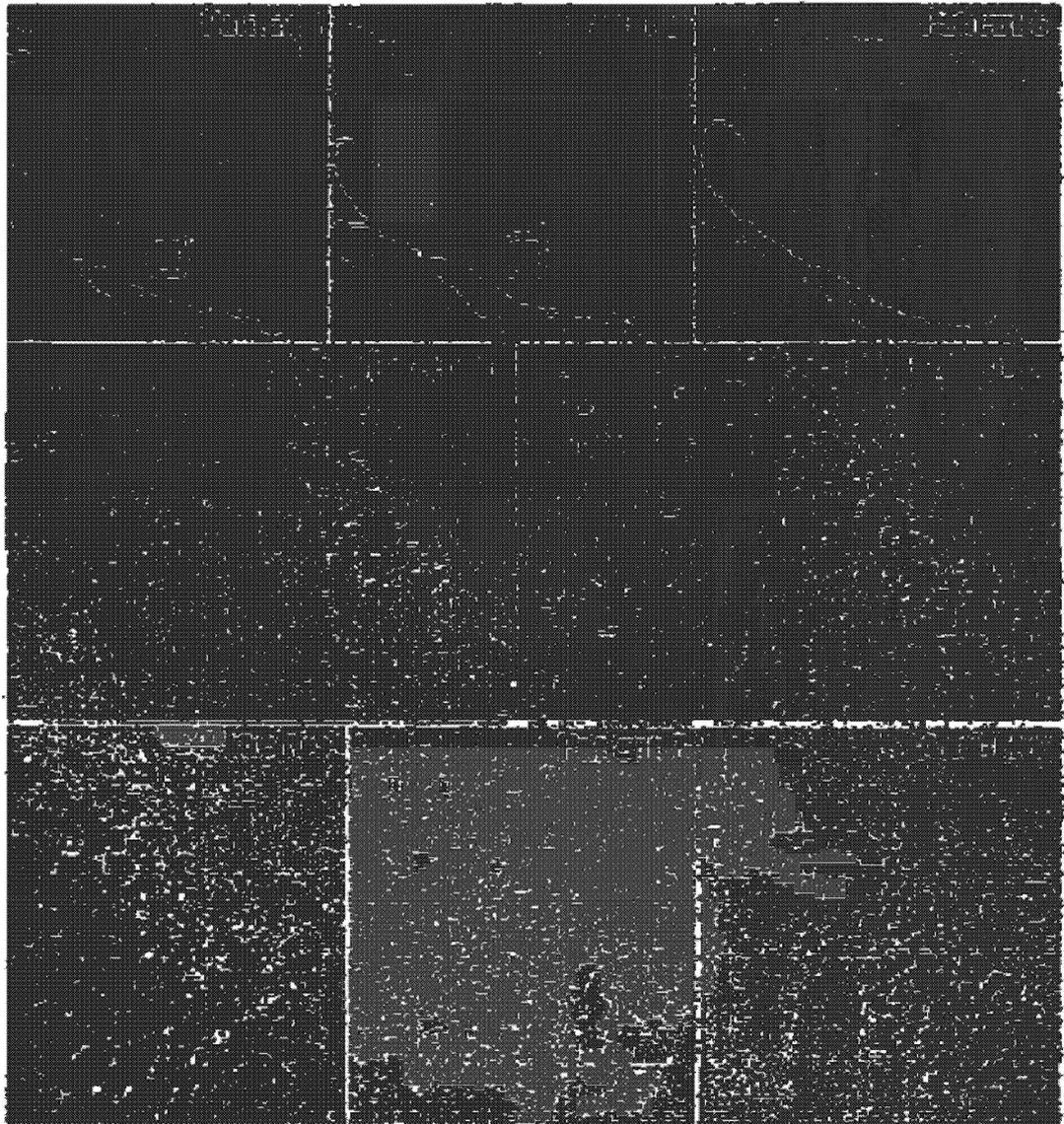


Figura 1

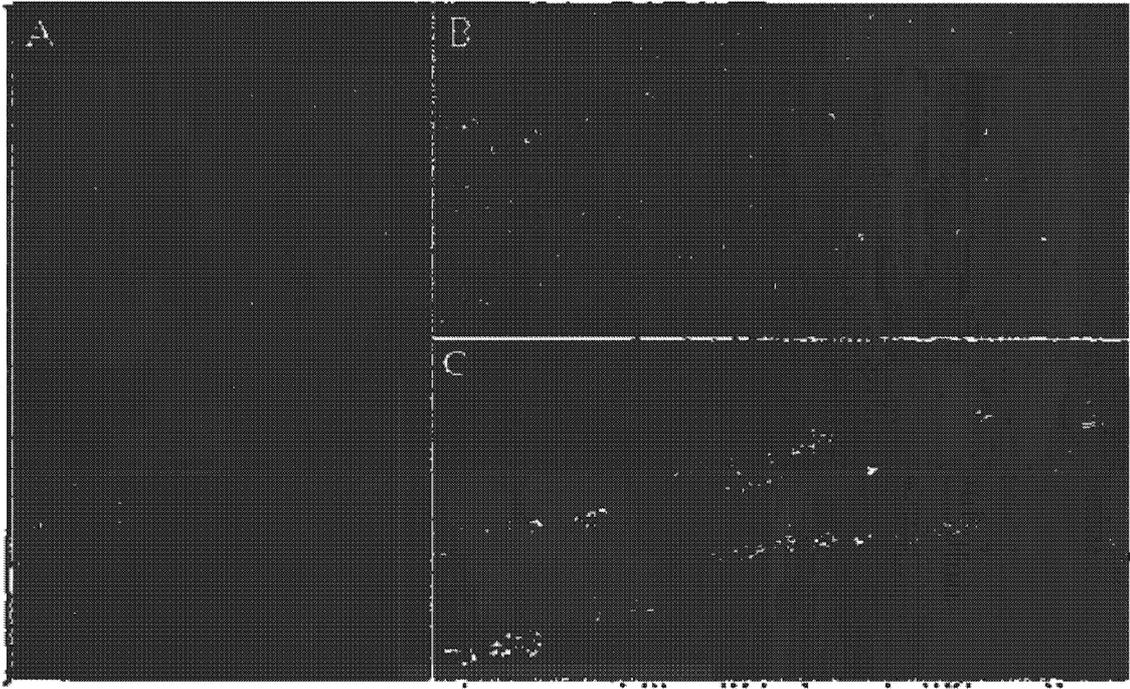


Figura 2

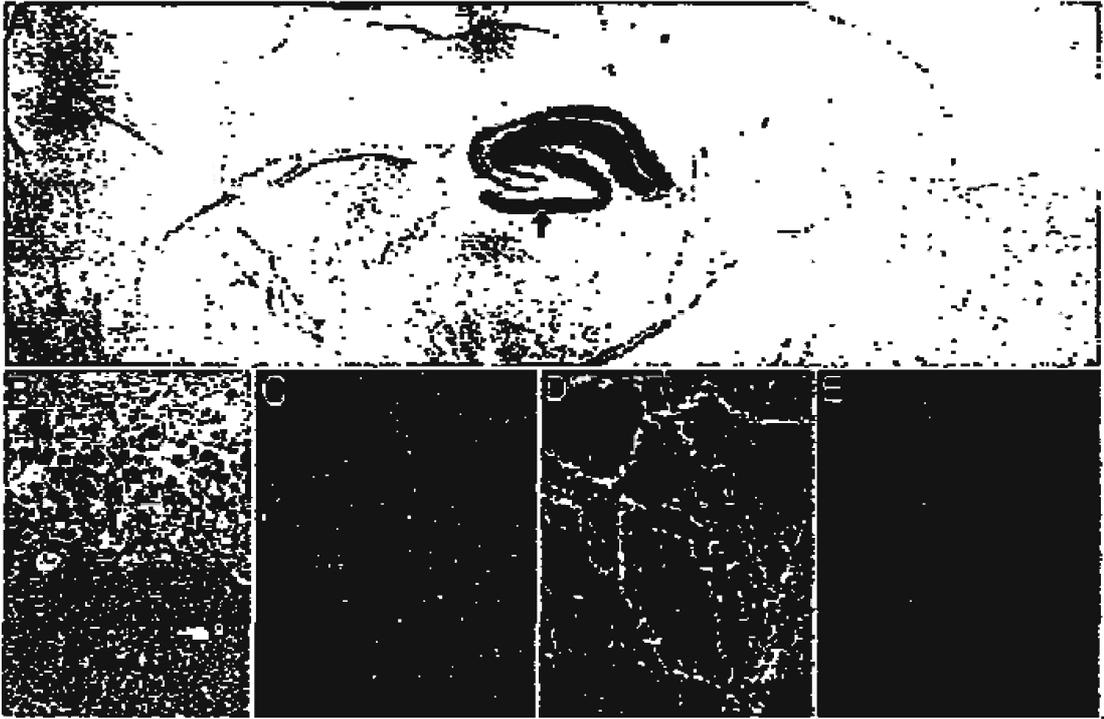


Figura 3

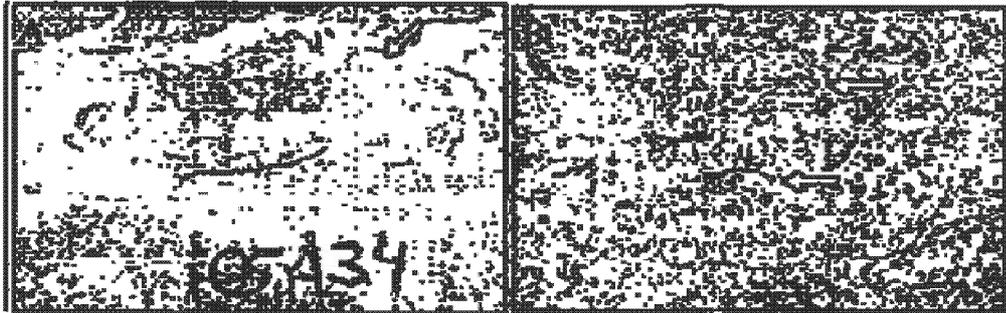


Figura 4

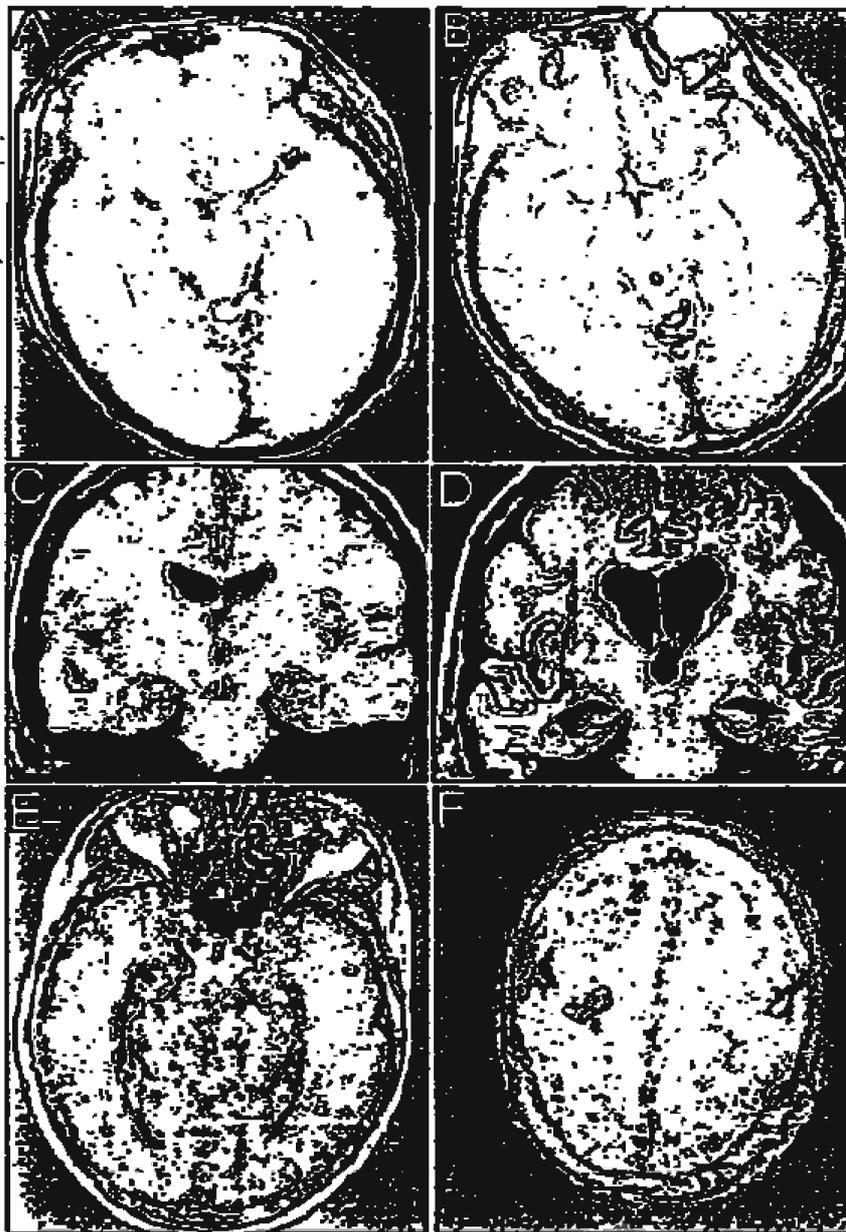


Figura 5

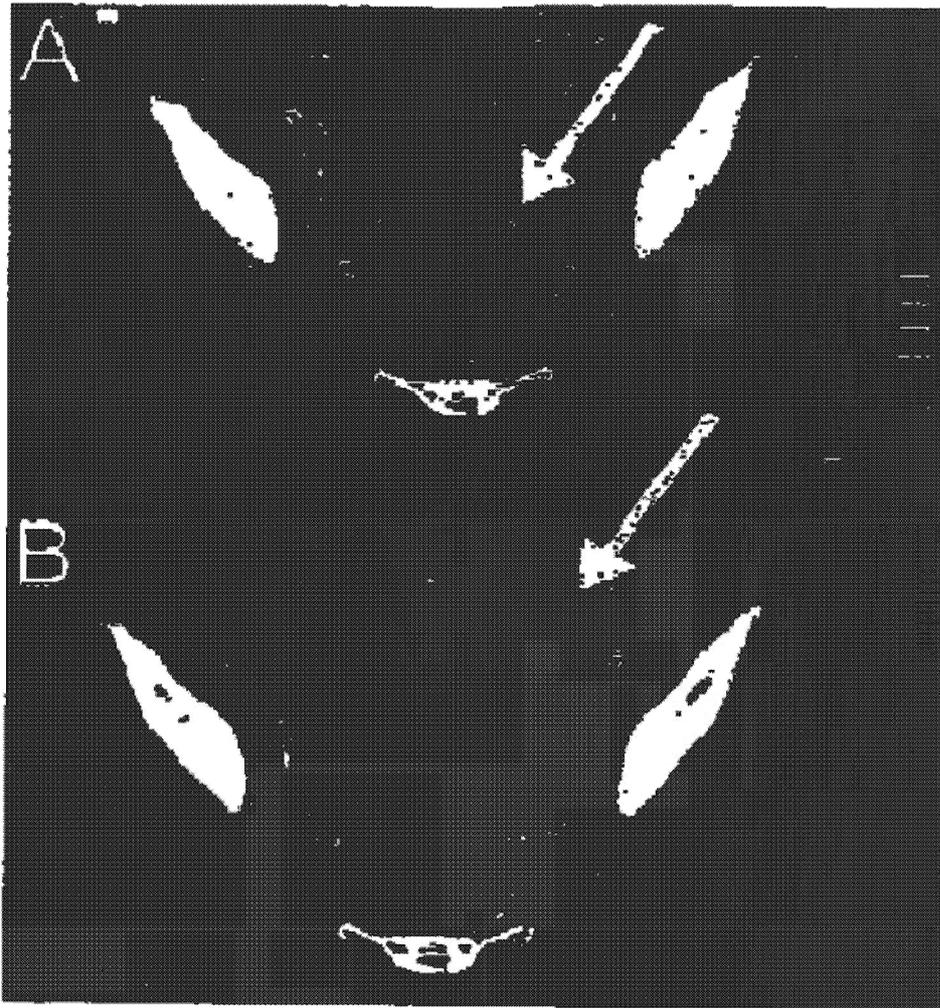


Figura 6

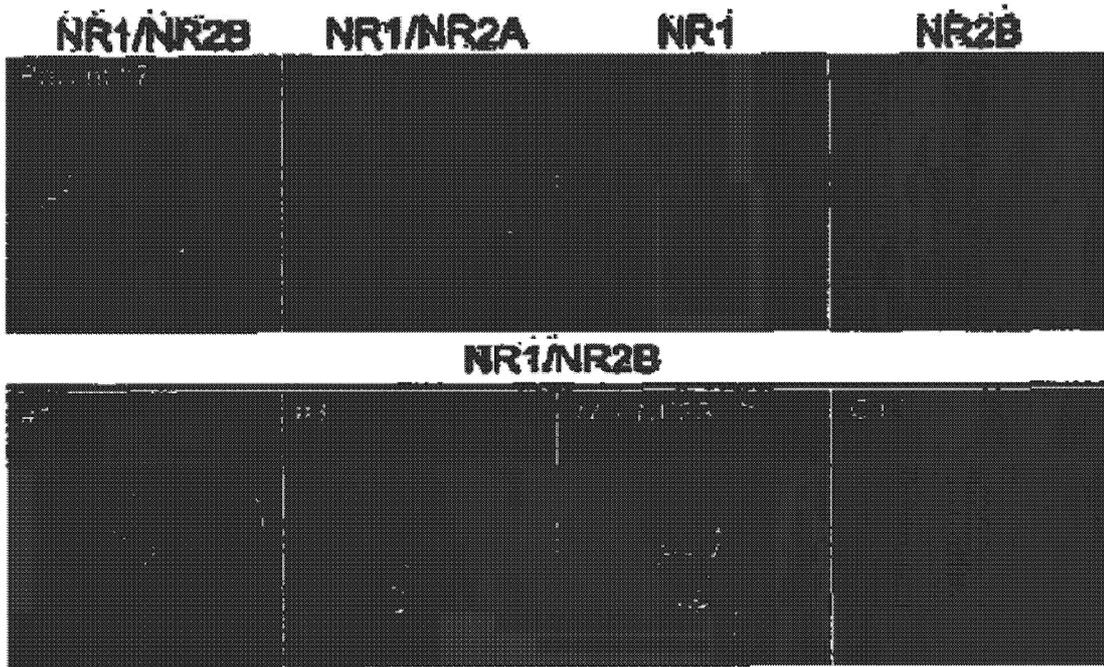


Figura 7

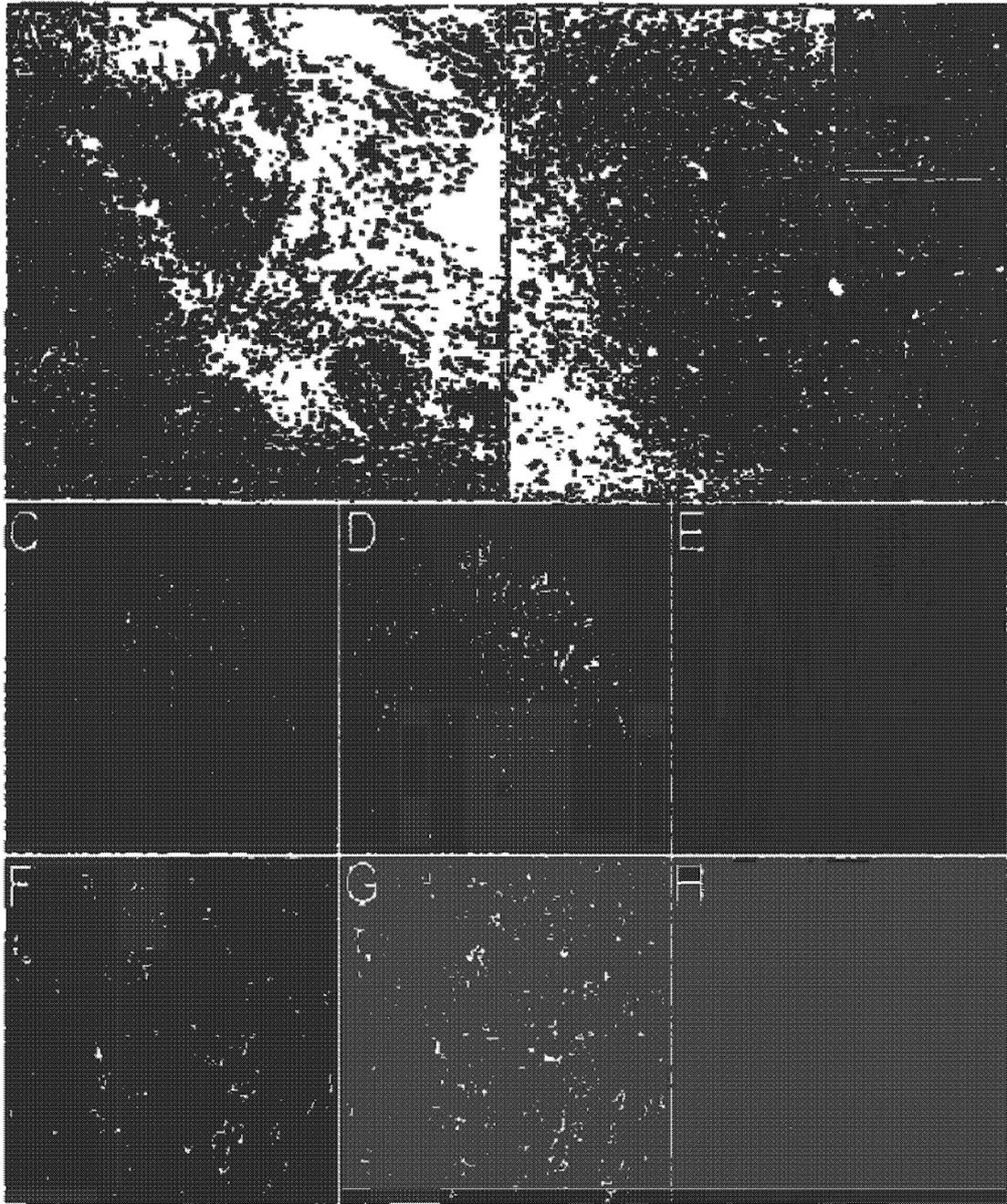


Figura 8