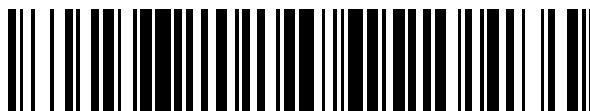


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 880**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2009** **E 09756346 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015** **EP 2350661**

54 Título: **Trastornos autoinmunitarios neurológicos**

30 Prioridad:

25.10.2008 GB 0819634

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

12.11.2015

73 Titular/es:

**ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)
University of Oxford Ewert House Ewert Place
Summertown
Oxford OX2 7SG, GB**

72 Inventor/es:

VINCENT, ANGELA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 550 880 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

Trastornos autoinmunitarios neurológicos

5 La presente invención se refiere a trastornos autoinmunitarios, y en particular a métodos de diagnosticar tales trastornos en mamíferos. La presente invención también proporciona kits para uso en dicho diagnóstico, y métodos y composiciones para detectar autoanticuerpos.

10 Los anticuerpos contra canales de potasio operados por voltaje (VGKC) se asocian con tres síndromes clínicos principales: neuromiotonía (MNT), síndrome de Morvan (SMo) y encefalitis límbica (EL). MNT describe síndromes de hiperexcitabilidad de nervios periféricos que producen calambres musculares y rigidez, y algunas veces dolor. El SMo describe MNT más características autonómicas, por ejemplo, sudoración excesiva, estreñimiento, irregularidades cardíacas y características del sistema nervioso central, particularmente confusión, alucinaciones e insomnio. La EL asociada con anticuerpos anti-VGKC incluye las características restringidas al sistema nervioso central (SNC) de amnesia, trastornos de la personalidad o psiquiátricos, y convulsiones (epilepsia). Estas afecciones (particularmente el SMo) se pueden asociar con tumores tímicos u otros (carcinoma de pulmón, linfoma, neoplasias malignas ginecológicas) pero la EL asociada a anticuerpo anti-VGKC es principalmente no paraneoplásica. Los tres síndromes tienen un inicio subagudo y pueden responder a inmunoterapia. Además, hay reconocimiento de estos anticuerpos en algunos pacientes que presentan otros síndromes clínicos tal como epilepsia idiopática. La mayoría de los pacientes hasta ahora son adultos, pero se han identificado algunos niños con estos anticuerpos y EL o epilepsia. Como ya se ha demostrado in vivo con MNT [1], mucha evidencia apoya un papel patogénico de la inmunoglobulina G (IgG) en EL y SMo. En primer lugar, los pacientes con frecuencia experimentan una recuperación clínica rápida después del intercambio de plasma [2, 3]. En segundo lugar, los títulos del anticuerpo en un paciente individual se correlacionan bien con alteraciones en el estado clínico [2, 3]. En tercer lugar, la IgG del paciente se une al hipocampo, la región anatómica a la que se pueden localizar casi todas las características clínicas del SNC [2-4]. Aproximadamente 500 pacientes con anticuerpos anti-VGKC y características del SNC han sido diagnosticados en los últimos 5 años en el RU (A Vincent, observaciones sin publicar).

30 Los sueros de pacientes que inmunoprecipitan homogenizado de cerebro de mamífero solubilizado con digitonina marcado con alfa-dendrotoxina yodada (I^{125} - α DTX) se designan como que contienen anticuerpos anti-VGKC [5, 6]. Los canales de potasio operados por voltaje consisten en un número de familias estructuralmente diferentes de canales incluyendo el subtipo Kv1 (Shaker). Las subunidades de Kv1 alfa pueden homo- o heterotetramerizar exclusivamente con otras subunidades de Kv1 para formar canales activos. α DTX se une a canales Kv1.1, 1.2 y 1.6 que están todos presentes en tejido cerebral y Kv1.1 y 1.2 se encuentran en nervios periféricos. Estas 3 subunidades pueden tener su función y expresión de superficie modulada por Kv1.4 y por Kv β 1, 2 y 3, donde Kv β 2 es el miembro Kv β más abundante en tejido cerebral.

40 Los pacientes con EL y SMo generalmente tienen títulos de anticuerpo anti-VGKC mayores que los pacientes de MNT. Las dianas antigénicas y efectos funcionales de anticuerpos anti-VGKC en MNT se han estudiado previamente en detalle y se ha mostrado que la IgG de MNT se une a Kv1 expresados y disminuye las corrientes de Kv1 [5-7] pero solo un estudio ha examinado los anticuerpos anti-VGKC de EL o SMo [8].

45 Recientemente, se ha descrito un número de proteínas novedosas que interaccionan con Kv1 [9, 10]. La presente invención muestra que proteínas del complejo Kv1, por ejemplo, las tres proteínas del complejo de Kv1 CASPR2 (proteína asociada a contactina 2), Lgi1 (gen inactivado de glioma rico en leucina 1), TAG1 (glicoproteína axonal transitoria 1, también conocida como contactina 2), y no necesariamente las proteínas de Kv1 mismas, son las dianas para autoanticuerpos de algunos pacientes con EL y SMo.

50 Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnosticar un trastorno autoinmunitario neurológico seleccionado del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan, y neuromiotonía en un mamífero, que comprende el paso de detectar, en una muestra de fluido corporal del mamífero, autoanticuerpos hacia un epítipo de al menos una proteína del complejo Kv1, en donde la proteína del complejo Kv1 comprende al menos una de CASPR2 (proteína asociada a contactina 2), Lgi1 (gen inactivado de glioma rico en leucina 1), TAG1 (glicoproteína axonal transitoria 1); en donde el método comprende los pasos de a) poner en contacto el fluido corporal con la al menos una proteína del complejo Kv1; y b) detectar cualquier complejo autoanticuerpo-antígeno formado entre la al menos una proteína del complejo Kv1 y autoanticuerpos presentes en el fluido corporal, en donde la presencia de dicho complejo es indicativa de un trastorno neurológico autoinmunitario; en donde el trastorno neurológico autoinmunitario se selecciona del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan y neuromiotonía.

60 La al menos una proteína del complejo Kv1 puede estar acomplejada/unida con otras proteínas del complejo Kv1, o la al menos una proteína de Kv1 puede estar separada del complejo Kv1, por ejemplo, no colocalizada, o no físicamente unida al complejo. Los autoanticuerpos se pueden unir a las proteínas normalmente acomplejadas/unidas incluso cuando no están en estado acomplejado/unido.

65

La proteína del complejo Kv1 puede ser una proteína accesoria esencial o no esencial a Kv1. La proteína del complejo Kv1 comprende al menos una de CASPR2, Lgi1 y TAG1. En una forma de realización, las proteínas del complejo Kv1 pueden no comprender Kv1.

- 5 CASPR2, Lgi1 y TAG1 son proteínas que se ha mostrado que interaccionan o están físicamente unidas con Kv1. Por ejemplo, CASPR2 y Tag1 son necesarias para la localización de proteínas de Kv1 en los nódulos de Ranvier.

La proteína del complejo Kv1 puede comprender, o consistir esencialmente en, CASPR2. La proteína del complejo Kv1 puede comprender, o consistir esencialmente en, Lgi1. La proteína del complejo Kv1 puede comprender, o consistir esencialmente en, TAG1. La proteína del complejo Kv1 puede comprender, o consistir esencialmente en, una proteína del complejo Kv1 diferente de CASPR2, Tag1, Lgi1, y Kv1.

Preferiblemente el trastorno neurológico es encefalitis límbica o síndrome de Morvan, o neuromiotonía. Donde el trastorno neurológico es encefalitis límbica, la característica dominante del trastorno neurológico puede comprender convulsiones, por ejemplo, epilepsia, o amnesia, o trastorno psiquiátrico solo.

Donde el trastorno neurológico autoinmunitario es síndrome de Morvan y/o neuromiotonía, la proteína del complejo Kv1 puede comprender CASPR2. Los autoanticuerpos dirigidos contra CASPR2 pueden ser indicativos de, o estar asociados con, un riesgo aumentado de neoplasias malignas del timo y/o otras neoplasias malignas.

Donde el trastorno neurológico autoinmunitario es encefalitis límbica, la proteína del complejo Kv1 puede comprender Lgi1.

Donde el trastorno neurológico autoinmunitario es neuromiotonía y/o encefalitis límbica, la proteína del complejo Kv1 puede comprender TAG1.

Donde el trastorno neurológico autoinmunitario es encefalitis límbica, síndrome de Morvan o neuromiotonía la proteína del complejo Kv1 puede comprender CASPR2 y TAG1.

Preferiblemente, el método de la invención comprende además los pasos de a) poner en contacto el fluido corporal con la proteína del complejo Kv1 o un determinante antigénico de la misma; y b) detectar cualquier complejo anticuerpo-antígeno formado entre proteína del complejo Kv1 o un determinante antigénico de la misma y anticuerpos presentes en el fluido corporal, en donde la presencia de dicho complejo es indicativa de un trastorno neurológico autoinmunitario, preferiblemente de encefalitis límbica, síndrome de Morvan o neuromiotonía.

Preferiblemente, el método de la invención se realiza en combinación con una valoración de síntomas clínicos. La combinación del método de la invención y un análisis de los síntomas clínicos se puede usar para determinar el trastorno neurológico específico que tiene un individuo.

El autoanticuerpo se puede detectar por cualquier técnica de ensayo inmunológico, de las cuales muchas se conocen en la técnica. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen ELISA, radioinmunoensayo, un ensayo de competición, un ensayo de inhibición, un ensayo en sándwich y similares. En términos generales, tales ensayos usan un antígeno, que se puede inmovilizar sobre un soporte sólido. Una muestra que se va a ensayar se pone en contacto con el antígeno y si están presentes autoanticuerpos específicos para el antígeno en la muestra reaccionarán inmunológicamente con el antígeno para formar complejos de autoanticuerpos y antígeno, que se pueden detectar después medir cuantitativamente. De forma alternativa, el antígeno se puede expresar en la superficie o dentro de una célula que se permeabiliza [16]. La detección de los complejos autoanticuerpo-antígeno se puede llevar a cabo usando un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina humana, típicamente anti-IgG, o anti-IgM humana, que reconoce las características generales comunes a todas las IgG o IgM humanas respectivamente. El anticuerpo secundario habitualmente está conjugado a una enzima tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano (HRP), de modo que la detección de un complejo autoanticuerpo/antígeno/anticuerpo secundario se logra mediante la adición de un sustrato enzimático y posterior detección colorimétrica, quimioluminiscente o fluorescente de los productos de reacción enzimáticos, o se puede conjugar a una señal fluorescente [16]. Preferiblemente el método usa un anticuerpo secundario que es un anticuerpo anti-IgG etiquetado o marcado. Preferiblemente el anticuerpo anti-IgG está marcado con una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un metal pesado, una molécula fluorescente o luminiscente, una etiqueta radioactiva o una etiqueta enzimática. Una etiqueta enzimática puede ser HRP.

Preferiblemente la intensidad de la señal del anticuerpo anti-IgG es indicativa de la cantidad relativa de autoanticuerpo de la proteína del complejo Kv1 en el fluido corporal cuando se compara con un control positivo o negativo.

Según un aspecto adicional, la invención proporciona un kit de ensayo para diagnosticar, en un mamífero, un trastorno neurológico autoinmunitario seleccionado del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan, y neuromiotonía según el método de la invención, en donde el kit comprende al menos un epítipo de al

menos una proteína del complejo Kv1, en donde la proteína del complejo Kv1 comprende al menos una de CASPR2, Lgi1 y TAG1, e instrucciones para usar el kit.

- 5 Preferiblemente el kit también comprende medios para poner en contacto el al menos un epítipo de al menos una proteína del complejo Kv1 con una muestra de fluido corporal de un mamífero. Preferiblemente el trastorno neurológico es encefalitis límbica, síndrome de Morvan o neuromiotonía.

Un kit según la invención puede comprender además una solución estándar para preparar una curva de calibración.

- 10 Se puede proporcionar un autoanticuerpo aislado o purificado específico para un epítipo de al menos una proteína del complejo Kv1. Tal anticuerpo puede estar aislado de una muestra de fluido corporal.

- 15 Se puede proporcionar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado o purificado específico para al menos un autoanticuerpo de proteína del complejo Kv1. Tal anticuerpo se puede usar como un medicamento, o en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico en donde el trastorno neurológico es encefalitis límbica, síndrome de Morvan, o neuromiotonía. Tal anticuerpo se puede incluir en una composición farmacéutica junto con un soporte, excipiente o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

- 20 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales o policlonales o fragmentos de anticuerpo usando técnicas que conoce bien el experto en la materia.

- 25 También se puede usar un anticuerpo específico para autoanticuerpos de proteína del complejo Kv1 en un kit diagnóstico para detectar trastornos neurológicos tal como encefalitis límbica, síndrome de Morvan o neuromiotonía, o para determinar un riesgo aumentado de tales afecciones.

- Un fluido corporal para su uso en cualquier aspecto de la invención puede comprender plasma, suero, sangre completa, orina, sudor, linfa, heces, líquido cefalorraquídeo, o aspirado de pezón. Preferiblemente el fluido corporal es suero o plasma.

- 30 Según un aspecto aún adicional, la invención proporciona un método de identificar compuestos capaces de tratar un trastorno neurológico, seleccionado del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan y neuromiotonía, que comprende los pasos de poner en contacto un compuesto candidato en presencia de al menos una proteína del complejo Kv1 o un epítipo de la misma y un anticuerpo capaz de unir al menos una proteína del complejo Kv1, en donde la proteína del complejo Kv1 comprende al menos una de CASPR2, Lgi1 y TAG, y en donde un compuesto que previene la unión de dicho anticuerpo a al menos una proteína del complejo Kv1 o un epítipo de la misma es un candidato para tratar trastornos neurológicos seleccionados del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan y neuromiotonía.

- 40 El experto en la materia apreciará que cualquiera de las características preferibles comentadas anteriormente se puede aplicar a cualquiera de los aspectos de la invención.

Las formas de realización preferidas de la presente invención se describirán ahora, solamente a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

- 45 **Figura 1** - Sueros de EL o SMO precipitan Kv1 de extracto de corteza de conejo pero no se unen directamente a los Kv1.

A. Titulaciones de sueros de EL y SMO precipitan altos niveles de Kv1 marcados con I¹²⁵-αDTX en homogenizado de corteza de conejo solubilizado.

- 50 B. Anticuerpos anti-Kv1.1, 1.2 y 1.6 (1:500), que se unen a epítipos intracelulares, se unen a células transfectadas con Kv1.1, 1.2 o 1.6 permeabilizadas. Visualizados con anti-IgG de conejo (1:750; 568 nm). Se observa buena especificidad de anticuerpos anti-Kv1.

- 55 C. Células HEK cotransfectadas con los Kv1 y proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) (488 nm). Los sueros de EL (n = 15) y SMO (n = 6) (1:20) aplicados a células HEK que coexpresan Kv1.1-EGFP no se detectaron unidos a la superficie usando anti-IgG humana Alexa Fluor (568 nm). No se vio unión después de la cotransfección de combinaciones de subunidades de Kv1, incluyendo 1.1, 1.2, 1.4, 1.6 y β2. Sin embargo, un anticuerpo dirigido contra un epítipo extracelular de Kv1.1 (1:100) se unió a células transfectadas con Kv1.1.

Figura 2 - Las corrientes de Kv1 funcionales, sensibles a αDTX no están afectadas por la aplicación aguda de IgG de EL y SMO.

- 60 A. Células HEK-293 cotransfectadas con Kv1.1 expresan corrientes sensibles a αDTX.
B. De forma similar, células HEK-293 transfectadas con Kv1.6 expresan corrientes sensibles a αDTX de gran amplitud; estas corrientes eran de amplitud significativamente mayor que las corrientes mediadas por Kv1.1.
C y D. Las corrientes de Kv1.1 (C) y Kv1.6 (D) no están afectadas por la aplicación aguda de sueros control o de pacientes.

- 65 **Figura 3** - Las corrientes de Kv1 sensibles a αDTX no están afectadas por la aplicación crónica de IgG de EL y SMO.

A y B: Las corrientes mediadas por Kv1.1 (A) y Kv1.6 (B) sensibles a α DTX no se redujeron significativamente después de la incubación con sueros de pacientes 1 día ($p > 0,05$, ANOVA unifactorial).

C y D: Asimismo, no se observó reducción significativa en las corrientes mediadas por Kv1.1 (C) y Kv1.6 (D) después de una incubación de 3 días con sueros de pacientes ($p > 0,05$, ANOVA unifactorial).

Figura 4 - Sueros de pacientes y anti-Kv1 precipitan diferentes cantidades de Kv1 marcados con I^{125} - α DTX de extractos de corteza de conejo y los sueros de pacientes no precipitan Kv1 marcados con I^{125} - α DTX de extractos de célula transfectadas.

A. Anticuerpos comerciales anti-Kv1 múltiples, titulaciones de sueros de EL (n = 5) y SMO (n = 3) con 50.000 cpm de Kv1 marcados con I^{125} - α DTX de extracto de corteza de conejo en cada ensayo (n = 3 experimentos). Los valores de los controles sanos se han restado para generar datos específicos.

B. Número máximo de sitios de unión a I^{125} - α DTX precipitados por cada anti-suero de la figura 4A, pronosticado con hipérbolo de un sitio de unión (GraphPad Prism V5).

C. Kv1.1/1.2/1.4/1.6/ β 2 marcadas con I^{125} - α DTX extraídas de células transfectadas no precipitan por sueros de EL o SMO (5 ul) pero precipitan por anticuerpos anti-Kv1 (5 ul; n = 5 experimentos). La unión no específica, usando suero control sano o un anticuerpo anti-ratón irrelevante, se ha restado.

Figura 5 - El sitio de unión del suero de EL y SMO se disocia de los complejos de I^{125} - α DTX. Los anticuerpos contra CASPR2 coinmunoprecipitan I^{125} - α DTX de extracto cerebral y se disocian similarmente a los sueros de EL/SMO.

A. La unión de IgG de EL (n = 5) y SMO (n = 3) a complejos de corteza de conejo solubilizada con digitonina, marcada con I^{125} - α DTX muestra mayor sensibilidad a dodecilsulfato de sodio (SDS) que la unión de IgG anti-Kv1.1/1.2 (resultados de los 8 sueros combinados).

B. Un anticuerpo anti-CASPR2 precipita el 20% del los sitios de unión totales a I^{125} - α DTX de homogenizado de cerebro marcado, similar a lo encontrado con sueros de EL y SMO (figura 4a). Además, el anticuerpo anti-Lgl1 precipita > 60% de los sitios de unión totales a I^{125} - α DTX, y el anticuerpo anti-TAG1 precipita < 10% de los sitios de unión totales a I^{125} - α DTX. Por tanto, una alta proporción de los sitios de unión totales a I^{125} - α DTX están en complejo con Lgl1, y una pequeña proporción con TAG1.

C. En un experimento similar al mostrado en A, el patrón de disociación de los anticuerpos contra CASPR2 (media de 2 experimentos) y de los anticuerpos contra Lgl1 (media de 3 experimentos) son similares al de IgG de pacientes de EL (n = 5) comparado con la unión de IgG anti-Kv1.1/1.2.

Figura 6 - Algunos sueros de EL/SMO se unen directamente al dominio extracelular de CASPR2. La unión en solución es muy específica y estos títulos se correlacionan con títulos de inmunoprecipitación de I^{125} - α DTX.

A. Los sueros de EL y SMO (1:100) se unen al dominio extracelular de CASPR2 expresada (x1000 aumentos).

B. Se incubaron 100 Uf (unidades de fluorescencia) de extracto de CASPR2-EGFP con 5 ul de suero de paciente y se inmunoprecipitó. De los 188 sueros que se sabe inmunoprecipitan homogenizado de cerebro marcado con I^{125} - α DTX, 32 (18%) también precipitaron CASPR2-EGFP. Los sueros de pacientes con otras enfermedades neurológicas que no precipitan sitios de unión a I^{125} - α DTX, no eran positivos usando el ensayo de inmunoprecipitación fluorescente de CASPR2-GFP (FIPA). Estos incluían encefalopatías (EN), timomas, esclerosis múltiple (EM), enfermedad autonómica (AMS) y controles sanos (CS). Estos sueros no precipitaron o se unieron al dominio extracelular de MuSK-EGFP (figura 6a, panel inferior).

C. Los títulos de FIPA anti-CASPR2 se correlacionan linealmente con los títulos de inmunoprecipitación de homogenizado de cerebro con I^{125} - α DTX (correlación de Spearman $r^2 = 0,89$, $P < 0,0001$).

D. La inmuoadsorción de sueros positivos anti-CASPR2 contra el dominio extracelular de CASPR2 obvia la precipitación de extracto cerebral con I^{125} - α DTX*. Sin embargo, la absorción contra los dominios extracelulares de células HEK que expresan Kv1.1-1.2-1.6 no elimina la precipitación de extracto cerebral con I^{125} - α DTX.

Figura 7 - Los anticuerpos contra CASPR2 son de las subclases IgG1 e IgG4 y de alta afinidad. No se unen a CASPR2 linealizada en inmunotransferencias.

A. La unión de anti-IgG secundarios específicos de subclase a anticuerpos anti-CASPR2 ya unidos a células HEK que expresan CASPR2-GFP permite la cuantificación de cantidades relativas de subclases de anticuerpos anti-CASPR2.

B. Se calcularon análisis de Scatchard de afinidades de anticuerpos titulando el extracto de CASPR2-GFP contra un volumen no saturante de suero de paciente (n = 5). Se obtuvieron valores de K_d de $1,2 \times 10^{-8}$ M ($\pm$ desviación estándar $0,54 \times 10^{-8}$ M).

C. CASPR2 tiene un peso molecular de 180 kDa. El anticuerpo de ratón anti-CASPR2 detecta una banda de 180 kDa en extracto de CASPR2 ($\dagger$, rodeado por un círculo), no en extracto de Kv1.1/1.2/1.6 (*). Sueros positivos anti-CASPR2 demostrados no se unen a una banda consistente en extracto de CASPR2 ($\dagger$) en inmunotransferencias.

Figura 8 - Unión de IgG de suero a células HEK transfectadas con TAG1.

A. La unión de anticuerpo comercial a células transfectadas con TAG1 demostró que se expresaba en la superficie celular.

B. Ejemplo de la unión de IgG de suero de paciente de NMT a la superficie de células TAG1-HEK (positivas para EGFP). De los 108 sueros ensayados de pacientes con diagnóstico clínico confirmado solo 4 se unieron claramente a TAG1. Tres de estos eran de pacientes con neuromiotonía.

C. Los sueros control (n = 40) no se unieron.

Figura 9 - Unión de IgG de suero a células HEK transfectadas con Lgi1.

A. Dos ejemplos de unión de IgG de suero a células Lgi1-HEK. De los 108 sueros ensayados, 39 se unieron a las células transfectadas con Lgi1. Los sueros control (otras enfermedades, individuos sanos) no se unieron (n = 70).

B. Sin embargo, la unión no era exclusivamente a las células HEK cotransfectadas con EGFP lo que sugiere que (como se ha descrito previamente [24, 25]), Lgi1 se secreta al medio y algo de ella se une a la superficie tanto de las células HEK transfectadas (positivas para EGFP, verdes) como sin transfectar (negativas para EGFP, no verdes).

Figura 10 - Unión de IgG de suero con reactividad Lgi1 a células HEK sin transfectar.

A - Medio Lgi1, células HEK sin transfectar incubadas durante 1 hora con sobrenadante de células HEK transfectadas con Lgi1 se unieron a IgG de suero de paciente previamente identificada como que se une a Lgi1 (figura 9).

B - Medio MUSK, células HEK sin transfectar incubadas durante 1 hora con sobrenadante de células HEK transfectadas con MuSK no se unieron a las IgG de estos pacientes.

Figura 11 - Se muestran títulos de anticuerpos contra VGKC de ensayos clínicos rutinarios en pacientes con anticuerpos contra diferentes proteínas del complejo Kv1 de VGKC. Los sueros control precipitan < 100 pM (línea).

Figura 12 - Títulos de anticuerpo contra VGKC en pacientes divididos en diferentes fenotipos clínicos determinado por los cuestionarios enviados por neurólogos de referencia.

Figura 13 - es una tabla que muestra las características clínicas de las muestras de 108 pacientes estudiados.

Figura 14 - es una tabla que muestra las características clínicas de los pacientes clasificados por especificidad de anticuerpo. 36/39 pacientes con anticuerpos contra Lgi1 tienen encefalitis límbica, ninguno tiene neuromiotonía, y ninguno tiene neoplasias malignas tímicas. En contraste, 10/27 pacientes con anticuerpos contra CASPR2 tienen síndrome de Morvan, 8 tienen neuromiotonía y 10 tienen neoplasias malignas tímicas. Por tanto el reconocimiento de estos dos anticuerpos explica una gran parte de la heterogeneidad clínica asociada con anticuerpos contra "VGKC".

Resultados

Los sueros de EL/SMo inmunoprecipitan ¹²⁵I-αDTX-VGKC de extractos de corteza de conejo pero no inhiben las corrientes de los VGKC Kv1.1 y 1.6

Se identifican sueros de EL/SMo por su capacidad para inmunoprecipitar VGKC marcados con ¹²⁵I-αDTX de un extracto con digitonina de corteza cerebral de conejo o humana, como se ilustra para 8 sueros (5 de EL y 3 de SMo) usados en este estudio (figura 1a). Se determinaron los títulos de los anticuerpos a partir de estos gráficos y variaban entre 2006 y 6412 pM (intervalo normal < 100 pM). Para determinar si los anticuerpos se unían a VGKC individuales, se expresaron unidades Kv1.1, 1.2 y 1.6 individuales en células HEK. Primero se confirmó que había expresión de las subunidades apropiadas usando inmunocitoquímica indirecta con antisueros de conejo anti-Kv1. Puesto que estos anticuerpos de conejo se unen a epítopos intracelulares, se permeabilizaron las células. Los anticuerpos mostraron especificidad por su subtipo Kv1 apropiado (figura 1b). Además, las células expresaban algunas de las subunidades de Kv1 en su superficie como se muestra por la inmunotinción extracelular de Kv1.1 (figura 1c) y por medida de sitios de unión a ¹²⁵I-αDTX en las células sin permeabilizar. No obstante, de manera decepcionante, ninguno de los 21 sueros de EL/SMo que se probaron mostró similarmente unión detectable a superficie (figura 1c).

Era aún una posibilidad que los sueros tuvieran un efecto sobre la función o expresión de los Kv1. Las células HEK transfectadas demostraron corrientes dependientes de voltaje que se inhibían por αDTX (figura 2a, b). Se incubaron las células HEK que expresaban Kv1.1 o 1.6 en sueros (diluidos 1:50-1:1000) y se compararon las corrientes antes y después de la aplicación del suero (figura 2c, d). El suero sano no alteró las corrientes de Kv1 cuando se comparó con medio solo. Aunque había alguna variabilidad en las corrientes medias registradas, en conjunto no había efecto significativo de los sueros de pacientes sobre las corrientes cuando se compararon con incubaciones en sueros control sanos (ANOVA unifactorial; figura 2c, d).

Algunos anticuerpos no afectaron directamente la función de sus antígenos diana, pero causaron un aumento dependiente del tiempo y la temperatura en la internalización con una reducción en la expresión de superficie [12, 13]. Para ver si los anticuerpos de los pacientes reducían la expresión en la superficie celular a lo largo del tiempo, se incubaron las células durante 1 o 3 días a 37°C antes de ensayar las corrientes sensibles a αDTX [12]. Sin embargo, no hubo efecto sobre las corrientes sensibles a αDTX (figura 3a-d). Por tanto en conjunto, estos resultados confirmaban la presencia de Kv1 que se unen a αDTX funcionales en la superficie de células HEK pero no pudieron demostrar que los anticuerpos de los pacientes se unían a las células o afectaban la función o números de los canales.

Los sueros de EL/SMo no precipitan una subpoblación de ^{125}I - αDTX -VGKC de extracto cerebral y no precipitan ^{125}I - αDTX -VGKC de células HEK transfectadas con Kv

Para investigar más, se comparó la inmunoprecipitación de VGKV marcados con ^{125}I - αDTX extraídos de corteza de conejo por sueros de pacientes con esa por anticuerpos de conejo hacia Kv1.1, 1.2 y 1.6. Se piensa que todos los sitios de unión a ^{125}I - αDTX en cerebro de mamífero contienen Kv1.2 [14]. Anti-Kv1.2 inmunoprecipitó el 81% de los 50.000 sitios de unión máximos a ^{125}I - αDTX (figura 4a). No se logró precipitación adicional con la adición de anticuerpo contra Kv1.1 o Kv1.6 (datos complementarios, figura 1B). Por tanto, solo el 19% de ^{125}I - αDTX está sin unir a VGKC. En contraste, la precipitación por anti-Kv1.1, 1.6 y 1.4 alcanzó una meseta en el 51%, 17% y 7%, respectivamente (figura 4a). Estos datos son consistentes con trabajo previamente sin publicar usando anticuerpos contra Kv1 alternativos (datos complementarios 1c). Cuando se probaron los sueros individuales de EL/SMo en el mismo ensayo, sin embargo, consistentemente inmunoprecipitaban menos de las cuentas máximas de ^{125}I - αDTX incluso con exceso de suero (figura 4a). Aunque los valores de la meseta no eran idénticos para cada suero (figura 1a), el valor medio era el 32% (intervalo 23-43%) del máximo para todos los sueros de EL/SMo probados (figura 4b).

Estos datos sugieren que los sueros se podrían unir a subpoblaciones de canales marcados con αDTX . Para explorar más, se expresaron las subunidades Kv1.1, 1.2, 1.4, 1.6 y $\beta 2$, tanto individualmente como juntas en células HEK, y se extrajeron las células en digitonina al 2%, de una manera idéntica a la usada para la preparación de extracto de corteza de conejo. El extracto se marcó con ^{125}I - αDTX y se probó para inmunoprecipitación por los anti-Kv y los sueros de EL/SMo. Los resultados de los anticuerpos de conejo individuales fueron similares a los encontrados con el extracto de corteza de conejo pero no hubo precipitación por los sueros de EL/SMo (figura 4c). Por tanto estos resultados llevaron a concluir que los anticuerpos de EL/SMo no se unen directamente a las subunidades de Kv1 homoméricas o heteroméricas.

EL/SMo se une a una proteína en complejo con Kv1

Una explicación para estos descubrimientos era que los anticuerpos de EL/SMo se unen a una proteína que se asocia con los Kv1 en los extractos de corteza de conejo pero no presente en las células HEK transfectadas. Para probar esta hipótesis, se trataron los extractos de corteza de conejo marcados con ^{125}I - αDTX con concentraciones crecientes de dodecilsulfato de sodio (SDS) y se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos de conejo anti-Kv1 y los sueros de EL/SMo. Los resultados demostraron una disociación entre la unión de los anticuerpos de los pacientes y de los anticuerpos contra Kv1.1 y 1.2 a los complejos unidos a αDTX (figura 5a), siendo el primero mucho más sensible al tratamiento con SDS.

Hay varias proteínas que previamente se ha descrito que se asocian con los Kv1 o los sitios de unión a DTX en extractos de cerebro, incluyendo el gen inactivado de glioma rico en leucina 1 (Lgi1), proteína asociada a contactina 2 (CASPR2), glicoproteína axonal transitoria 1 (TAG1) y miembros de densidad postsináptica (PSD) [9, 10, 15]. Cuando se probaron los anticuerpos contra estas proteínas, anti-Lgi1 inmunoprecipitó el 61% de los sitios de unión a αDTX y TAG1 inmunoprecipitó aproximadamente el 5%. Sin embargo, los anticuerpos anti-CASPR2 demostraron reactividad muy similar a la de los sueros de EL/SMo tanto en la proporción de sitios de unión a αDTX precipitados del extracto de conejo (figura 5b) como en la sensibilidad a concentraciones crecientes de SDS (figura 5c). Estos descubrimientos indican que una proporción significativa de los VGKC marcados con αDTX en el extracto de corteza de conejo están asociados con CASPR2, y sugiere que los anticuerpos de EL/SMo pueden estar uniéndose directamente a CASPR2. De forma similar, la precipitación por anticuerpos contra Lgi1 demostró sensibilidad a SDS mayor que la de los anticuerpos específicos de Kv1 (figura 5c), lo que sugiere que esta proteína también es una diana potencial para los anticuerpos de EL/SMo.

Algunos anticuerpos de suero de EL/SMo se unen a CASPR2

Para preguntar directamente si los anticuerpos de EL/SMo se unían a CASPR2, se expresó CASPR2 humana de longitud completa en células HEK, después de etiquetar la proteína introduciendo EGFP en el extremo C intracelular. Muchos sueros de EL/SMo se unieron a la superficie de estas células y no a la superficie de células transfectadas con el vector solo (figura 6a). La ventaja de usar CASPR2 etiquetada con EGFP es que puede proporcionar un método rápido para medir los anticuerpos en suero cuantitativamente en solución (como en Waters et al., para anticuerpos contra acuaporina-4 [16]). Se probaron 188 sueros, que precipitan más que valores control de extracto de corteza de conejo marcado con ^{125}I - αDTX , para su capacidad para inmunoprecipitar EGFP-CASPR2 midiendo la fluorescencia verde en los precipitados (figura 6b). El suero de individuos sanos o esos con otras enfermedades neurológicas no precipitó fluorescencia apreciable, y se estableció un valor de 10 UF como un límite. En general el 18% de los sueros de EL/SMo eran positivos con valores que variaban entre 12 y 100 UF precipitadas por cada suero. Estos sueros se unían todos al dominio extracelular de CASPR2 (figura 6a). En la población de pacientes que eran positivos para este anticuerpo, había una correlación muy estrecha entre unión a VGKC en extractos de corteza de conejo y unión directa a CASPR2 (figura 6c). Para confirmar además la especificidad de los anticuerpos, se preabsorbieron los sueros con células HEK que expresaban CASPR2. Esto suprimió la inmunoprecipitación de CASPR2 de los extractos de CASPR2-EGFP, y también suprimió la inmunoprecipitación de ^{125}I - αDTX -VGKC del extracto de corteza de conejo (figura 6d).

Características de los anticuerpos anti-CASPR2

Muchos autoanticuerpos patogénicos son IgG de alta afinidad, que activan el complemento y dependientes de conformación. La inmunotinción de células HEK que expresan CASPR2-EGFP con anticuerpos secundarios específicos de isotipo permitió la determinación de la abundancia relativa de las subclases de las IgG de CASPR2 (figura 7a). La mayoría de los anticuerpos contra CASPR2 eran de las subclases IgG1 e IgG4 con poca IgG2 y casi ninguna IgG3. También se probaron cantidades limitantes de sueros de pacientes individuales para la unión a diferentes concentraciones de CASPR2-EGFP y se analizaron los resultados por gráficos de Scatchard. Se analizaron cinco pacientes que dieron una Kd media de $1,2 \pm 0,54 \times 10^{-8}$ M (DE; figura 7b). Usando inmunotransferencia, un anticuerpo anti-CASPR2 comercial identificó una banda fuerte a 180 kDa en los extractos de células transfectadas con CASPR2 pero los diez pacientes positivos para anticuerpos contra CASPR2 probados no se unieron a esta banda lo que sugiere que los anticuerpos contra CASPR2 se unen a epítomos de conformación que no están presente en extractos con CASPR2 desnaturalizada (figura 7 c).

Unos pocos sueros positivos para anticuerpos contra VGKC se unen a TAG1

Inicialmente no se probaron muchos sueros para unión a TAG1 porque los anticuerpos anti-TAG1 solo inmunoprecipitaron < 10% de los sitios de unión a 125 I- α DTX de extractos cerebrales (figura 5B). La figura 8A muestra que células HEK transfectadas con TAG1 tienen TAG1 en su superficie como se demuestra por la unión de un anti-TAG1 de conejo. La unión de IgG de dos sueros de pacientes se muestra en la figura 8B. Los sueros se unen a la superficie extracelular de células transfectadas (cotransfectadas con EGFP) con TAG1 sin permeabilizar. Se encontraron anticuerpos de unión a TAG1 en cuatro sueros de los 108 probados.

Una alta proporción de sueros de EL/SMo se une a Lgi1

Se encontró unión de IgG de suero a células transfectadas con Lgi1 en una alta proporción de sueros (véase posteriormente). Sin embargo, la unión no era solo a la superficie de células HEK cotransfectadas con EGFP (positivas para EGFP, figura 9A), sino también detectada alrededor de células que no estaban transfectadas (figura 9B). Parece posible que Lgi1 se secretara al medio y después se uniera a la superficie de todas las células HEK, ya que esto se ha descrito previamente [24, 25, como anteriormente].

Para ver si este era el caso, se cogió sobrenadante de células transfectadas con Lgi1 y se incubó con células HEK sin transfectar durante 1 hora a temperatura ambiente. Estas células no transfectadas se probaron después para Lgi1 unida buscando la unión de IgG de los sueros con reactividad a Lgi1 (es decir como en la figura 9A). El sobrenadante de células HEK transfectadas con Lgi1 (figura 10A), pero no de células que expresan otros antígenos, por ejemplo, MuSK (figura 10B), fue capaz de transferir Lgi1 a la superficie de las células HEK donde se unió por la IgG de suero de pacientes positivos para Lgi1. Esto confirma y extiende una observación previa de que Lgi1 se secreta y se puede adherir a la superficie celular de células PC12 en cultivo (por ejemplo, [24, 25]).

Correlaciones clínicas de anticuerpos contra CASPR2, TAG1 y Lgi1

Para establecer la relevancia clínica de estos descubrimientos, se probaron 108 sueros de pacientes con anticuerpos contra VGKC para la unión a células HEK que expresaban los tres antígenos. Estas muestras incluían 88 enviados para análisis rutinario con altos anticuerpos para VGKC (> 400 pM) que se esperaba que incluyeran principalmente pacientes con enfermedad del SNC (EL o Morvan), y 20 sueros adicionales (13 de pacientes con neuromiotonía y 7 de síndrome de Morvan). Estos se seleccionaron de nuestros archivos porque el síndrome de Morvan es raro, y porque los pacientes de neuromiotonía típicamente tienen bajos niveles de anticuerpos que se unen a 125 I- α DTX-VGKC y habrían estado subrepresentados en los pacientes de título alto.

Los títulos de anticuerpo contra VGKC asociados con los tres anticuerpos diferentes se muestran en la figura 11. Esto muestra que los títulos son los más altos en los pacientes positivos para Lgi1, moderados en pacientes positivos para CASPR2 y bajos en los pacientes positivos para TAG1, incluyendo un suero que era <100 pM por inmunoprecipitación de 125 I- α DTX-VGKC.

Se obtuvo información clínica de los neurólogos de referencia, principalmente de cuestionarios detallados (aprobación del Comité de Ética de Investigación de Oxford A, 07/Q160X/28). 65 de los pacientes tenían encefalitis límbica (seis de los cuales tenían epilepsia como una característica principal), 12 tenían síndrome de Morvan, 25 tenían neuromiotonía y solo seis tenían epilepsia, distonía o síndromes de sobresalto que no encajaban directamente en esas clasificaciones. Estos pacientes representan bien el espectro conocido de trastornos asociados con anticuerpos contra VGKC. La distribución de títulos de anticuerpos contra VGKC de los diferentes subgrupos de pacientes se muestra en la figura 12. Como se esperaba de datos previos sobre pacientes individuales, eran los más altos en encefalitis límbica, menores en síndrome de Morvan y los más bajos en neuromiotonía. El último grupo incluía ocho que eran negativos para anticuerpos contra VGKC en análisis rutinarios. La figura 13 muestra los síndromes clínicos, los números de pacientes en cada grupo, los números con evidencia de tumores no tímicos (estos eran variables, y solo dos eran clínicamente activos en el momento de la derivación de la

muestra) y los números con neoplasias malignas tímicas, que son el único tipo de tumor frecuentemente asociado con anticuerpos contra VGKC [5].

La figura 14 muestra los pacientes asociados con cada uno de los tres anticuerpos diferentes. Sorprendentemente, los anticuerpos contra Lgi1 se encontraban casi exclusivamente en pacientes con encefalitis límbica - solo tres de 39 sueros positivos para Lgi1 eran de pacientes con otros síndromes - y de forma importante no se encontraron en pacientes con neoplasias malignas tímicas. En contraste, los anticuerpos contra CASPR2 se encontraron en 10 a los 12 pacientes con síndrome de Morvan y en 10/11 de los pacientes con neoplasias malignas tímicas. Además, los anticuerpos contra CASPR2 también se encontraron en 8 de los 25 pacientes con neuromiotonía. Los anticuerpos contra TAG1 solo se encontraron en cuatro pacientes, pero tres de estos tenían neuromiotonía, uno de los cuales era negativo para anticuerpos contra VGKC; el otro paciente positivo para TAG1 tenía encefalitis límbica.

Discusión

Se describe CASPR2 como una novedosa diana de autoanticuerpo en pacientes que previamente se creía que tenían anticuerpos dirigidos contra canales de potasio de tipo Kv1 expresados en el sistema nervioso central. Además, se muestra que una alta proporción de otros pacientes tenían anticuerpos contra Lgi1 y unos pocos tenían anticuerpos contra TAG1 incluyendo un paciente que era negativo para anticuerpos contra VGKC. La presencia de estos anticuerpos se correlaciona con diferentes características clínicas de los pacientes y, por primera vez, estos resultados demuestran que los diferentes fenotipos clínicos es probable que dependan de la presencia de anticuerpos específicos que se dirigen a diferentes proteínas del complejo Kv1 de los VGKC en el sistema nervioso. Los anticuerpos que se definen aquí representan el 65% de las muestras positivas para anticuerpos contra VGKC. Mejoras adicionales en los ensayos de detección de anticuerpos pueden aumentar este porcentaje.

α DTX marca Kv1.1, 1.2 y 1.6, las subunidades de Kv1 más abundantes en cerebro de mamífero. Se ha asumido que la observación de que las IgG de EL y SMO inmunoprecipitan proteínas cerebrales marcadas con α DTX indica unión directa de las IgG de EL y SMO a proteínas de Kv1. La inmunohistoquímica de tejido cerebral ha apoyado esta hipótesis mostrando colocalización de Kv1.2, en particular, con sueros de pacientes [4], [3], [17]. Además, un estudio ha mostrado la unión de las IgG de EL y SMO a los Kv1 expresados en un línea celular de mamífero heteróloga [8]. Sin embargo, la 'preferencia' de los sueros de EL o SMO por un subtipo de Kv1 particular falla al explicar por qué pacientes con anticuerpos anti-Kv1 periféricamente generados, solo pueden mostrar un fenotipo en el sistema nervioso central.

Funcionalmente, la transferencia pasiva de IgG de pacientes con NMT crea cambios electrofisiológicos consistentes con hiperexcitabilidad neuronal secundaria a disfunción de canales de potasio [1]. De forma similar, pacientes con EL y SMO muestran características de hiperexcitabilidad neuronal tal como convulsiones, neuromiotonía y pérdida neuronal [2], [18] y pacientes con mutaciones en Kv1.1 y ratones deficientes en Kv1.1 desarrollan convulsiones [19], [20]. Estas evidencias han hecho las subunidades de Kv1 las dianas antigénicas más probables de las IgG de EL y SMO. Sin embargo, ningún enfoque a nivel molecular ha confirmado convincentemente esta hipótesis.

Si las IgG de EL o SMO se unieran a Kv1.1, se esperaría que precipitara la misma cantidad de 125 I- α DTX que un anticuerpo anti-Kv1.1. Aunque los datos para precipitaciones con anti-kv1.1, 1.2, 1.4 y 1.6 son muy similares a estudios previos [14, 21], las IgG de EL y SMO precipitan una subpoblación de los Kv1, no una cantidad similar a cualquier anticuerpo anti-Kv1 individual. Esto sugiere que se unen a ninguna de las proteínas de Kv1.

Kv1 tetrameriza para formar canales funcionales, sensibles a α DTX en la superficie de células HEK. Sin embargo, ni se pudo detectar supresión de corrientes ni unión a superficie determinada por inmunofluorescencia después de la exposición a las IgG de EL o SMO. Para excluir la posibilidad de que las IgG se unan al dominio intracelular de los Kv1, se solubilizaron las células en condiciones que se pretende que mimeticen el ensayo diagnóstico y extraer heterómeros de las subunidades de Kv1 similares a las presentes en nuestro tejido cerebral. Usando este paradigma, fuimos incapaces de demostrar que las IgG de EL o SMO precipitara Kv1 marcados con 125 I- α DTX. Por tanto, aunque la disfunción de Kv1 puede ser la correlación molecular de los fenotipos de EL y SMO, y las IgG de EL y SMO precipitan cuentas de homogenizado de cerebro de mamífero marcado con 125 I- α DTX, no lo hacen uniéndose directamente a las proteínas de Kv1. Por tanto, es probable que coprecipiten otra proteína en complejo con Kv1 en tejido cerebral, que no está presente en células HEK que expresan Kv1. Esta hipótesis se reforzó por las diferentes sensibilidades a SDS de los antígenos Kv1.1/1.2 y EL/SMO y específicamente proporcionó evidencia de que se unían a una proteína separada, más periférica en los complejos cerebrales unidos a 125 I- α DTX.

CASPR2 es una molécula que coprecipita con Kv1 con un dominio extracelular grande [9]. Además, el patrón de disociación de CASPR2 de los complejos de α DTX era similar al de los pacientes de EL y SMO. Un FIPA que usa CASPR2-EGFP solubilizada produjo valores positivos en 32 (18%) de los pacientes positivos en el ensayo diagnóstico. Los anticuerpos anti-CASPR2 estaban ausentes en pacientes con enfermedades del sistema nervioso central, disfunción autonómica o timomas, que fueron negativos en el ensayo diagnóstico en los sueros estudiados. Todas las IgG anti-CASPR2 unían un epítipo en el dominio extracelular de CASPR2. Estas IgG no reconocían CASPR2 linealizada en inmunotransferencias, lo que sugiere que se unen a un epítipo conformacional disponible en CASPR2 expresada en mamíferos. Los anticuerpos anti-CASPR2 eran predominantemente de las subclases IgG1 y

4. La subclase IgG1 sugiere un posible papel para la fijación del complemento en la patogénesis de enfermedades asociadas con anticuerpos anti-CASPR2. Estos anticuerpos eran de alta afinidad, similares a los encontrados en otras enfermedades neurológicas. La ausencia de anticuerpos detectables en el ensayo diagnóstico después de la inmunoadsorción de anticuerpos contra CASPR2 y la asociación lineal entre títulos de anti-CASPR2 y títulos del ensayo diagnóstico sugiere fuertemente que estos anti-CASPR2 son algunos de los anticuerpos previamente denominados como anticuerpos contra canales de potasio operados por voltaje.

La expresión únicamente neural de CASPR2 asegura que una patología mediada por anticuerpo solo se produce en la superficie de las neuronas. Esto es consistente con las características clínicas observadas en pacientes de EL y SMO. Los ratones deficientes en CASPR2 y TAG1 muestran una distribución difusa de Kv1 a lo largo de sus axones, en contraste con los Kv1 agrupados yuxtaparanodales vistos en neuronas de tipo salvaje [22]. De forma similar, tejido cerebral de seres humanos que tienen truncamientos C-terminales de CASPR2 mostraron expresión de Kv1 más difusa que la vista en cerebro control. Estos pacientes desarrollaron convulsiones, deterioro cognitivo y reflejos profundos ausentes [23]. Dada la distribución en el sistema nervioso central y periférico de CASPR2, este modelo genético es análogo a nuestros descubrimientos de la sobrerepresentación de SMO en pacientes positivos para anti-CASPR2.

Los anticuerpos anti-CASPR2 pueden producir dispersión similar de los Kv1 previamente agrupados, por tres mecanismos principales: i) fijación del complemento y daño tisular focal, ii) estimulación directa o bloqueo de su proteína diana, y iii) internalización del antígeno diana. Los más probable es que los anticuerpos anti-CASPR2 medien su acción a través de i) y iii). El número reducido de Kv1 puede crear una membrana relativamente despolarizada, hiperexcitable.

Consideraciones similares aplican a los anticuerpos dirigidos contra Lgi1 y TAG1. Lgi1 se expresa principalmente en el sistema nervioso central, y de particular interés en regiones que no expresan CASPR2, tal como la capa de fibras musgosas del hipocampo; esto puede explicar por qué los pacientes con estos anticuerpos predominantemente muestran encefalitis límbica que se asocia con alta señal de IRM del lóbulo temporal y epilepsia del lóbulo temporal [2]. Además, se encontraron mutaciones en el gen que codifica Lgi1 en familias con epilepsia del lóbulo temporal lateral [28] que muestran ninguna disfunción de nervios periféricos. En contraste TAG1 se expresa con Kv1.1 y Kv1.2 y CASPR2 en los nódulos de Ranvier donde podría proporcionar una diana para anticuerpos en pacientes con neuromiotonía y ratones deficientes en Tag1 demuestran dispersión de proteínas de Kv1 previamente agrupadas en los yuxtaparanódulos del SNC y SNP [22, 27]. En conjunto estos descubrimientos proporcionan un nuevo entendimiento principal de la heterogeneidad clínica asociada con anticuerpos anti-“VGKC” y proporcionará identificación y clasificación mucho más precisa de los pacientes en el futuro. Los ensayos basados en células que se usan aquí son con frecuencia más sensibles que los ensayos que dependen en la inmunoprecipitación del antígeno etiquetado de una solución (por ejemplo, [11, 16]). Por ejemplo, en una cohorte adicional de 14 pacientes con neuromiotonía, se encontraron anticuerpos contra CASPR2 y TAG1 en 5 que eran negativos para anticuerpos contra VGKC por el ensayo de inmunoprecipitación. Por tanto, la identificación de estas dianas, y el desarrollo de los ensayos, deben no solo explicar las diferencias fenotípicas sino mejorar el diagnóstico.

Métodos

Material clínico

Las muestras de suero se han almacenado a -20°C. Los médicos proporcionaron detalles clínicos para subclasificar pacientes. Los sueros de EL se clasificaron con esos con amnesia y convulsiones sin neuromiotonía. Los sueros de SMO tenían características del sistema nervioso central más características autonómicas y neuromiotonía. Los controles incluían pacientes con timomas (n = 9), enfermedad autonómica de inicio subagudo (n = 34), esclerosis múltiple (n = 14), encefalopatías que no precipitan ¹²⁵I-αDTX (n = 50) y controles sanos (n = 10). Se seleccionaron 88 sueros de los sueros con títulos de anticuerpos contra VGKC de moderados a altos (todos > 400 pM), independientemente de cualquier fenotipo clínico conocido. Para obtener información clínica detallada, se enviaron cuestionarios a los neurólogos de referencia y la información se recopiló en una base de datos (aprobación del Comité de Ética de Investigación de Oxford A, 07/Q160X/28). Esto permitió distinguir los tres fenotipos clínicos principales. Seis de los pacientes no encajaban bien en estas categorías: cuatro tenían epilepsia solo, uno tenía distonía con sobresalto excesivo, y uno tenía sobresaltos excesivos solo. Se añadieron 20 sueros adicionales de pacientes con síndrome de Morvan (n = 7) o neuromiotonía (n = 13) conocidos para aumentar el número de estos pacientes para la confirmación de los descubrimientos y los análisis estadísticos.

Radioinmunoprecipitación de VGKC extraídos de corteza de conejo

Se extrajeron complejos VGKC de membranas corticales de conejo solubilizadas usando digitonina al 2% (Calbiochem, EE UU) en tampón DTX (NaCl 100 mM, Tris 20 mM, KCl 5 mM ajustado a pH 7,12) a 37°C durante 20 minutos. Los sobrenadantes se diluyeron 1:2 con PTX (tampón fosfato 0,02 M y Triton X100 al 0,1%) y se incubaron con ¹²⁵I-αDTX (Perkin Elmer, EE UU). Este extracto se diluyó con PTX hasta 1 millón de cuentas por minuto (cpm) por ml. Para experimentos de disociación, se añadió dodecilsulfato de sodio (SDS) al extracto marcado con ¹²⁵I-αDTX durante 2 horas a temperatura ambiente. Se incubaron 50 ul de extracto marcado con ¹²⁵I-αDTX con suero o

anticuerpos comerciales (llevados hasta 50 µl con PTX) durante la noche a 4°C. Se añadieron anticuerpos secundarios (anti-IgG humana (The Binding Site, RU) o anti-IgG de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, EE UU)) a 10 µl/1 µl de suero durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los precipitados se centrifugaron en 0,5 ml de PTX y los precipitados resultantes se lavaron dos veces en PTX y se leyeron en un contador gamma (Cobra2, Perkin Elmer). Cuando se expresan como cpm específicas, los resultados tienen restados los datos del control sano.

Construcciones de plásmidos

Se clonaron los ADNc que codifican Kv1.1, 1.2, 1.4, 1.6 y β2 humanas de longitud completa en pcDNA3.1-hygro (Invitrogen Ltd, CA, EE UU). La construcción MuSK humana de longitud completa-GFP se ha descrito previamente [2]. El vector pCR4-TOPO que contenía el ADNc para CASPR2 (IMAGE: 7939625 de geneservice Cambridge, Inglaterra) se digirió con EcoRI. El fragmento se subclonó en pcDN3.1 (+) (Invitrogen, RU) para dar CASPR2 sin etiqueta que se expresó en células de mamíferos. Para etiquetar CASPR2 con EGFP, el plásmido pcDN3.1 (+)-CASPR2 se digirió con XhoI y XmaI. El fragmento se subclonó en pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, CA, EE UU).

Para Lgi1 humana, el ADNc se compró se Geneservice Ltd., y se amplificó por PCR con los siguientes cebadores;

FPilgipcdna: GATCGCTAGCCCACCATGGAATCAGAAAGAAGCAAAAGG NheI
RPlgipcdna: GATCCTCGAGTCATGCGCTTAAGTCAACTATGACATG XhoI

El producto purificado se subclonó en pGEM-Teasy. Este clon y el plásmido pcDNA3.1(+) de Clontech se digirieron con NheI y XhoI. Los fragmentos se ligaron; la construcción se purificó y verificó por secuenciación.

FPilgipcdna: GATCGCTAGCCCACCATGGAATCAGAAAGAAGCAAAAGG NheI
RPlgipcdna: GATCCTCGAGTCATGCGCTTAAGTCAACTATGACATG XhoI

El ADNc de TAG1 humana se obtuvo como un regalo del Dr. D Karagogeos (Universidad de Creta; véase [27]).

Transfección y cultivo de células de riñón embrionario humano

Las células HEK293 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal del ternero (SFT, TCS Cellworks Ltd, Buckingham, RU) al 10% y 100 unidades/ml de cada una de penicilina G y estreptomycin (Invitrogen, CA, EE UU) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se hicieron crecer en placas de cultivo de 6 pocillos para experimentos de inmunoabsorción y unión de toxina, en cubreobjetos de vidrio de 13 mm colocados en placas de cultivo de 6 pocillos para microscopía y en botellas de 175 cm² para extracción de proteínas. Usando polietilenoimina (PEI), las células se contranfectaron transitoriamente con ADNc de Kv1.1, 1.2, 1.4, 1.6, β2, EGFP (proteína fluorescente verde mejorada), MuSK-EGFP, CASPR2-EGFP, Lgi1 o TAG1. La expresión de EGFP se visualizó usando un microscopio fluorescente Axion 200 invertido de Zeiss.

Inmunocitoquímica

Se realizó la tinción inmunofluorescente de las células HEK 48 horas después de la transfección. Los cubreobjetos se transfirieron a placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron con anticuerpo de ratón anti-dominio extracelular de Kv1.1 (1:100, un regalo del Dr. J Trimmer, California) o sueros de pacientes (1:20-100) diluidos en DMEM-ácido N-(2-hidroxietil)piperacina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES) con soroalbúmina bovina (BSA) al 1% a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora. Las células se lavaron posteriormente 3 veces en tapón DMEM-HEPES y se fijaron con formaldehído al 3% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron como antes y se marcaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con: (i) anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 568 anti-IgG de ratón o anti-IgG humana (Invitrogen-Molecular probes, Paisley, RU) a 1:750 en tampón BSA al 1%-DMEM-HEPES o (ii) anti-IgG1, 2, 3 o 4 humana de ratón (Binding Site, Birmingham, RU) a 1:50 en tampón BSA al 1%-DMEM-HEPES y posteriormente anticuerpo de cabra conjugado a Alexa Fluor 568 anti-IgG específico de isotipo de ratón (Invitrogen-Molecular probes, Paisley, RU). Para la permeabilización celular, las célula se incubaron inicialmente con fijador (como anteriormente) y posteriormente todas las soluciones contenían TritonX100 al 0,1%.

Los anticuerpos de conejo anti-Kv1.1/1.2 y 1.6 (1:500, Alamone, Israel) se visualizaron con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 568 anti-IgG de conejo (Invitrogen-Molecular Probes, Paisley, RU). Las células se lavaron posteriormente 3 veces en PBS y se montaron en cubreobjetos en medio de montaje fluorescente (DakoCytomation, Cambridge, RU) con DAPI (dicloruro de 4',6'-diamidino-2-fenilindol, 1:1000). Se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia con un sistema de imagenología digital Macprobe v4.3. Para el análisis de subclases, todas las preparaciones se examinaron por 3 observadores con enmascaramiento usando un sistema de puntuación de 0 a 4 como se validado previamente [11]. Para TAG1 y Lgi1 se usó anti TAG1 de ratón (IgG1) comprado del banco de hidridoma de estudios de desarrollo para fines académicos ('3.1C12' de <http://dshb.biology.uiowa.edu/>), y anti Lgi1 de cabra, C19 (sc-9583) y N18 (sc-9581) comprados de Santa Cruz Biotechnology Inc.

Electrofisiología

Se transfectaron células HEK-293 con Kv1.1 y GFP o Kv1.6 y GFP (como anteriormente) y se plaquearon directamente en cubreobjetos de vidrio para registros de pinzamiento zonal de célula entera. Los registros del pinzamiento de voltaje de las células se hicieron en un baño estacionario (volumen de 1 ml) de tampón externo que contenía (en mM): NaCl 145, KCl 6, MgCl₂ 1, HEPES 10, CaCl₂ 2, y glucosa 5; pH 7,4 con NaOH. Se prepararon pipetas de registro de ~2,5 MΩ de vidrio capilar de borosilicato (Harvard Apparatus), y se cargaron con solución intracelular estándar que contenía (en mM): KCl 150, EGTA 10, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, y HEPES 10; pH 7,4 con KOH. Las células se visualizaron usando un microscopio fluorescente invertido (Nikon) y solo se registraron células que expresaban GFP. Los registros se hicieron a temperatura ambiente (20-24°C). Experimentos preliminares, usando solución intracelular basada en CsCl, confirmaron que las corrientes mostradas están mediadas por potasio (datos no mostrados).

Se demostraron corrientes sensibles a α-DTX por aplicación en baño directa de α-DTX (1 μM, Sigma-Aldrich) durante los registros; se usó un volumen equivalente de solución tampón en experimentos control. Las muestras de suero se dializaron contra la solución de registro externa antes del uso y las muestras que se van a aplicar crónicamente se diluyeron en medio de cultivo (1:50-1:1000). Los efectos agudos del suero sobre las corrientes expresadas se determinaron por aplicación directa del suero durante el registro, análogo a la adición de α-DTX. Los efectos crónicos de los sueros de pacientes se determinaron por incubación de 1-3 días con células HEK-293 transfectadas con Kv1 a 37°C antes del registro.

Los datos se filtraron a paso bajo a 1 kHz y se adquirieron a 10 kHz. Los registros se hicieron usando un amplificador Axopatch-1D, un digitalizador de la serie Digidata 1320 y el paquete de programas pClamp para la generación de pulso, adquisición de datos y análisis de datos (Axon Instruments). Las células incluidas en el análisis tenían resistencias de acceso bajas (R_a, <20 MΩ) con menos del 30% de cambio durante el registro; resistencia de entrada altas (R_i, > 1 GΩ a -70 mV (paso de +10 mV); estabilidad basal y corriente de fuga pequeña (< -50 pA). Las medidas de la corriente pico se hicieron aplicando un pulso de prueba de 300 ms a +40 mV de un potencial de fijación de -80 mV. También se analizaron la dependencia del voltaje de la activación e inactivación del estado estacionario (datos no mostrados). Se evaluaron las significaciones estadísticas usando pruebas bilaterales de la t de Student para comparaciones individuales y ANOVA unifactoriales para comparaciones múltiples.

Extracción y marcaje de proteínas

48 horas después de la transfección, se lavaron botellas de 175 cm² confluentes con PBS y se lisaron con digitonina al 2% en tampón DTX, con mezcla de inhibidores de proteasa 1:100 (Sigma-Aldrich, RU). Los lisados se rotaron durante 1 hora, se centrifugaron (13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C) y se marcaron con I¹²⁵-αDTX como anteriormente. Se sometieron tanto estos extractos como los marcados con GFP (100 Uf/ensayo) a inmunoprecipitación con 5 ul de sueros humanos o un anticuerpo de conejo anti-CASPR2 (regalo del Dr. E Peles). Los precipitados se resuspendieron en 180 ul de PTX, se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se analizaron usando un lector de placas de fluorescencia (Gemini XS, Molecular Probes). Este último ensayo se conoce como un ensayo de inmunoprecipitación fluorescente (FIPA).

Inmunotransferencia

Se hirvieron extractos de células transfectadas con tampón de carga basado en SDS y agente reductor (Invitrogen, CA, EE UU). Se cargaron geles de SDS poli(acrilamida) del 4-12% (Invitrogen, RU) con 15 ul de extracto por pocillo (igualado para concentraciones de proteína) y se corrieron durante 90 minutos a 200 mV. Los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa durante 90 minutos a 30 mV. Se bloquearon tiras individuales con una solución de proteína de leche al 5% en PBS-Tween al 0,1%. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (1:100), PBS-Tween al 0,1% durante 3 lavados y 30 minutos en anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o anti-IgG humana conjugados a HRP (DakoCytomation, RU (diluidos en solución de bloqueo (1:200). Las membranas se desarrollaron con diaminobencidina (DAB).

Referencias

- [1] Sinha S, Newsom-Davis J, Mills K, Byrne N, Lang B, Vincent A. Autoimmune aetiology for acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). *Lancet*. 13 Jul 1991;338(8759):75-7.
- [2] Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, Clover L, Parkinson A, Bien CG, Omer S, Lang B, Rossor MN, Palace J. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain*. Mar 2004;127(Pt 3):701-12
- [3] Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M, et al. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol*. Jul 2001;50(1):73-8.
- [4] Liguori R, Vincent A, Clover L, Avoni P, Plazzi G, Cortelli P, et al. Morvan's syndrome: peripheral and central nervous system and cardiac involvement with antibodies to voltage-gated potassium channels. *Brain*. Dic 2001;124(Pt 12):2417-26.

- [5] Hart IK, Waters C, Vincent A, Newland C, Beeson D, Pongs O, et al.. Autoantibodies detected to expressed K + channels are implicated in neuromyotonia. *Annals of neurology*. Feb 1997;41(2):238-46.
- [6] Shillito P, Molenaar PC, Vincent A, Leys K, Zheng W, van den Berg RJ, et al. Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K + channels of peripheral nerves. *Annals of neurology*. Nov 1995;38(5):714-22.
- [7] Tomimitsu H, Arimura K, Nagado T, Watanabe O, Otsuka R, Kurono A, et al. Mechanism of action of voltage-gated K + channel antibodies in acquired neuromyotonia. *Annals of neurology*. Sep 2004;56(3):440-4.
- [8] Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K+ channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain*. Jun 2006;129 (Pt 6): 1570-84.
- [9] Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, et al. Caspr2, a new member of the neuexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K+ channels. *Neuron*. Dic 1999; 24 (4):1037-47.
- [10] Schulte, U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniössek M, et al. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron*. 2 Mar 2006;49(5):697-706.
- [11] Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*. 31 Mayo 2008.
- [12] Nagado T, Arimura K, Sonoda Y, Kurono A, Horikiri Y, Kameyama A, et al. Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. *Brain*. Nov 1999;122 (Pt 11):2057-66.
- [13] Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Roemer SF, Fryer JP, Kryzer TJ, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology*. 11 Dic 2007;69(24):2221-31.
- [14] Shamotienko OG, Parcej DN, Dolly JO. Subunit combinations defined for K+ channel Kv1 subtypes in synaptic membranes from bovine brain. *Biochemistry*. 8 Jul 1997;36(27):8195-201.
- [15] Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M. Clustering of Shaker-type K + channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature*. 2 Nov 1995;378(6552):85-8.
- [16] Waters P, Jarius S, Littleton E, Leite MI, Jacob S, Gray B, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Archives of Neurology*. Jul 2008;65(7):913-9.
- [17] Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain*. Agosto 2005;128(Pt 8):1764- 77.
- [18] Schott JM, Harkness K, Barnes J, della Rocchetta AI, Vincent A, Rossor MN. Amnesia, cerebral atrophy, and autoimmunity. *Lancet*. 12 Abril 2003;361(9365):1266.
- [19] Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, De Silva R, Tolmie J, Wood NW, et al. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. *Brain*. Mayo 1999;122 (Pt 5):817-25.
- [20] Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, et al. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron*. Abril 1998;20(4):809-19.
- [21] Scott VE, Muniz ZM, Sewing S, Lichtinghagen R, Parcej DN, Pongs O, et al. Antibodies specific for distinct Kv subunits unveil a heterooligomeric basis for subtypes of alpha-dendrotoxin-sensitive K + channels in bovine brain. *Biochemistry*. 22 Feb 1994;33(7):1617-23.
- [22] Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, et al. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K + channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *The Journal of cell biology*. 15 Sep 2003;162(6):1149-60.
- [23] Strauss KA, Puffenberger EG, Huentehnan MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *The New England journal of medicine*. 30 Mar 2006; 354(13):1370-7.
- [24] Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, Herranz-Pérez V, Favell K, Barker PA, Pérez-Tur J. The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Hum Mol Genet*. 1 Dic 2006; 15(23):3436-45. Epub 26 Oct 2006.
- [25] Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science*. 22 Sep 2006;313(5794):1792-5.
- [26] Pavlou O, Theodorakis K, Falk J, Kutsche M, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Karagogeos D Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol Cell Neurosci*. Jul 2002; 20(3):367-81.
- [27] Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol*. 15 Sep 2003;162(6):1161-72.
- [28] Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, Choi C, Morozov P, Das K, Teplitskaya E, Yu A, Cayanis E, Penchaszadeh G, Kottmann AH, Pedley TA, Hauser WA, Ottman R, Gilliam TC. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet*. Mar 2002;30(3):335-41.

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnosticar en un mamífero un trastorno neurológico autoinmunitario seleccionado del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan, y neuromiotonía que comprende detectar, en una muestra de fluido corporal del mamífero, autoanticuerpos hacia un epítipo de al menos una proteína del complejo Kv1, en donde la proteína del complejo Kv1 comprende al menos una de CASPR2 (proteína asociada a contactina 2), Lgi1 (gen inactivado de glioma rico en leucina 1) y TAG1 (glicoproteína axonal transitoria 1); en donde el método comprende los pasos de a) poner en contacto el fluido corporal con la al menos una proteína del complejo Kv1; y b) detectar cualquier complejo autoanticuerpo-antígeno formado entre la al menos una proteína del complejo Kv1 y autoanticuerpos presentes en el fluido corporal, en donde la presencia de dicho complejo es indicativa de un trastorno neurológico autoinmunitario seleccionado del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan y neuromiotonía.
2. Uso de un kit de ensayo para diagnosticar un trastorno neurológico autoinmunitario seleccionado del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan y neuromiotonía en un mamífero según el método de la reivindicación 1, en donde el kit comprende al menos un epítipo de al menos una proteína del complejo Kv1, en donde la proteína del complejo Kv1 comprende al menos una de CASPR2, Lgi1 y TAG1 e instrucciones para usar el kit.
3. Un método de identificar compuestos capaces de tratar un trastorno neurológico seleccionado del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan, y neuromiotonía que comprende los pasos de poner en contacto un compuesto candidato en presencia de al menos una proteína del complejo Kv1 o un epítipo de la misma y un anticuerpo capaz de unirse a al menos una proteína del complejo Kv1, en donde al menos una de las proteínas del complejo Kv1 o un epítipo de la misma comprende al menos una de CASPR2, Lgi1 y TAG1, o un epítipo de las mismas, en donde un compuesto que previene la unión de dicho anticuerpo a al menos una proteína del complejo Kv1 o un epítipo de la misma es un candidato para tratar trastornos neurológicos autoinmunitarios, en donde el trastorno neurológico autoinmunitario se selecciona del grupo que comprende encefalitis límbica, síndrome de Morvan, y neuromiotonía.
4. El método o uso de un kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el fluido corporal se selecciona del grupo que comprende plasma, suero, sangre completa, orina, sudor, linfa, heces, líquido cefalorraquídeo y aspirado de pezón.
5. El método o uso de un kit de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el mamífero es un ser humano.

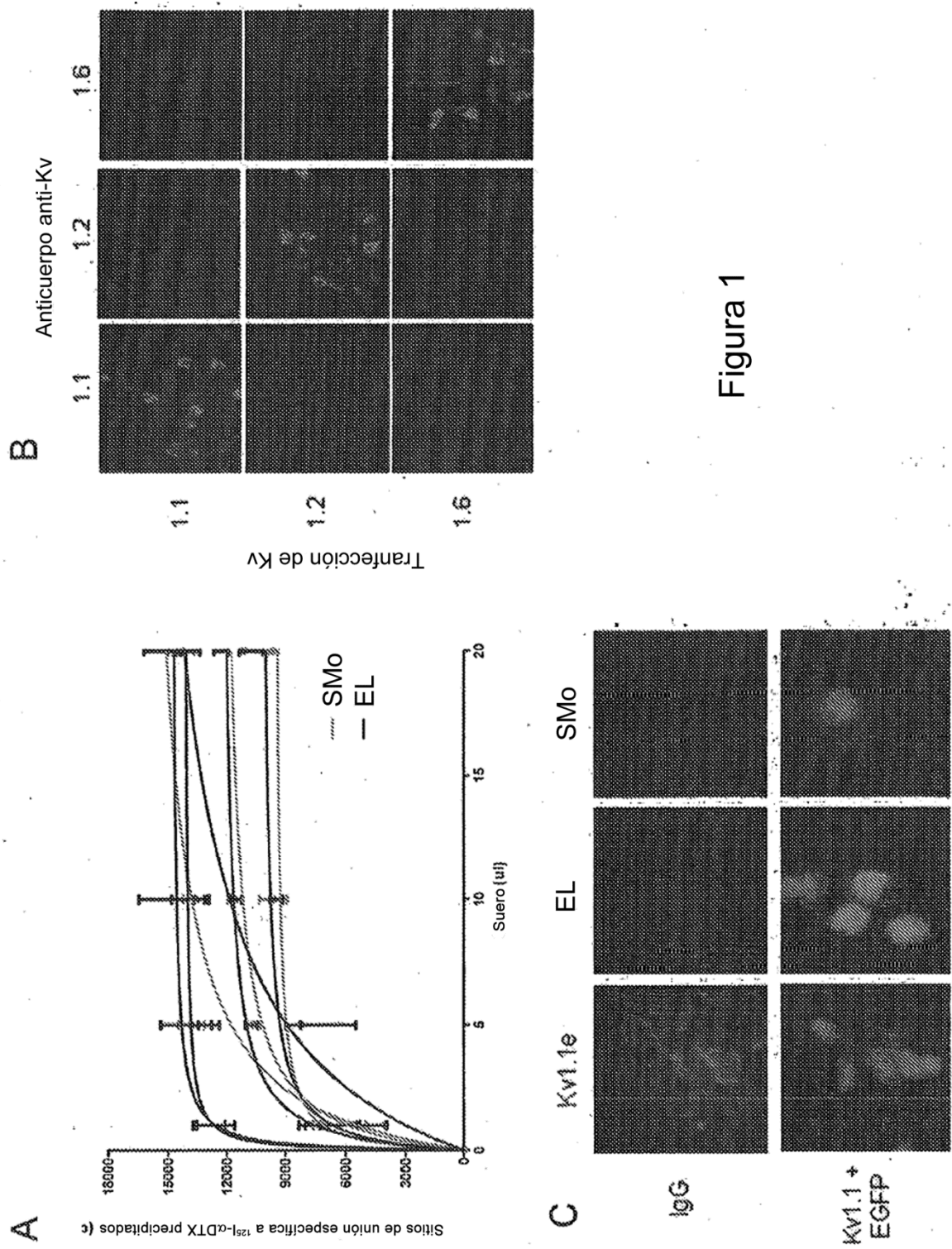


Figura 1

Figura 2

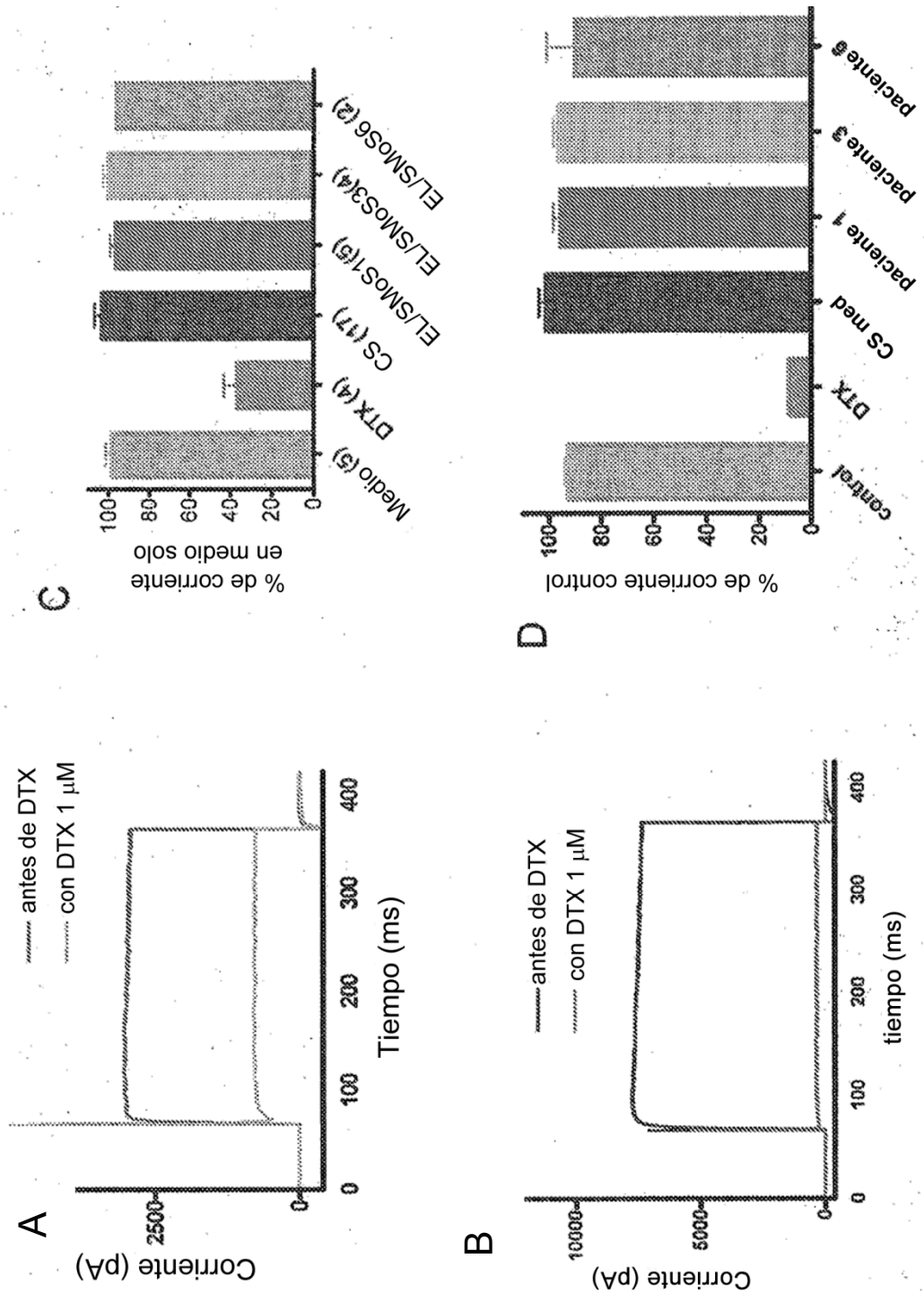


Figura 3

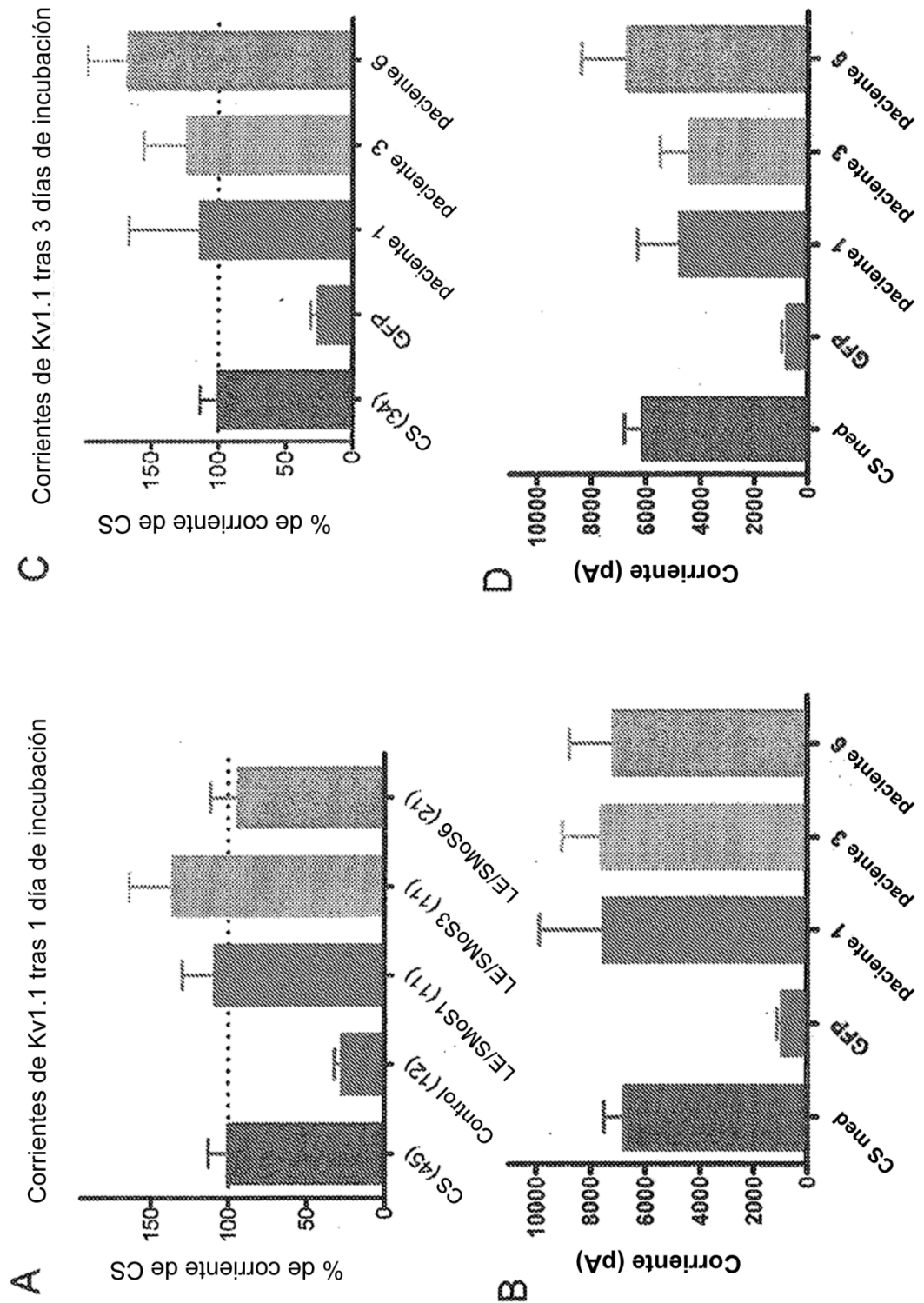
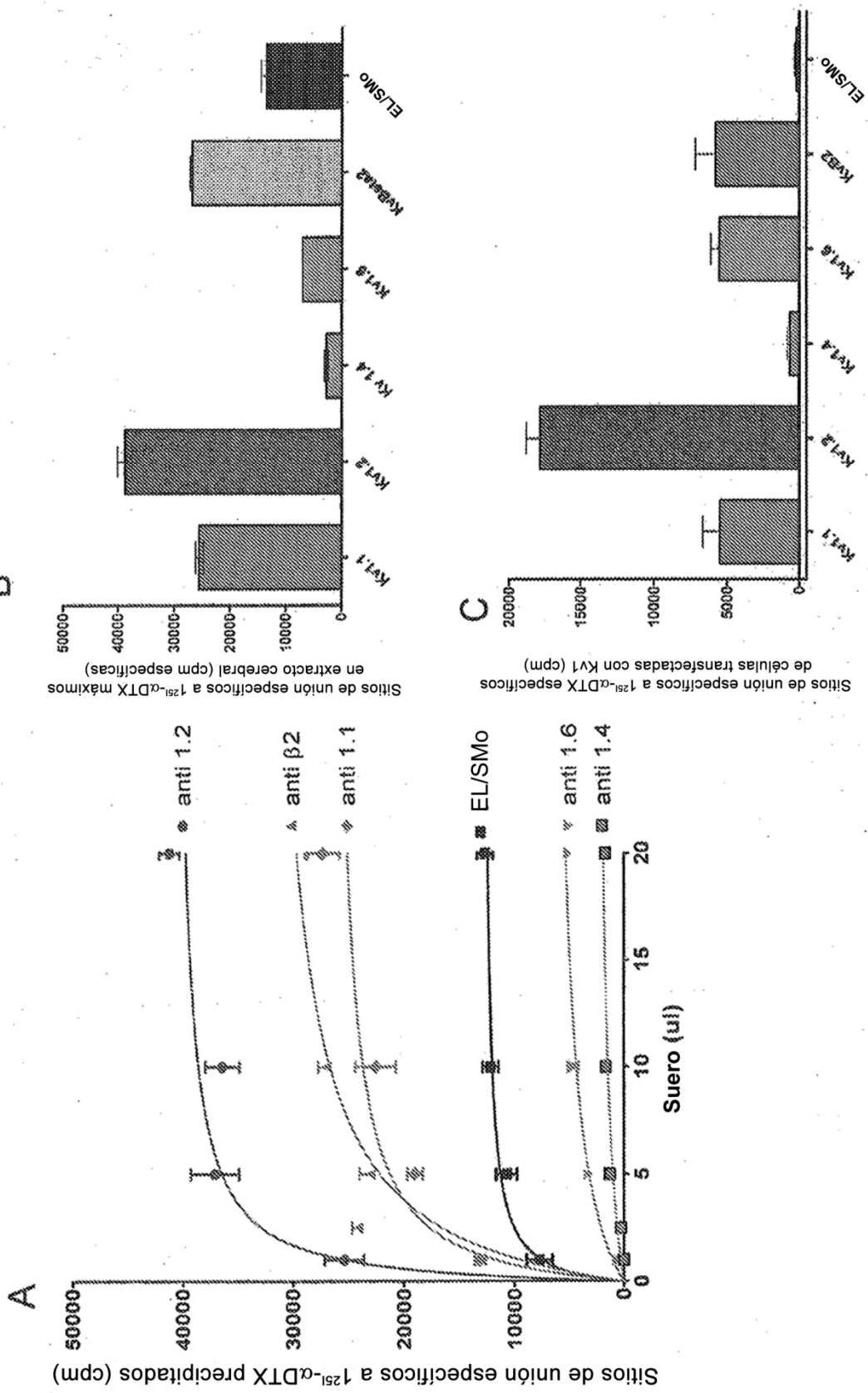


Figura 4



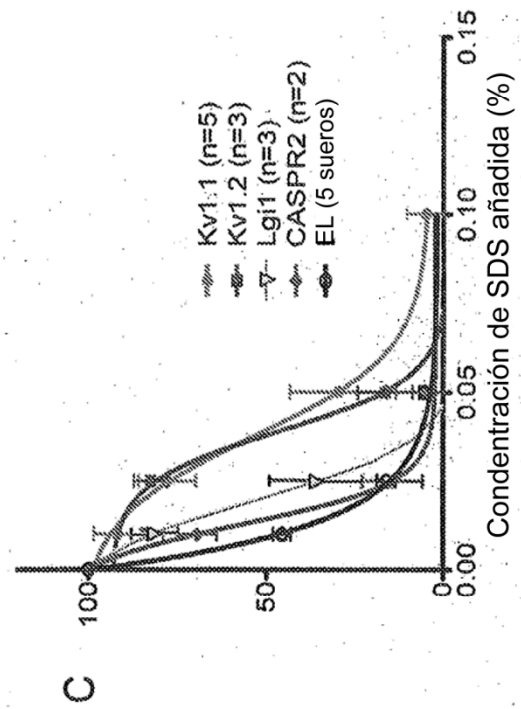
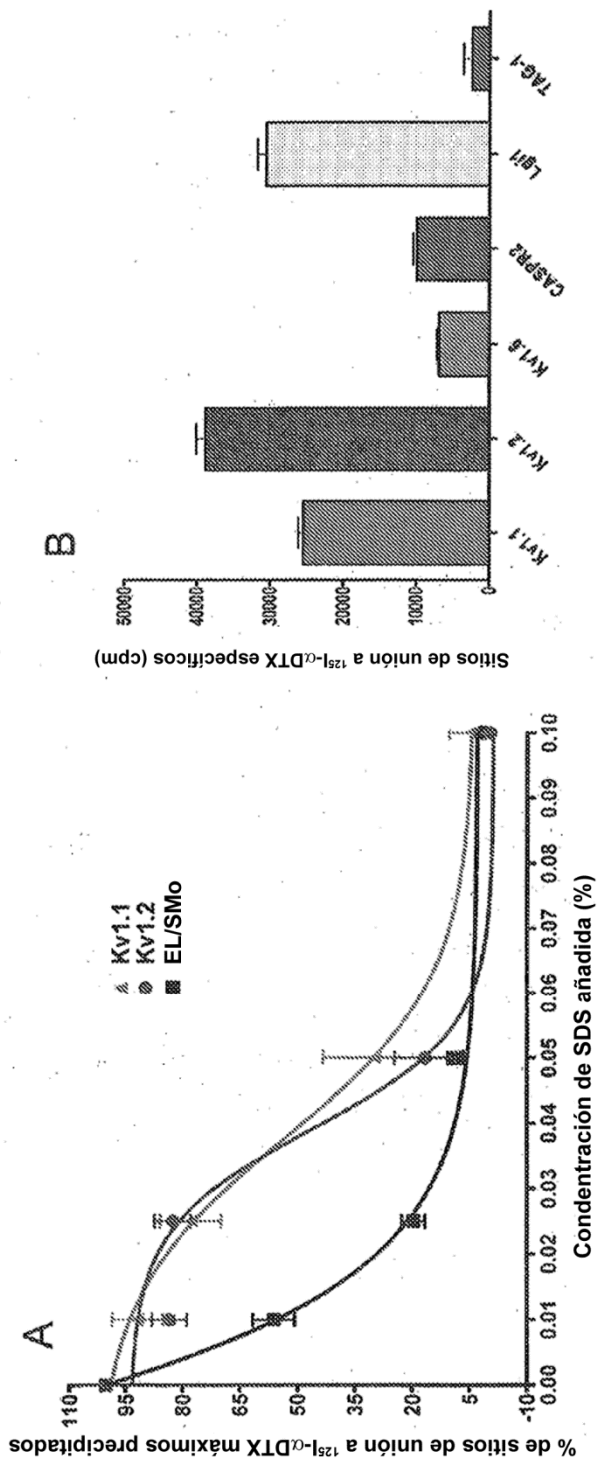


Figura 5

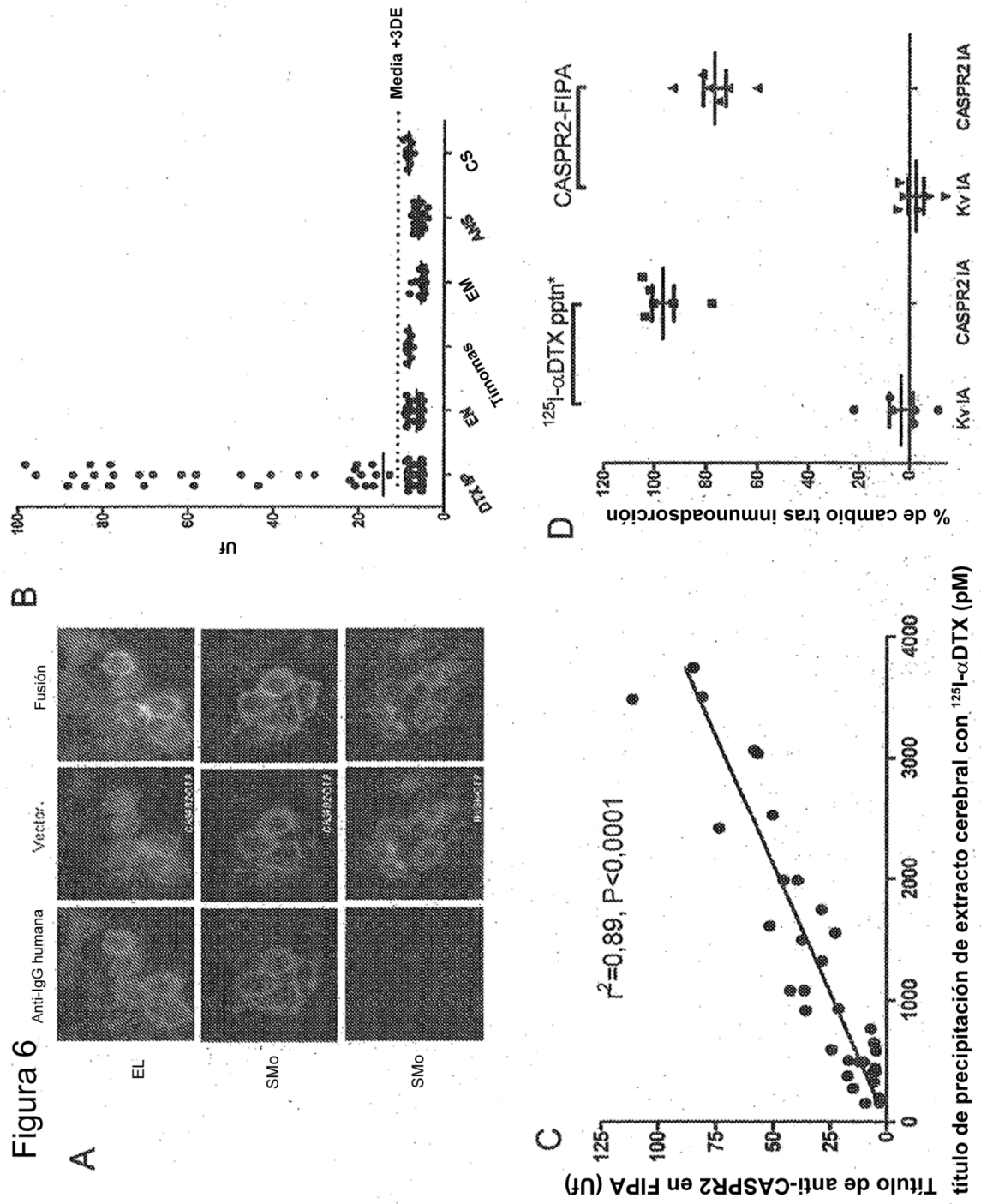




Figura 8

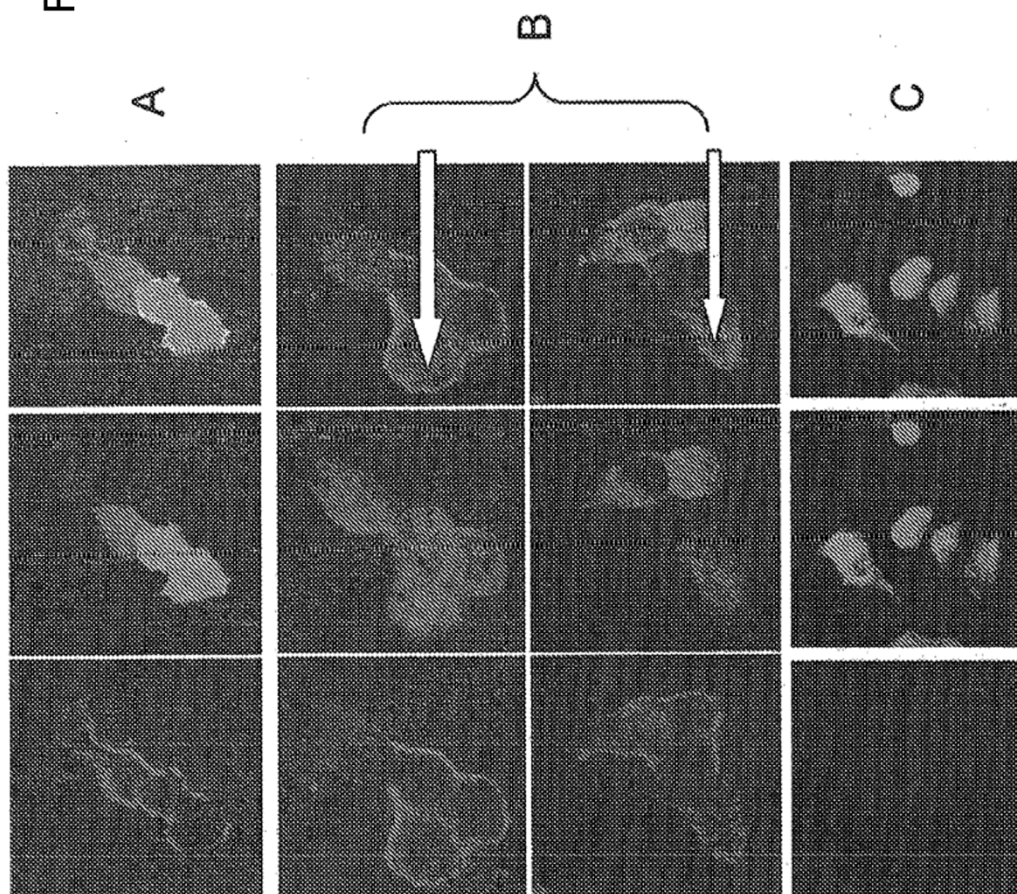


Figura 9

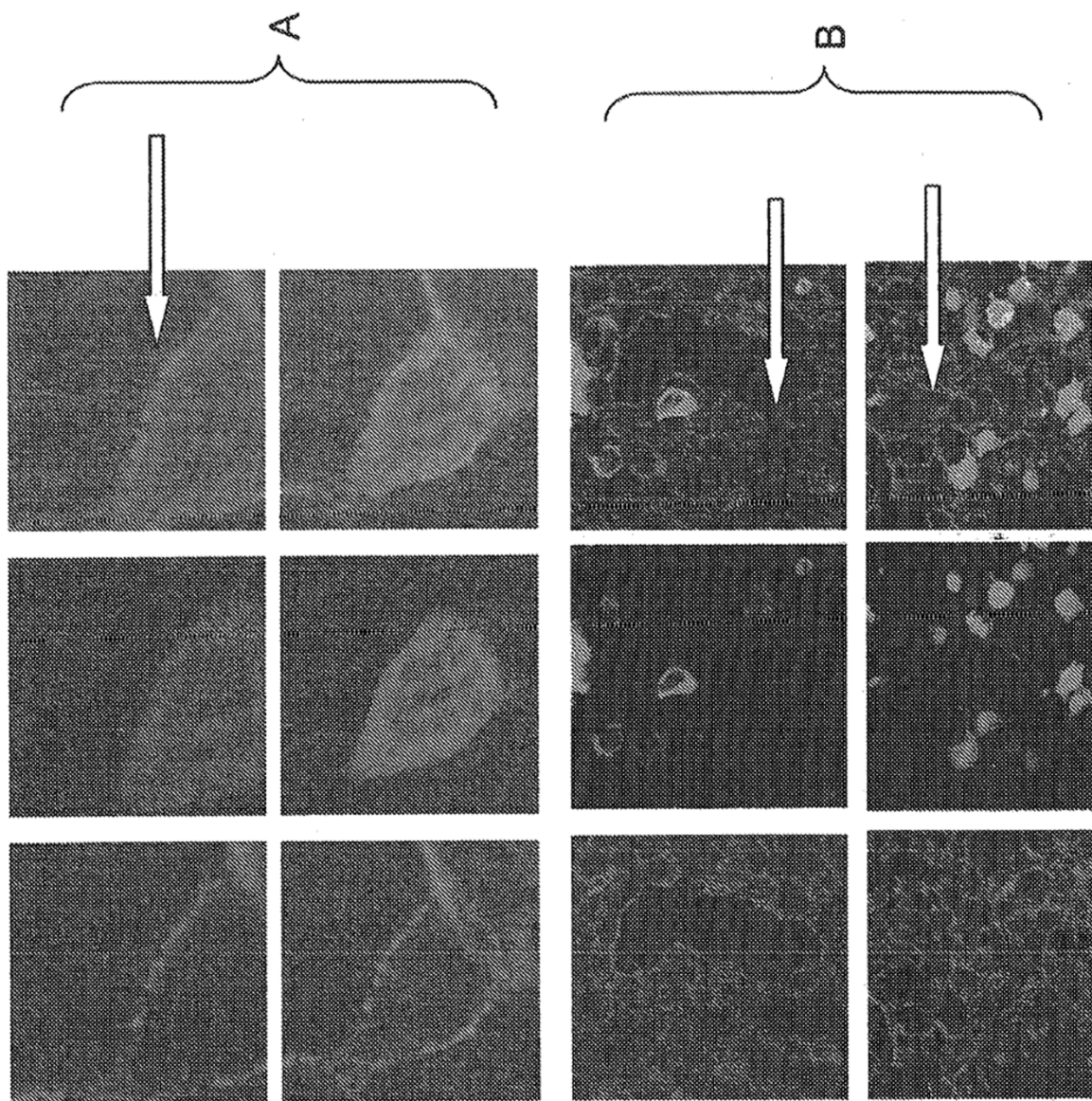


Figura 10

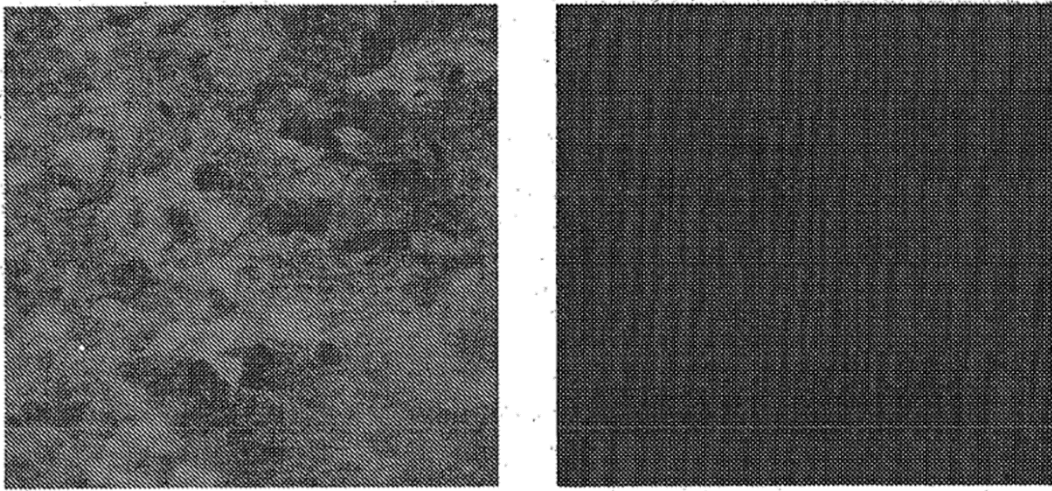


Figura 11



Figura 12

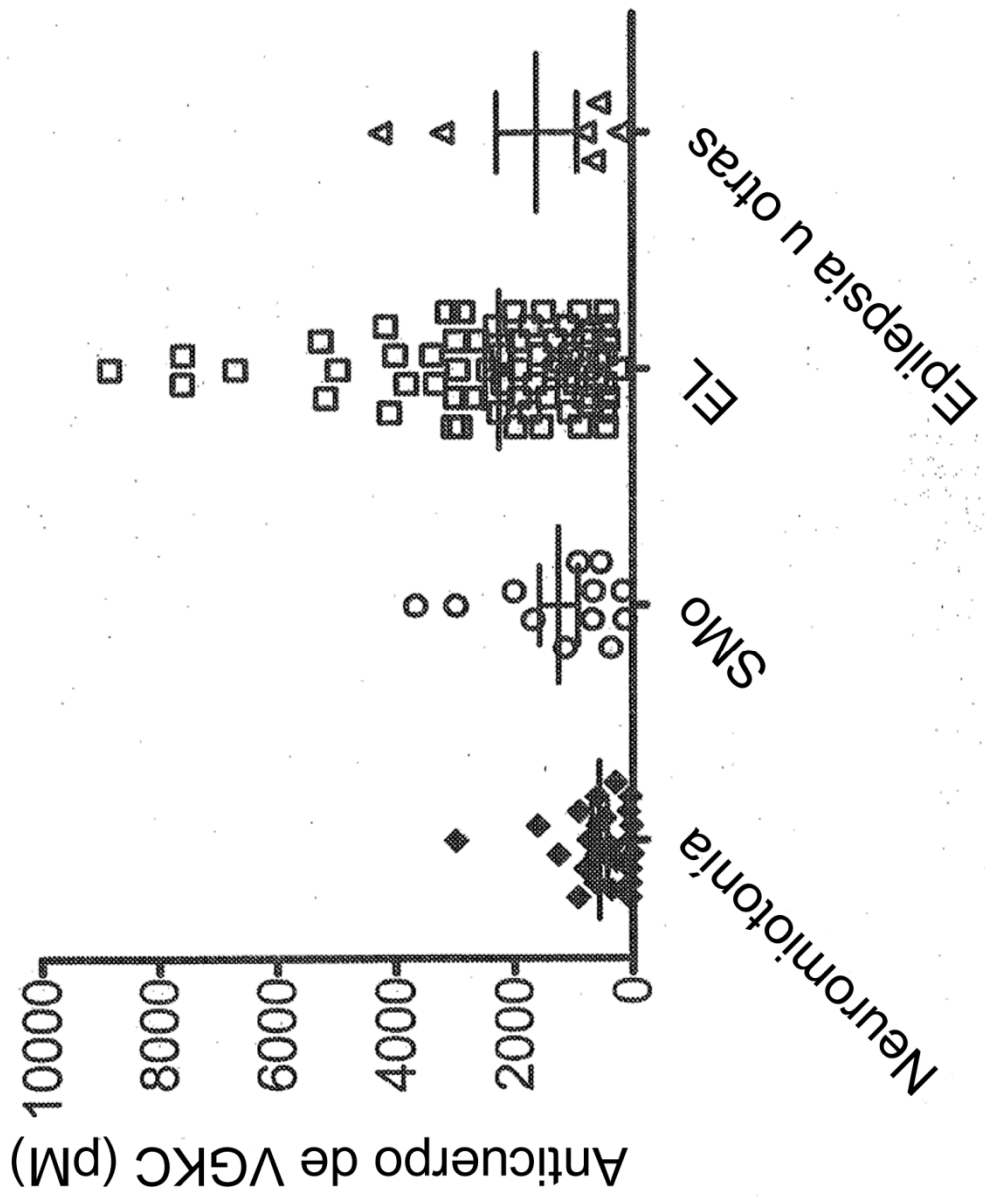


Figura 13

	Hombres	Mujeres	Total	Neg para Ac contra VGKC
Números totales	78	30	108	8
Edad mediana, intervalo	54, 19-78	60, 17-83	60, 17-83	
Tumores no tímicos*	5	2	7	0
Timomas**	8	3	11	0
Encefalitis límbica o epilepsia	49	16	65	0
Síndrome de Morvan	11	1	12	0
Neuromiotonía	15	10	25	8
Epilepsia u otras	3	3	6	0

Figura 14

Todos los pacientes	Lgi1	CASPR2	TAG-1	Proteína accesoria aún no identificada
Número total	39	27	4	38
Neoplasias malignas tímicas	0	<u>10</u>	0	1
Encefalitis límbica o epilepsia	<u>36</u>	7	1	21
Síndrome de Morvan	2	<u>10</u>	0	0
Neuromiotonía	0	<u>8</u>	3	14
Otro síndrome	1	2	0	3
negativo para Ac contra VGKC	0	0	<u>1</u>	7

* La mayoría no estaban actualmente activos