

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 660**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2010 PCT/US2010/050746**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11041433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2010 E 10821183 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2483417**

54 Título: **Método para diagnosticar y tratar encefalitis o epilepsia**

30 Prioridad:

29.09.2009 US 246843 P

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

DALMAU, JOSEP

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 625 660 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar y tratar encefalitis o epilepsia

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos para diagnosticar una encefalitis autoinmune o una epilepsia en un sujeto utilizando un anticuerpo contra un receptor de ácido γ -amino-butírico-B (GABA_B) inhibidor.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La plasticidad sináptica es una propiedad fundamental de las neuronas en la que subyacen mecanismos de la memoria, el aprendizaje y la cognición. La plasticidad depende de las complejas interacciones de canales de iones y receptores sinápticos, incluyendo el glutamato excitatorio receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) y receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Los modelos animales de interrupción farmacológica o genética de estos receptores resultan en alteraciones graves de la memoria, el aprendizaje, el comportamiento y convulsiones. Por lo tanto se espera que las respuestas inmunitarias contra los dominios extracelulares de estos receptores resulten en síntomas similares. De hecho, dos trastornos recientemente identificados en relación con anticuerpos frente a epítopos extracelulares de la subunidad NR1 del NMDAR y las subunidades GluR1/2 del AMPAR tienen como resultado encefalitis que se manifiestan con problemas psiquiátricos, de comportamiento y de memoria prominentes, a menudo acompañados de convulsiones. En estas dos autoinmunidades sinápticas cada uno de los anticuerpos provoca una disminución drástica y específica de los niveles del receptor diana en neuronas cultivadas, lo que sugiere que son patógenas. Adicionalmente, los síndromes neurológicos responden a menudo al tratamiento y, en algunos pacientes, la respuesta inmunitaria se produce como una manifestación paraneoplásica de un tumor que expresa el receptor diana, que se asemeja en muchos aspectos a los trastornos autoinmunes de la sinapsis neuromuscular (p. ej., síndrome de Lambert-Eaton y miastenia grave). Estos hallazgos, junto con una notable especificidad síndrome de anticuerpos y la alta frecuencia de algunos trastornos (p. ej., la encefalitis anti-NMDAR) han llamado la atención sobre otros síndromes en los que la memoria y el comportamiento están alterados y ocurren con frecuencia convulsiones. En algunos de estos síndromes, una patogénesis mediada inmune es sugerida por la respuesta clínica a la inmunoterapia empírica, sugiriendo los hallazgos de CSF y MRI una encefalitis límbica, o la detección de anticuerpos contra antígenos neuronales extracelulares aún desconocidos.

Mitoma *et al.*, 2003, *Journal of the Neurological Sciences*, 208: 51-56 describe la deficiencia dual de respuestas sinápticas mediadas por los receptores GABA_A y GABA_B por parte de auto-anticuerpos contra ácido glutámico decarboxilasa. Mazzi *et al.*, 2008, *Transfusion and Apheresis Science*, 39: 229-233 describe a paciente con encefalitis límbica paraneoplásica con auto-anticuerpos contra ácido glutámico decarboxilasa, que fue tratado utilizando intercambio de plasma terapéutico.

Una mejor comprensión de la función de diversos antígenos puede ayudar a mejorar las estrategias del tratamiento. Para el clínico que actualmente se enfrenta a estos pacientes, sin embargo, la mejor oportunidad para afectar el resultado neurológico depende de: (1) el diagnóstico precoz de la enfermedad, (2) el descubrimiento temprano y el tratamiento del tumor, y (3) el uso de la inmunoterapia. Por consiguiente, existe una necesidad de métodos mejorados de diagnosticar la encefalitis autoinmune o ataques epilépticos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método para diagnosticar una encefalitis autoinmune, un tumor oculto que provoca una encefalitis autoinmune, o en un sujeto con epilepsia, un tumor que provoca la epilepsia, comprendiendo el método testar una muestra biológica de un sujeto para determinar la presencia de un anticuerpo contra un receptor GABA_B, en el que la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica es indicativa de que el sujeto tiene una encefalitis autoinmune o un tumor oculto que provoca dicha encefalitis autoinmune, o en los casos en los que el sujeto tiene epilepsia, la presencia de dicho anticuerpo es indicativa de un tumor en dicho sujeto que provoca dicha epilepsia.

En una realización, el anticuerpo se une a la subunidad B1 de un receptor GABA_B. En otra realización, el anticuerpo se une a la subunidad B2 de un receptor GABA_B.

En una realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis autoinmune paraneoplásica. En una realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis del receptor anti-GABA_B. En una realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis autoinmune no paraneoplásica. En una realización, la encefalitis autoinmune comprende una encefalitis límbica.

5 En una realización, la encefalitis autoinmune está asociada a síntomas patológicos tales como convulsiones, síntomas psiquiátricos, anomalía en la cognición y el comportamiento, un trastorno en el movimiento o movimientos anormales, un nivel disminuido de conciencia, hipoventilación, amnesia o déficit de memoria, o una combinación de los mismos.

10 En una realización, la encefalitis autoinmune está asociada con un tumor. En determinadas realizaciones, el tumor puede ser un cáncer de pulmón de células pequeñas o un tumor neuroendocrino del pulmón u otros órganos.

En una realización, la muestra biológica es una muestra de fluido cerebroespinal (CSF). En otras realizaciones, la muestra biológica es una muestra de suero o de plasma.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, ejemplos y figuras siguientes.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una MRI de un paciente con anticuerpos contra el receptor GABA_B y encefalitis límbica. MRIs del cerebro de FLAIR axiales del caso 1, tomadas en la presentación (A) mostraron una señal incrementada en los lóbulos temporales mediales (flechas), más pronunciadas a la izquierda. La repetición del estudio en 1 mes (B) mostró una mejoría. La repetición de los estudios a los 3 y 9 meses después de la presentación (C, D) se mantuvo estable.

La Figura 2 muestra un inmuno-marcaje de cerebro de rata con anticuerpos del paciente. Corte sagital del cerebro de rata inmuno-teñido con anticuerpos CSF de un paciente con encefalitis límbica. La extensa tinción se observó en el neurópilo del hipocampo, el tálamo, el cerebelo y la corteza cerebral.

La Figura 3 muestra que los anticuerpos de los pacientes reaccionan con epítopos extracelulares y precipitan las subunidades B1 y B2 del receptor GABA_B. El cultivo de las neuronas del hipocampo de ratas se incubó (in vivo, no permeabilizadas) con el CSF de un paciente con LE. La intensa reactividad a modo de puntos indica anticuerpos del paciente con antígenos de la superficie celular (A); barra de escala = 10 μm. La precipitación de estos antígenos utilizando anticuerpos del paciente se muestra en un gel en el que las proteínas se visualizan con EZBlue (B). Los anticuerpos del paciente (P) precipitaron dos bandas de proteínas a ~105-90 kDa; estas bandas no se observan en el precipitado utilizando CSF de un individuo de control (N). La secuenciación de todas las bandas utilizando espectrometría de masas mostró las subunidades B1 y B2 del receptor GABA_B. Otras bandas más pequeñas eran fragmentos proteolíticos y la IgG del paciente. La subsiguiente transferencia del gel a nitrocelulosa y la inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las subunidades de GABA_B confirmó que los anticuerpos del paciente precipitaron las subunidades B1 y B2 (Paneles en D).

La Figura 4 muestra que los anticuerpos del paciente reconocen específicamente el receptor GABA_B en las sinapsis neuronales. Imagen confocal de una neurona del hipocampo de rata embrionaria cultivada, triplemente marcada con anticuerpos del paciente (verde), un anticuerpo policlonal de cobaya contra un epítipo intracelular del receptor GABA_{B1} (rojo) y el marcador presináptico bassoon (azul) (a). Área de la dendrita de la misma neurona que muestra la tinción de anticuerpos del paciente (b), la tinción de anticuerpos receptor policlonal GABA_{B1} de cobaya (c), la tinción de anticuerpos de paciente y de cobaya (d) y la tinción triple (e). La cuantificación de la localización conjunta de marcaje de las dendritas de 24 neuronas se muestra en (f).

La Figura 5 muestra la detección de anticuerpos para la subunidad GABA_{B1} utilizando un ensayo basado en células HEK293. Células HEK293 transfectadas con subunidades B1 y B2 del receptor GABA_B muestran reactividad con CSF de un paciente con encefalitis límbica (a) y un anticuerpo policlonal contra la subunidad B1 del receptor GABA_B (b); ambas reactividades se combinan en (c). Las mismas células no reaccionan con el CSF de un individuo control (d); las reactividades se combinaron en (f). Método de inmunofluorescencia; x400.

La Figura 6 muestra la expresión del receptor GABA_B por el cáncer de pulmón de células pequeñas. Secciones consecutivas de dos SCLCs inmunoteñidas con un anticuerpo policlonal contra el receptor GABA_{B1} (a, c) e IgG biotinilada de un paciente con anticuerpos contra el receptor GABA_{B1}. Ambos anticuerpos muestran una inmunotinción heterogénea que indica la expresión del receptor GABA_{B1} en ambos SCLCs. Método de avidina-biotina peroxidasa; secciones ligeramente contra-teñidas con hematoxilina; x400.

La Figura 7 muestra la detección de GABA_BR-ab utilizando un ensayo basado en células HEK293. Células HEK293 se transfectaron para expresar el receptor GABA_{B1/B2} y se incubaron *in vivo*, no permeabilizadas, con CSF de un paciente. Después de ello, las células se fijaron y se incubaron con un anticuerpo policlonal contra un epítipo intracelular de la subunidad B1 del receptor GABA_B. Obsérvese que el CSF de ese paciente tiñe la superficie celular de células que expresan específicamente los receptores GABA_B (A) tal como se demuestra por el anticuerpo informador intracelular (B). Ambas reactividades se muestran combinadas en C. Los núcleos contra-teñidos con DAPI. Barra de escala = 20 µm.

La Figura 8 muestra el cultivo primario de neuronas del hipocampo de rata incubadas *in vivo* con CSF de un paciente con GABA_BR-ab. Hay una intensa reactividad punteada en la membrana neuronal. Barra de escala = 20 µm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a métodos para diagnosticar una encefalitis autoinmune o una epilepsia en un sujeto utilizando un anticuerpo contra un receptor GABA_B.

En una realización, proporcionada en esta memoria, es un método para diagnosticar una encefalitis autoinmune en un sujeto, comprendiendo el método someter a ensayo una muestra biológica del sujeto para determinar la presencia de un anticuerpo contra un receptor GABA_B, en el que la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica es indicativa de que el sujeto tiene una encefalitis autoinmune.

En otra realización, se proporciona en esta memoria un método para diagnosticar un tumor oculto que provoca una encefalitis autoinmune en un sujeto, comprendiendo el método someter a ensayo una muestra biológica del sujeto para determinar la presencia de un anticuerpo contra un receptor GABA_B, en el que la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica es indicativa de que el sujeto tiene un tumor oculto que es la causa de dicha encefalitis autoinmune.

En otra realización, se proporciona en esta memoria un método para diagnosticar un tumor que provoca epilepsia en un sujeto con epilepsia, comprendiendo el método someter a ensayo una muestra biológica del sujeto para determinar la presencia de un anticuerpo contra un receptor GABA_B, en el que la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de un tumor en dicho sujeto y dicho tumor es una causa de dicha epilepsia.

La solicitud también describe un método para diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene epilepsia, que comprende la etapa de: obtener una muestra biológica de dicho sujeto; y someter a ensayo dicha muestra biológica para determinar la presencia de un anticuerpo contra un receptor GABA_B, en el que la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica indica la presencia de un tumor en dicho sujeto, diagnosticando de ese modo dicho tumor en dicho sujeto que tiene dicha epilepsia.

La solicitud también describe un método para tratar una encefalitis autoinmune en un sujeto, que comprende las etapas de: detectar un tumor asociado con dicha encefalitis autoinmune sometiendo a ensayo un fluido corporal de dicho sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un receptor GABA_B, en el que la presencia de dicho anticuerpo en dicho fluido corporal indica la presencia de dicho tumor en dicho sujeto y que dicho tumor es una causa de dicha encefalitis autoinmune; y tratar dicho tumor.

En una realización, la presente invención proporciona un método para determinar una causa de una encefalitis en un sujeto, que comprende someter a ensayo un fluido corporal del sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un receptor GABA_B. En otra realización, la presencia de un anticuerpo contra la subunidad B1 de un receptor GABA_B en el fluido corporal indica que la encefalitis es de etiología autoinmune. En otra realización, la presencia de un anticuerpo

contra la subunidad B2 de un receptor GABA_B en el fluido corporal indica que la encefalitis es de etiología autoinmune.

5 En otra realización, los métodos y composiciones proporcionados en esta memoria facilitan el reconocimiento de una forma grave de encefalitis autoinmune que es a menudo sensible al tratamiento. Los métodos descritos en esta memoria enfatizan la idea de que la autoinmunidad puede afectar el comportamiento y, en particular, que un anticuerpo contra un receptor GABA_B puede alterar la emoción, en una realización, o la memoria, la conciencia o su combinación en otras realizaciones independientes.

10 La solicitud describe un método para determinar una causa de una encefalitis autoinmune en un sujeto, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal del sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un receptor GABA_B, determinando de ese modo una causa de una encefalitis autoinmune en un sujeto. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica la presencia de un tumor en el sujeto. En otra realización, el tumor es una causa de la encefalitis autoinmune.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar una encefalitis autoinmune en un sujeto, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal del sujeto en cuanto a un anticuerpo contra la subunidad B1 de un receptor GABA_B, diagnosticando de ese modo dicha encefalitis autoinmune en dicho sujeto.

La muestra biológica utilizada en los métodos descritos en esta memoria, un fluido corporal que se somete a ensayo por los métodos de la presente invención es, en otra realización, un fluido cefalorraquídeo (CSF). En otra realización, el fluido corporal es plasma. En otra realización, el fluido corporal es cualquier otro tipo de líquido conocido en la técnica. En otra realización, la muestra biológica es fluido amniótico, sangre, suero, saliva o su combinación.

20 La encefalitis diagnosticada por los métodos de la presente invención es una encefalitis autoinmune. En una 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 otro tipo de encefalitis autoinmune conocida en la técnica.

25 En una realización, se desconoce la frecuencia de encefalitis anti-GABA_B paraneoplásica, diagnosticada por los métodos descritos en esta memoria. En otra realización, la encefalitis anti-GABA_B paraneoplásica es con frecuencia no reconocida. Esto puede ser debido a varias características que hacen que este trastorno sea único entre las encefalitis paraneoplásicas, incluyendo en una realización, la participación de mujeres relativamente jóvenes entre las 2ª y 5ª décadas, o, en otra realización, la presentación inusual con manifestaciones psiquiátricas prominentes, o
30 en otra realización, hallazgos de MRI normales o atípicos, que en el 75% de los casos consisten en anomalías leves, transitorias T2 o FLAIR fuera de los lóbulos temporales medios, con una mejora cortical en determinadas realizaciones, o todavía en otra realización, la aparición benigna de tumores en los ovarios. En una realización, cualquiera de los sujetos que presentan los síntomas descritos anteriormente son diagnosticados utilizando los métodos descritos en esta memoria.

35 En otra realización, la encefalitis autoinmune es una encefalitis límbica. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con una disfunción límbica. En otra realización, la encefalitis autoinmune no está asociada con una disfunción límbica.

40 En una realización, la encefalitis límbica provoca déficits impresionantes que característicamente son dominados por la pérdida rápida y grave de la memoria a corto plazo. En otra realización, los pacientes muestran encefalitis subaguda de la vida adulta, afectando principalmente a las zonas límbicas con evidencia de cáncer en una realización. En una realización, la expresión "encefalitis límbica" se refiere a un sujeto que exhibe una pérdida de memoria grave a corto plazo y la demencia en asociación con carcinoma bronquial.

45 En otra realización, la encefalitis autoinmune diagnosticada por los métodos de la presente invención está asociada con convulsiones. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con un síndrome diencefálico. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con un síntoma psiquiátrico. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con una anomalía en la cognición. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con una anomalía en el comportamiento.

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

- 5 En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con un trastorno del movimiento. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con movimientos anormales. En otra realización, el trastorno del movimiento es cualquier otro trastorno del movimiento conocido en la técnica.

En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con un nivel de conciencia disminuido. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con hipoventilación.

- 10 En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con disfunción de cualquier parte del cerebro o de la médula espinal. En otra realización, la encefalitis autoinmune se asocia con una combinación de cualquiera de los síntomas o trastornos anteriores.

En una realización, la encefalitis autoinmune se asocia con un tumor. En una realización, el tumor es un tumor neuroendocrino del cáncer de pulmón o de pulmón de células pequeñas (SCLC). En otra realización, el tumor es un teratoma de ovario. En otra realización, el tumor es un tumor tímico.

- 15 En otra realización, el tumor es un tumor testicular. En otra realización, el cáncer asociado con la encefalitis es un tumor de cáncer de cuello uterino. En otra realización, el cáncer es un tumor de cáncer de cabeza y cuello. En otra realización, el cáncer es un tumor de cáncer de mama. En otra realización, el cáncer es un tumor de cáncer anogenital.

- 20 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.

- 25 En otra realización, el cáncer es cáncer de páncreas. En otra realización, el cáncer es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer es cáncer gástrico. En otra realización, el cáncer es una lesión carcinomatosa del páncreas. En otra realización, el cáncer es adenocarcinoma pulmonar. En otra realización, el cáncer es adenocarcinoma colorrectal. En otra realización, el cáncer es adenocarcinoma pulmonar escamoso. En otra realización, el cáncer es adenocarcinoma gástrico. En otra realización, el cáncer es un neoplasma epitelial de la superficie del ovario (p. ej., una variedad benigna, proliferativa o maligna del mismo). En otra realización, el cáncer es un carcinoma de células escamosas oral. En otra realización, el cáncer es carcinoma de pulmón no de células pequeñas. En otra realización, el cáncer es un carcinoma endometrial. En otra realización, el cáncer es un cáncer de vejiga. En otra realización, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello. En otra realización, el cáncer es un carcinoma de próstata.

- 35 En otra realización, el cáncer es una leucemia mielógena aguda (LMA). En otra realización, el cáncer es un síndrome mielodisplásico (MDS). En otra realización, el cáncer es un cáncer de pulmón no de células pequeñas (NSCLC). En otra realización, el cáncer es un tumor de Wilms. En otra realización, el cáncer es una leucemia. En otra realización, el cáncer es un linfoma. En otra realización, el cáncer es un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas. En otra realización, el cáncer es un mesotelioma (p. ej., mesotelioma maligno). En otra realización, el cáncer es un cáncer gástrico. En otra realización, el cáncer es un cáncer de colon. En otra realización, el cáncer es un cáncer de pulmón. En otra realización, el cáncer es un cáncer de mama. En otra realización, el cáncer es un tumor de células germinales. En otra realización, el cáncer es un cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer es un cáncer de útero. En otra realización, el cáncer es un cáncer de tiroides. En otra realización, el cáncer es un carcinoma hepatocelular. En otra realización, el cáncer es un cáncer de tiroides. En otra realización, el cáncer es un cáncer de hígado. En otra realización, el cáncer es un 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. En otra realización, el tumor es cualquier otro tipo de tumor conocido en la técnica.

- 45 En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar una causa de epilepsia en un sujeto, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal de dicho sujeto en cuanto a un anticuerpo a un receptor GABA_B, determinando con ello una causa de dicha epilepsia en dicho sujeto, en donde el anticuerpo indica la presencia de un tumor en el sujeto, y el tumor es una causa de la epilepsia.

La epilepsia diagnosticada por los métodos de la presente invención es, en otra realización, una epilepsia idiopática. En otra realización, la epilepsia responde a una terapia de agotamiento de IgG. En otra realización, la epilepsia se asocia con convulsiones parciales. En otra realización, la epilepsia se asocia con convulsiones parciales simples. En otra realización, la epilepsia se asocia con convulsiones parciales complejas. En otra realización, la epilepsia se asocia con convulsiones generalizadas. En otra realización, la epilepsia se asocia con la ausencia de convulsiones (achaques). En otra realización, la epilepsia se asocia con convulsiones mioclónicas. En otra realización, la epilepsia se asocia con convulsiones convulsivas (gran mal) tónico-clónicas.

En otra realización, la epilepsia se asocia con el síndrome de West. En otra realización, la epilepsia se asocia con el síndrome de Lennox-Gastaut. En otra realización, la epilepsia se asocia con cualquier otro síndrome conocido en la técnica.

En otra realización, la epilepsia es de causa desconocida. En otra realización, la epilepsia es cualquier otro tipo de epilepsia conocida en la técnica.

"Causa de" una encefalitis autoinmune, epilepsia, etc. se refiere, en otra realización, a una causa primaria del trastorno. En otra realización, la expresión se refiere a una causa que contribuye al trastorno. En otra realización, la expresión se refiere a una causalidad indirecta. En otra realización, el término se refiere a la causalidad a través de una respuesta inmune inducida por el tumor. En otra realización, la expresión se refiere a la causalidad importante de la enfermedad.

La solicitud describe un método para diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal de dicho sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un receptor GABA_B, diagnosticando de ese modo un tumor en dicho sujeto que tiene dicha encefalitis. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto.

La solicitud también describe un método para detectar un tumor en un sujeto que tiene una encefalitis, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal de dicho sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un receptor GABA_B, detectando con ello dicho tumor en dicho sujeto que tiene dicha encefalitis. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica la presencia de un tumor en el sujeto.

La solicitud también describe un método para diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal de dicho sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un receptor GABA_B, diagnosticando con ello dicho tumor en dicho sujeto que tiene dicha epilepsia. En otra realización, la presencia del anticuerpo indica la presencia de un tumor en el sujeto.

La solicitud describe un método para detectar un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal de dicho sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un receptor GABA_B, detectando con ello dicho tumor en dicho sujeto que tiene dicha epilepsia. En otra realización, la presencia de dicho anticuerpo indica una presencia de un tumor en el sujeto.

La solicitud describe, además, un método para diagnosticar o detectar una enfermedad GABA_B mediada en un sujeto, que comprende la etapa de someter a ensayo un fluido corporal del sujeto en cuanto a un anticuerpo contra un anticuerpo contra un receptor GABA_B, diagnosticando o detectando con ello dicha enfermedad mediada por GABA_B en dicho sujeto.

Los receptores GABA_B median en la inhibición presináptica por dos mecanismos: la activación de los canales de potasio de rectificación interna activados por proteína G (GIRK) y la inhibición de los canales de calcio. También atenúan las frecuencias de disparo presinápticas. En la post-sinapsis, los receptores GABA_B median en la inhibición por mecanismos similares y mediante la inducción de un potencial post-sináptico inhibitorio lento (IPSP). A un nivel de la red neuronal, los receptores GABA_B modulan su actividad limitando la duración de los estados de red de alta actividad, impidiendo una sincronización neuronal excesiva, y permitiendo que nuevos estímulos rompan la actividad sincrónica. Los receptores GABA_B están ampliamente distribuidos en el cerebro y la médula espinal, pero son particularmente abundantes en el hipocampo, el tálamo y el cerebelo, que son las zonas de más intenso inmunomarcado del cerebro de rata por los anticuerpos de los pacientes. El auto-antígeno principal de los anticuerpos de los pacientes, la subunidad GABA_{B1}, es necesario para la unión de GABA (y la función del receptor), mientras que la subunidad GABA_{B2} se requiere para la localización del receptor a las zonas apropiadas de la membrana celular y

para el acoplamiento a la proteína G. La delección de GABA_{B1} en ratones transgénicos en convulsiones predominantes, déficit de memoria y comportamientos de ansiedad incrementados. Tanto la evidencia genética como la farmacológica apoyan un papel importante para receptores GABA_B en el control de la ansiedad y la regulación del humor.

- 5 La solicitud también describe un método de tratamiento de la encefalitis autoinmune en un sujeto. El método comprende las etapas de: detectar un tumor asociado con una encefalitis autoinmune al someter a ensayo un fluido corporal de dicho sujeto en cuanto a un anticuerpo a un receptor GABA_B, en donde una presencia de dicho anticuerpo indica la presencia de dicho tumor en dicho sujeto y que dicho tumor es una causa de dicha encefalitis autoinmune, y tratar dicho tumor. El tumor puede ser tratado durante la fase temprana. El tumor puede ser tratado
- 10 en el espacio de los cuatro meses de la aparición de un síntoma asociado con la encefalitis autoinmune, o en el espacio de los tres meses de la aparición de un síntoma asociado con la encefalitis autoinmune, o en el espacio de los dos meses de la aparición de un síntoma asociado con la encefalitis autoinmune, o en el espacio de un mes de la aparición de un síntoma asociado con la encefalitis autoinmune.

- 15 Tal como se describe en esta memoria, la etapa de tratar dicho tumor comprende eliminar dicho tumor, o puede comprender la inmunoterapia, o puede comprender eliminar dicho tumor en combinación con inmunoterapia. En otra realización, la etapa de tratar dicho tumor comprende quimioterapia, o comprende eliminar dicho tumor en combinación con inmunoterapia.

- 20 En una realización, el receptor GABA_B comprende subunidades. En otra realización, los receptores GABA_B se forman a partir de heterómeros de subunidades B1 y B2. En otra realización, se requiere que ambas subunidades creen un receptor funcional que contiene subunidades B1 y B2.

La subunidad B1 puede ser una subunidad B1-a. En otra realización, el receptor existe como heterómeros de subunidades B1 y subunidades B2. En una realización, B1 y B2 se combinan para formar subtipos de receptores con distintas propiedades farmacológicas, localización y capacidad de interactuar con mensajeros intracelulares.

- 25 En otra realización, la subunidad B1 es un monómero de un multímero de receptor GABA_B. En otra realización, el multímero es un homómero que comprende dos o más subunidades. En otra realización, el multímero es un homodímero que comprende dos subunidades B1. En otra realización, el multímero es un heterómero que comprende una subunidad B1. En otra realización, el multímero es un heterómero que comprende una subunidad B1 y una subunidad B2. En otra realización, el multímero es un heterómero que comprende una subunidad B1-a y una subunidad B2. En otra realización, el multímero es un heterómero que comprende la subunidad B1-b y una
- 30 subunidad B2. En otra realización, el multímero es un heterómero que comprende la subunidad B1-c y una subunidad B2.

En una realización, la subunidad B1 del receptor GABA_B tiene la secuencia tal como se expone a continuación:

- | | | |
|----|--|-----|
| | MLLLLLLAPL FLRPPGAGGA QTPNATSEGC QIHPPWEGG IRYRGLTRDQ VKAINFLPVD | 60 |
| | YEIEYVCRGE REVVGPKVRK CLANGSWTDM DTPSRCVRIC SKSYLTLENG KVFLTGGDLP | 120 |
| 35 | ALDGARVDFR CDPDFHLVGS SRSICSQGQW STPKPHCQVN RTPHSERRAV YIGALFPMMSG | 180 |
| | GWPGGQACQP AVEMALEDVN SRRDILPDYE LKLIHDSKC DPGQATKYLY ELLYNDPIKI | 240 |
| | ILMPGCSSVS TLVAEAARMW NLIVLSYGSS SPALSNRQRF PTFFRTHPSA TLHNPTRVKL | 300 |
| | FEKWGWKKIA TIQQTTEVFT STLDDLEERV KEAGIEITFR QSFFSDPAVP VKNLKRQDAR | 360 |
| | IIVGLFYETE ARKVFCEVYK ERLFGKKYVW FLIGWYADNW FKIDPSINC TVDEMTEAVE | 420 |
| 40 | GHITTEIVML NPANTRISN MTSQEFVEKL TKRLKRHPPEE TGGFQEAPLA YDAIWALALA | 480 |
| | LNKTSGGGGR SGVRLEDFNY NNQTITDQIY RAMNSSSFEG VSGHVVDAS GSRMAWTLIE | 540 |

ES 2 625 660 T3

	QLQGGSYKKI GYYDSTKDDL SWSKTDKWIG GSPPADQTLV IKTFRFLSQK LFISVSVLSS	600
	LGIVLAVVCL SFNIYN SHVR YIQNSQPNLN NLTA VGCSLA LAAVFPLGLD GYHIGRNQFP	660
	FVCQARLWLL GLGFSLGYGS MFTKIWWVHT VFTKKEEKKE WRKTLEPWKL YATVGLLVGM	720
	DVLT LAIWQI VDPLHRTIET FAKEE PKEDI DVSILPQLEH CSSRKMNTWL GIFYGYKGLL	780
5	LLLGIFLAYE TKS VSTEKIN DHRAVGMAIY NVAVLCLITA PVTMILSSQQ DAAFAFASLA	840
	IVFSSYITLV VLFVPMRRL ITRGEWQSEA QDTMKTGSST NNNEEEKSRL LEKENRELEK	900
	IIAEKEERVS ELRHQLQSRQ QLRSRRH PPT PPEPSGGLPR GPPEPPDRLS CDGSRVHLLY	960
	K	961
	(SEQ ID NO: 1)	

10	En otra realización, la subunidad B1 del receptor GABA _B tiene la secuencia tal como se expone a continuación:	
	MGP GAPFARV GWPLPLLVM AAGVAPVWAS HSPHLRPHS RVPPHPSSER RAVYIGALFP	60
	MSGGWPGGQA CQPAVEMALE DVNSRRDILP DYELKLIHHD SKCDPGQATK YLYELLYNDP	120
	IKIILMPGCS SVSTLVAEAA RMWNLIVLSY GSSSPALSNR QRFPTFFRTH PSATLHNPTR	180
	VKLFEKWGWK KIATIQQTTE VFTSTLDDLE ERVKEAGIEI TFRQSFFSDP AVPVKNLKRQ	240
15	DARIIVGLFY ETEARKVFCE VYKERLFGKK YVWFLIGWYA DNWFKIYDPS INCTVDEMT E	300
	AVEGHITTEI VMLNPANTRS ISNMTSQEFV EKLTKRLKRH PEETGGFQEA PLAYDAIWAL	360
	ALALNKTSGG GGRSGVRLED FNYYNQTTID QIYRAMNSSS FEGVSGHVVF DASGSRMAWT	420
	LIEQLQGGSY KKIGYYDSTK DDLSWSKTDK WIGGSPPADQ TLVIKTFRFL SQKLFISVSV	480
	LSSLGIVLAV VCLSFNIYNS HVRYIQNSQP NLNNLTAVGC SLALAAVFPL GLDGYHIGRN	540
20	QFPFVCQARL WLLGLGFSLG YGSMFTKIWW VHTVFTKKEE KKEWRKTLEP WKLYATVGLL	600
	VGMDVLT LAI WQIVDPLHRT IETFAKEE PK EDIDVSILPQ LEHCSSRKMN TWLGIFYGYK	660
	GLLLLLGIFL AYETKSVSTE KINDHRAVGM AIYNVAVLCL ITAPVTMILS SQQDAAFAFA	720
	SLAIVFSSYI TLVVLFPKM RRLITRGEWQ SEAQDTMKTG SSTNNNEEEK SRLLEKENRE	780
	LEKIIAEKEE RVSELRHQLQ SRQQLRSRRH PPTPPEPSGG LPRGPPEPPD RLSCDGSRVH	840
25	LLYK	844
	(SEQ ID NO: 2)	

En otra realización, la subunidad B1 del receptor GABA_B tiene la secuencia tal como se expone a continuación:

MLLLLLLAPL FLRPPGAGGA QTPNATSEGC QIIHPPWEGG IRYRGLTRDQ VKAINFLPVD	60
---	----

ES 2 625 660 T3

	YEIEYVCRGE REVVGPKVRK CLANGSWTDM DTPSRCVNRT PHSERRAVYI GALFPMSSGGW	120
	PGGQACQPAV EMALEDVNSR RDILPDYELK LIHHSKCDP GQATKYLYEL LYNDPIKIIL	180
	MPGCSSVSTL VAEAARMWNL IVLSYGSSSP ALSNRQRFPT FFRTHPSATL HNPTRVKLFE	240
	KWGWKKIATI QQTTEVFTST LDDLEERVKE AGIEITFRQS FFSDPAVPVK NLKRQDARII	300
5	VGLFYETEAR KVFCEVYKER LFGKKYVWFL IGWYADNWFK IYDPSINCTV DEMTEAVEGH	360
	ITTEIVMLNP ANTRSISNMT SQEFVEKLT RLRHPEETG GFQEAPLAYD AIWALALALN	420
	KTSGGGGRSG VRLEDFNYNN QTITDQIYRA MNSSSFEGVS GHVVFASGS RMAWTLIEQL	480
	QGGSYKKIGY YDSTKDDLSW SKTDKWIGGS PPADQTLVIK TFRFLSQKLF ISVSVLSSLG	540
	IVLAVVCLSF NIYNHVRVYI QNSQPNLNNL TAVGCSLALA AVFPLGLDGY HIGRNQFPFV	600
10	CQARLWLLGL GFSLGYGSMF TKIWWVHTVF TKKEEKKEWR KTLPEWKLYA TVGLLVGMDV	660
	LTLAIWQIVD PLHRTIETFA KEEPKEDIDV SILPQLEHCS SRKMNTWLGI FYGYKGLLLL	720
	LGIFLAYETK SVSTEKINDH RAVGMAIYNV AVLCLITAPV TMILSSQQDA AFAFASLAIV	780
	FSSYITLVVL FVPKMRLIT RGEWQSEAQD TMKTGSSTNN NEEKSRLL EKENRELEKII	840
	AEKEERVSEL RHQLQSRQQL RSRRHPTTPP EPSGGLPRGP PEPPDRLSCD GSRVHLLYK	899
15	(SEQ ID NO: 3)	

En otra realización, la subunidad B1 es un homólogo de SEQ ID NOs: 1, 2 ó 3. En otra realización, la subunidad B1 es una variante de SEQ ID NOs: 1, 2 ó 3. En otra realización, la subunidad B1 es un isómero de la SEQ ID NOs: 1, 2 ó 3. En otra realización, la subunidad B1 es un fragmento de SEQ ID NOs: 1, 2 ó 3. En otra realización, la subunidad B1 comprende SEQ ID NOs: 1, 2, o 3.

- 20 En otra realización, la subunidad B1 del receptor GABA_B es codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia:

	ccctcttc ccccgccct gcctccctt gcaccctct tctccctcc gcccgggagc	60
	tctccctggt ccccgccgcc gcctcttcc ctcccggtc cccgctccc gctcccgtag	120
	ctgccgccg cccggggaag aagagacagg ggtgggggtt gggggaagcg agagaggagg	180
25	ggagagaccc tggccaggct ggagcctgga ttcaggggga ggagggacgg gaggaggaga	240
	aaggtggagg agaaggagg ggggagcggg gaggagcggc cgggcctggg gccttgaggc	300
	ccggggagag ccggggagcc gggcccgcc gccgagatgt tgctgctgct gctactggcg	360
	ccactcttc tccgcccc gggcgccggc ggggcgcaga ccccaacgc cacctcagaa	420
	ggttgccaga tcatacccc gccctgggaa gggggcatca ggtaccgggg cctgactcgg	480
30	gaccaggtag aggctatcaa ctctctgcca gtggactatg agattagtag tgtgtgccgg	540

ES 2 625 660 T3

ggggagcgcg aggtggtggg gcccaggtc cgcaagtgc tggccaacgg ctcttgaca 600
 gatatggaca caccagccg ctgtgtccga atctgtcca agtcttatt gacctggaa 660
 aatgggaagg ttttctgac ggggtgggac ctcccagctc tggacggagc ccgggtggat 720
 ttccggtgtg accccgactt ccatctggtg ggcagctccc ggagcatctg tagtcagggc 780
 5 cagtggagca ccccaagcc cactgtccag gtgaatcgaa cgccacactc agaacggcgc 840
 gcagtgtaca tcggggcact gtttccatg agcgggggct ggccaggggg ccaggcctgc 900
 cagcccgcg tggagatggc gctggaggac gtgaatagcc gcagggacat cctgccggac 960
 tatgagctca agctcatcca ccacgacagc aagtgtgatc caggccaagc caccaagtac 1020
 ctatatgagc tgcttaca cgacctatc aagatcatcc ttatgcctgg ctgcagctct 1080
 10 gtctccacgc tgggtgctga ggctgtagg atgtggaacc tcattgtgt ttcctatggc 1140
 tccagctcac cagccctgtc aaaccggcag cgtttccca ctttctccg aacgcacca 1200
 tcagccacac tcacaaccc taccgcgtg aaactcttg aaaagtggg ctggaagaag 1260
 attgctacca tcagcagac cactgaggtc ttcacttga ctctggacga cctggaggaa 1320
 cgagtgaagg aggttgaat tgagattact ttccgccaga gtttcttc agatccagct 1380
 15 gtgcccgtca aaaacctgaa gcgccaggat gccgaatca tcgtgggact ttctatgag 1440
 actgaagccc ggaaagttt ttgtgaggtg tacaaggagc gtctctttg gaagaagtac 1500
 gtctggttc tcattgggtg gtatgtgac aattggttca agatctacga cccttctatc 1560
 aactgcacag tgatgagat gactgaggcg gtggagggcc acatcacaa tgagattgtc 1620
 atgtgaatc ctgcaatac ccgagcatt tccaacatga catccagga attgtggag 1680
 20 aaactaacca agcgactgaa aagacaccct gaggagacag gaggcttcca ggaggaccg 1740
 ctggcctatg atgcatctg ggcttggca ctggccctga acaagacatc tggaggaggc 1800
 ggccgttctg gtgtgcgct ggaggacttc aactacaaca accagacat taccgacaa 1860
 atctaccggg caatgaactc ttcgtcttt gaggtgtct ctggccatgt ggtgttgat 1920
 gccagcggtc ctggatggc atggacgctt atcgagcagc ttcagggtgg cagctacaag 1980
 25 aagattggct actatgacag caccaaggat gatcttctt ggtccaaaac agataaatg 2040
 attggagggt cccccagc tgaccagacc ctggtcatca agacattccg ctctgttca 2100
 cagaaactct ttatctccgt ctgattctc tccagcctgg gcattgtct agctgtgtc 2160
 tgtctgtct ttaacatca caactacat gtccgttata tccagaactc acagcccaac 2220

ES 2 625 660 T3

ctgaacaacc tgactgtctgt gggctgtctca ctggctttag ctgctgtctt ccccttggg 2280
 ctcatgtgtt accacattgg gaggaaccag ttctcttcg tctgccaggc ccgcctctgg 2340
 ctctggggcc tgggctttag tctgggttac ggttccatgt tcaccaagat ttggtgggtc 2400
 cacacgttct tcacaaagaa ggaagaaaag aaggagtga ggaagactct ggaaccctgg 2460
 5 aagctgtatg ccacagtggg cctgctggtg ggcattgatg tctcactct cgccatctgg 2520
 cagatcgtgg accctctgca ccggaccatt gagacatttg ccaaggagga acctaaggaa 2580
 gatattgacg tctctattct gcccagctg gagcattgca gctccaggaa gatgaataca 2640
 tggcttgga tttctatgg ttacaagggg ctgctgtctg tgctgggaat ctctctgtct 2700
 tatgagacca agagtgtgtc cactgagaag atcaatgatc accgggctgt gggcattggct 2760
 10 atctacaatg tggcagtctt gtgcctcatc actgctcctg tcaccatgat tctgtccagc 2820
 cagcaggatg cagcctttgc cttgctctct ctgccatag tttctcctc ctatatcact 2880
 ctgtttgtgc tctttgtgcc caagatgctg aggtgatca cccgagggga atggcagtcg 2940
 gagggcgagg acaccatgaa gacagggta tcgaccaaca acaacgagga ggagaagtcc 3000
 cggctgttgg agaaggagaa ccgtgaactg gaaaagatca ttgctgagaa agaggagcgt 3060
 15 gtctctgaac tgcgccatca actccagtct cggcagcagc tccgtcccg gcgccacca 3120
 ccgacacccc cagaaccctc tgggggctg cccaggggac cccctgagcc ccccgaccgg 3180
 cttagctgtg atgggagtcg agtgcatthg cttataagt gagggtaggg tgaggaggga 3240
 caggccagta gggggaggga aaggagagg ggaagggcag gggactcagg aagcaggggg 3300
 tccccatccc cagctgggaa gaacatgcta tccaatctca tctttgtaa atacatgtcc 3360
 20 ccctgtgagt tctgggtgta ttgggtctc tcatacctct gggaaacaga ccttttctc 3420
 tcttactgct tcatgtaatt ttgtatcacc tcttacaat ttatgtcga cctggcttga 3480
 agctgtcac tgctcacag ctgcctcctc agcagcctca ctgcatctt ctcttccat 3540
 gcaacaccct ctctagtta ccacggcaac cctgcagct cctctgcctt tgtgtctgt 3600
 tctgtccag caggggtctc ccaacaagt ctcttccac cccaaagggg cctctcctt 3660
 25 tctccactgt cataatctct ttcatctta ctgcccctc tatactttct cacatgtggc 3720
 tcccctgaa tttgtctcc ttgggagct cattctttc gccaggctc acatgtcct 3780
 tgctctgct ctgtgcactc acgtcagca cacatgatc ctcccctctc ctgctgtgc 3840
 ccactgaaca tgctcatgtg tacacagct tttccggtat gcttttca tttcagtc 3900

ES 2 625 660 T3

```

catgtgctct cgggtgccct gcattcacag ctacgtgtgc ccctctcatg gtcattgggtc   3960
tgcccttgag cgtgtttggg taggcatgtg caattgtct agcatgtga gtcattgtct   4020
tcctatttgc acacgtccat gttatccat gtactttccc tgtgtaccct ccatgtacct   4080
tgtgtacttt ctcccttaa atcatggtat tctctgaca gagccatag taccctaccc   4140
5   tgcacattgt tatgcacttt tcccaattc atgtttggg gggccatcca caccctctcc   4200
    ttgtcacaga atctccatt ctgtcagat tcccccatc tcattgcat tcatgtacta   4260
    ccctcagtct acactcaca tcatctctc ccaagactgc tccctttgt ttgtgtttt   4320
    ttgaggggga attaaggaaa aataagtggg ggcaggttg gagagctgct tcagtggat   4380
    agttgatgag aatcctgacc aaaggaaggc acccttgact gttgggatag acagatggac   4440
10   ctatgggggt ggaggtgggt tcccttcac actgtggtgt ctctgggga aggatctccc   4500
    cgaatctcaa taaaccagt aacagtgtga ctggcaaaa aaaaaaa   4547
    (SEQ ID NO: 4)

```

En otra realización, la subunidad B1 del receptor GABA_B es codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia:

```

15   cggtccttc ctctcgagg ttgcatcccc cctcccccc cgcgccctcc gactgtcgt   60
    cccacctgg cgctcgcttc cctccccgc ccttctctgc ctccccagct cccgcccgcc   120
    cccccacccc ccgtcgccgc gcgccgccg tgacgtcaga gccccctcc agccccacat   180
    ctccctctg ctctctctc tccctccgt cggtcagtca gtccgcgagg agagtccgcg   240
    gtggcgccga cgggtggcag agccgcgggg gccgtaggaa gccaacctc cctgtcttc   300
20   cggggccctc gccccctct cccacaaaa tcagggatgg aggcgcctcc ccggcacct   360
    cttagcagcc ctcccagga aaagtgtccc ccctgagctc ctaacgtcc ccaacagcta   420
    cccctgcccc ccacgccatg gggcccgggg cccctttgc ccgggtgggg tggccactgc   480
    cgcttctggt tgtatggcg gcaggggtgg ctccggtgtg ggctccac tcccccatc   540
    tcccgccgc tactcgccg gtccccccg accctctc agaacggcgc gcagtgtaca   600
25   tcggggcact gttcccatg agcgggggt gccaggggg ccaggcctgc cagccgcgg   660
    tggagatggc gctggaggac gtgaatagcc gcaggacat cctgccggac tatgagctca   720
    agctcatcca ccacgacagc aagtgtgac caggccaagc caccaagtac ctatatgagc   780
    tgctctaca cgacctatc aagatcatcc ttatgcctgg ctgcagctct gtctccacgc   840
    tggtggtga ggctgtagg atgtgaacc tcattgtgt ttctatggc tcagctcac   900

```

ES 2 625 660 T3

	cagccctgtc aaaccggcag cgtttcccca ctttctccg aacgcacca tcagccacac	960
	tccacaaccc taccgcgtg aaactcttg aaaagtggg ctggaagaag attgctacca	1020
	tccagcagac cactgaggtc ttacttcga ctctggacga cctggaggaa cgagtgaagg	1080
	aggctggaat tgagattact ttccgccaga gtttcttc agatccagct gtgcccgtca	1140
5	aaaacctgaa gcgccaggat gcccgaaatca tcgtgggact ttctatgag actgaagccc	1200
	ggaaagttt ttgtgagggt tacaaggagc gtctcttg gaagaagtac gtctggtcc	1260
	tcattgggtg gtatgtgac aattggtca agatctacga ccctctatc aactgcacag	1320
	tggatgagat gactgaggcg gtggagggcc acatcacaa tgagattgtc atgtgaatc	1380
	ctgccaatac ccgcagcatt tccaacatga catcccagga attgtggag aaactaacca	1440
10	agcgactgaa aagacacctt gaggagacag gaggctcca ggaggaccg ctggcctatg	1500
	atgccatctg ggcctggca ctggccctga acaagacatc tggaggaggc ggccgttctg	1560
	gtgtgcgcct ggaggactc aactacaaca accagaccat taccgacaa atctaccggg	1620
	caatgaactc ttctccttt gaggggtgtc ctggccatgt ggtgtttgat gccagcggct	1680
	ctcgatggc atggacgct atcgagcagc ttcagggtg cagctacaag aagattggct	1740
15	actatgacag caccaaggat gatcttctt ggtccaaaac agataaatgg attggagggt	1800
	ccccccagc tgaccagacc ctggctatca agacattccg ctctctgtca cagaaactct	1860
	ttatctcgt ctcaatttc tccagcctg gcattgtct agctgtgtc tgtctgtct	1920
	ttaacatcta caactcacat gtccgttata tccagaactc acagcccaac ctgaacaacc	1980
	tgactgtgt gggctgtca ctggcttag ctgtgtctt cccctgggg ctcatggtt	2040
20	accacattg gaggaaccag ttctcttcg tctgccaggc ccgcctctg ctctgggcc	2100
	tgggcttag tctgggtac ggttcatgt tcaccaagat ttgtgggtc cacacgtct	2160
	tcacaaagaa ggaagaaaag aaggagtga ggaagactc ggaacctgg aagctgtatg	2220
	ccacagtgg cctgtgtg ggcatggatg tctcactct cgcatctgg cagatcgtg	2280
	acctctgca ccggaccatt gagacattg ccaaggagga acctaaggaa gatattgacg	2340
25	tctctattct gcccagctg gagcattgca gctccaggaa gatgaataca tggcttgga	2400
	tttctatgg ttacaaggg ctgtgtgtc tctgtggaat ctctctgtc tatgagacca	2460
	agagtgtgt cactgagaag atcaatgat accgggctgt ggcatggct atctacaatg	2520
	tggcagtct gtgcctcatc actgtctg tcaccatgat tctgtccagc cagcaggatg	2580

ES 2 625 660 T3

cagcctttgc cttgcctct ctgccatag tttctctc ctatatcact ctgttgtgc 2640

tctttgtgcc caagatgcgc aggctgatca cccgagggga atggcagtcg gaggcgcagg 2700

acaccatgaa gacagggta tcgaccaaca acaacgagga ggagaagtcc cggctgttg 2760

agaaggagaa ccgtgaactg gaaaagatca ttgctgagaa agaggagcgt gtctctgaac 2820

5 tgcgccatca actccagtct cggcagcagc tccgtcccg gcgccacca ccgacacccc 2880

cagaaccctc tgggggcctg cccaggggac cccctgagcc ccccgaccgg cttagctgtg 2940

atgggagtcg agtgcatctt ctttataagt gagggtaggg tgaggagga caggccagta 3000

gggggagga aaggagagg ggaaggcag gggactcagg aagcagggg tcccatccc 3060

cagctgggaa gaacatgcta tccaatctca tcttgttaa atacatgtcc cctgtgagt 3120

10 tctgggctga tttgggtctc tcatacctct gggaaacaga ccttttctc tctactgtc 3180

tcataaatt ttgtatcacc tctcacaat ttagttcgta cctggctga agctgtcac 3240

tgctcacag ctgcctctc agcagcctca ctgcatctt ctctccat gcaacacct 3300

cttctagta ccacggcaac cctgcagct cctctgctt tgtgtctgt tctgtccag 3360

caggggtctc ccaacaagt ctcttcac ccaaagggg cctctctt tctcactgt 3420

15 cataatctct ttccatctta ctgcccctc tatacttct cacatgtggc tcccctgaa 3480

tttgcttcc tttgggagct cattcttct gccaaaggct acatgtctct tgcctctgt 3540

ctgtgcactc acgtcagca cacatgcatc ctcccctctc ctgctgtgc cactgaaca 3600

tgctcatgtg tacacagct tttccgtat gcttcttca tttcagta catgtgtct 3660

cgggtgcct gcattcacag ctacgtgtc cctctcatg gcatgggtc tgccttgag 3720

20 cgtgtttggg taggcagtgt caatttgtct agcatgtga gcatgtct tctatttgc 3780

acacgtccat gttatccat gtacttccc tgtgtaccct ccatgtacct tgtgtactt 3840

cttccctaa atcatggtat tctctgaca gagccatag taccctacc tgcacattgt 3900

tatgcactt tcccaattc atgtttgtg gggccatcca caccctctc ttgtcacaga 3960

atctccattt ctgctcagat tcccccatc tccattgcat tcatgtacta cctcagtct 4020

25 aactcaciaa tcactctct ccaagactgc tccctttgt tttgtttt ttgagggga 4080

attaaggaaa aataagttgg ggcagggttg gagagctgt tccagtggat agttgatgag 4140

aatctgacc aaaggaaggc accctgact gttgggatag acagatggac ctatggggtg 4200

ggagtggtg tcccttctac actgtgtgt ctctgggga aggatctccc cgaatctca 4260

ES 2 625 660 T3

taaaccagtg aacagtgtga ctcgcaaaa aaaaaaa 4297

(SEQ ID NO: 5)

En otra realización, la subunidad B1 del receptor GABA_B es codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene la secuencia:

5	ccctcttcc ccccgccct gccttcctt gcaccctct tcttcctcc gcccgggagc	60
	tctccctgt ccccgcgcc gccttcctc ctccggctc cccgctccc gctccgtgg	120
	ctgccgccg cccggggaag aagagacagg ggtggggtt gggggaagcg agagaggagg	180
	ggagagaccc tggccaggct ggagcctgga ttcgaggga ggagggacgg gaggaggaga	240
	aagggtggagg agaaggagg ggggagcggg gaggagcggc cgggcctggg gccttgaggc	300
10	ccggggagag ccggggagcc gggccgcgc gccgagatgt tgctgtgct gctactggcg	360
	ccactcttc tccgcccc gggcgcggg ggggcgcaga ccccaacgc cacctcagaa	420
	ggttgccaga tcatacccc gccctgggaa gggggcatca ggtaccgggg cctgactcgg	480
	gaccaggta aggctatcaa ctctctcca gtggactatg agattgagta tgtgtgccg	540
	ggggagcgc aggtggtgg gcccaagtc cgcaagtgc tggccaacgg ctctggaca	600
15	gatattgaca caccagccg ctgtgtgaat cgaacgccac actcagaac gcgcgcagt	660
	tacatcggg cactgttcc catgagcgg ggctggccag ggggccaggc ctgccagccc	720
	gcggtggaga tggcgtgga ggacgtgaat agccgcagg acatcctgcc ggactatgag	780
	ctcaagctca tccaccaga cagcaagtgt gatccaggcc aagccacaa gtacctatat	840
	gagctgctc acaacgacc tatcaagatc atccttatgc ctggctgcag ctctgtctc	900
20	acgtggtgg ctgaggctgc taggatgtgg aacctcattg tgcttcta tggctccagc	960
	tcaccagccc tgtcaaacc gcagcgttc ccactttc tccgaacga cccatcagcc	1020
	acactccaca accctaccg cgtgaaactc ttgaaaagt ggggctgga gaagattgct	1080
	accatccagc agaccactga ggtcttact tcgactctgg acgacctga ggaacgagt	1140
	aaggaggctg gaattgagat tacttccgc cagagttct ttcagatcc agctgtgcc	1200
25	gtcaaaaacc tgaagcga ggatgcccga atcatcgtg gactttcta tgagactgaa	1260
	gcccggaaag tttttgtga ggtgtacaag gagcgtctt ttggaagaa gtacgtctg	1320
	ttctcattg ggtggtatg tgacaattg ttcaagatc acgaccttc tatcaactgc	1380
	acagtggatg agatgactga ggcggtggag ggccacatca caactgagat tgtcatgctg	1440
	aatcctgcca ataccgcag cattccaac atgacatccc aggaattgt ggagaaacta	1500

ES 2 625 660 T3

accaagcgac tgaagagaca cctgaggag acaggaggct tccaggaggc accgctggcc 1560
 tatgatgcc a tctggcctt ggcactggcc ctgaacaaga catctggagg aggcggccgt 1620
 tctggtgtg gcctggagga ctcaactac aacaaccaga ccattaccga ccaaattac 1680
 cgggcaatga actcttcgtc cttgagggt gtctctggcc atgtggtgt tgatgccagc 1740
 5 ggctctcga tggcatggac gctatcgag cagcttcagg gtggcagcta caagaagatt 1800
 ggctactatg acagcaccaa ggaatgatt tctgtgtcca aaacagataa atggattgga 1860
 gggcccccc cagctgacca gacctgtg atcaagacat tccgttcct gtcacagaaa 1920
 ctctttatc cgtctcagt tctctccagc ctgggcattg tctagctgt tctctgtctg 1980
 tctttaaca tctacaactc acatgtccgt tatatccaga actcacagcc caacctgaac 2040
 10 aacctgactg ctgtgggctg ctactggct ttactgtctg tctccccct ggggctcgt 2100
 ggttaccaca ttgggaggaa ccagtttct ttgtctgcc agggccgct ctggctcctg 2160
 ggctgggct ttactgtgg ctacggtcc atgtcacca agatttgtg ggtccacag 2220
 gtcttcaaa agaaggaaga aaagaaggag tggaggaaga ctctggaacc ctggaagctg 2280
 tatgccacag tgggctgtg ggtgggcatg gatgtctca ctctgccat ctggcagatc 2340
 15 gtggacctc tgcaccggac cattagaca ttgccaagg aggaacctaa ggaagatatt 2400
 gacgtctcta ttctgcccc gctggagcat tgcagctcca ggaagatgaa tacatggctt 2460
 ggcatctt atgtgtaca ggggctgtg ctgtgtctg gaatttct tcttatgag 2520
 accaagagtg tgcactga gaagatcaat gatcaccggg ctgtggcat ggctatctac 2580
 aatgtggcag tctgtgct catcactgt cctgtacca tgattctgt cagccagcag 2640
 20 gatgcagct ttgctttgc ctctctgc atagtttct cctctatat cactctgtt 2700
 gtgtctttg tgccaagat ggcaggctg atcaccgag ggaatggca gtcggaggcg 2760
 caggacacca tgaagacagg gtcactgacc aacaacaac agggaggaga gtcccggctg 2820
 ttggagaagg agaaccgtga actgaaaag atcattgtg agaaagagga gcgtgtctt 2880
 gaactgcgc atcaactcca gtctggcag cagctccgt cccggcgcca cccaccgaca 2940
 25 cccccagaa cctctgggg cctgccagg ggacccctg agcccccca ccgcttagc 3000
 tgtgatggga gtcgagtga ttgtttat aagtgggtt aggtgaggg aggcaggcc 3060
 agtaggggga gggaaaggga gaggggaagg gcaggggact caggaagcag ggggtccca 3120
 tcccagctg ggaagaacat gctatcaat ctcatctt gtaatacat gtcccctgt 3180

gagttctggg ctgattggg tctctcatc ctctgggaaa cagacctttt tctctcttac 3240

tgcttcattg aattttgtat cacctcttca caatttagtt cgtacctggc tgaagctgc 3300

tcactgctca cacgctgcct cctcagcagc ctactgcat ctttctctc ccatgcaaca 3360

ccctcttcta gttaccacgg caacccctgc agctcctctg cctttgtgct ctgttcctgt 3420

5 ccagcagggg tctccaaca agtgctcttt ccaccccaaa ggggcctctc cttttctcca 3480

ctgcataat ctctttccat ctacttgcc ctctatact ttctcacatg tggctcccc 3540

tgaatttgc ttctttggg agctcattct ttctgccaag gtcacatgc tcctgcctc 3600

tgctctgtgc actcacgctc agcacacatg catcctcccc tctctgcgt gtgcccactg 3660

aacatgctca tggtagaca cgcttttccc gtagctttc ttcatgttca gtcacatgtg 3720

10 ctctcgggtg cctgcattc acagctacgt gtgcccctct catggtcatg ggtctgcct 3780

tgagcgtgtt tgggtaggca tgtcaattt gtctagcatg ctgagtcag tcttctctat 3840

ttgcacacgt ccatgtttat ccatgtactt tccctgtga ccttccatg acctgtgta 3900

ctttcttccc ttaaatcatg gtattctct gacagagcca tatgtaccct acctgcaca 3960

ttgttatgca cttttccca attcatgttt ggtggggcca tccacaccct ctctgtgca 4020

15 cagaatctcc atttctgctc agattcccc catctccatt gcattcatgt actaccctca 4080

gtctacactc acaatcatct tctccaaga ctgctccctt ttgtttgtg ttttttgag 4140

gggaattaag gaaaaataag tgggggcagg ttggagagc tgctccagt ggatagtga 4200

tgagaatcct gaccaaagga aggcaccctt gactgttggg atagacagat ggacctatgg 4260

ggtgggaggt ggtgtccctt tcactctgtg gtgtctctg gggaaggatc tccccgaatc 4320

20 tcaataaacc agtgaacagt gtgactcggc aaaaaaaaaa a 4361

(SEQ ID NO: 6)

25 En otra realización, la subunidad B1 es codificada por una molécula de nucleótidos que es un homólogo de SEQ ID NOs: 4, 5 ó 6. En otra realización, la molécula de nucleótidos es una variante de SEQ ID NOs: 4, 5 ó 6. En otra realización, la molécula de nucleótidos es un isómero de SEQ ID NOs: 4, 5 ó 6. En otra realización, la molécula de nucleótidos es un fragmento de SEQ ID NOs: 4, 5 ó 6. En otra realización, la molécula de nucleótidos comprende las SEQ ID NOs: 4, 5 ó 6.

El epítipo reconocido por un anticuerpo detectado por un método de la presente invención es, en otra realización, un epítipo conformacional. En otra realización, el epítipo es un epítipo lineal. En otra realización, el epítipo es cualquier otro tipo de epítipo conocido en la técnica.

30 En una realización, la expresión ectópica de la subunidad B1 por el tejido nervioso contenido en el teratomas contribuye a romper la tolerancia inmune. En otra realización, una combinación de factores tales como un efecto adyuvante de la enfermedad viral-prodrómica que se produce en la mayoría de los sujetos, y una predisposición

genética en determinadas realizaciones, desempeñan papeles adicionales en la iniciación de la respuesta inmune sometida a ensayo en cuanto a utilizar los métodos de diagnóstico descritos en esta memoria.

En una realización, un papel patogénico de anticuerpos B1 en la encefalitis anti-GABA_B paraneoplásica se muestra por la correlación entre los síntomas de los pacientes y los títulos de anticuerpos.

5 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 en la superficie celular de una neurona. En otra realización, los pacientes con anticuerpos contra antígenos extracelulares exhiben, en las condiciones utilizadas en esta memoria, una capacidad de respuesta potenciada a la terapia inmune.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar la encefalitis autoinmune en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de someter a ensayo una muestra biológica del sujeto en cuanto a un anticuerpo contra la subunidad B1 de un receptor GABA_B, en donde la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica indica una encefalitis autoinmune.

15 En otra realización, la presente invención proporciona un método de diagnosticar un tumor asociado con una encefalitis autoinmune en un sujeto, comprendiendo el método someter a ensayo una muestra biológica del sujeto en cuanto a un anticuerpo contra la subunidad B1 de un receptor GABA_B, en donde la presencia de dicho anticuerpo indica la presencia de un tumor oculto en dicho sujeto y en donde dicho tumor es una causa de dicha encefalitis autoinmune.

20 En otra realización, la presente invención proporciona un método de diagnosticar un tumor que provoca epilepsia en un sujeto, comprendiendo el método someter a ensayo una muestra biológica del sujeto en cuanto a la presencia de un anticuerpo contra la subunidad B1 de un receptor GABA_B, en donde la presencia de dicho anticuerpo indica la presencia de un tumor en dicho sujeto y en donde dicho tumor es una causa de dicha epilepsia.

25 La solicitud describe un método de diagnosticar un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia, que comprende la etapa de: obtener una muestra biológica del sujeto; y someter a ensayo la muestra biológica del sujeto en cuanto a la presencia de un anticuerpo contra la subunidad B1 de un receptor GABA_B, en donde la presencia de dicho anticuerpo indica la presencia de un tumor en dicho sujeto, diagnosticando con ello un tumor en un sujeto que tiene una epilepsia.

30 La presente solicitud describe también un método de tratar una encefalitis autoinmune en un sujeto, que comprende las etapas de: detectar un tumor asociado con una encefalitis autoinmune sometiendo a ensayo un fluido corporal del sujeto en cuanto a un anticuerpo con respecto a la subunidad B1 de un receptor GABA_B, en donde una presencia de dicho anticuerpo indica una presencia de dicho tumor en dicho sujeto y que dicho tumor es una causa de dicha encefalitis autoinmune; y tratar dicho tumor. El tumor puede ser tratado dentro de los cuatro meses de la aparición de un síntoma asociado con la encefalitis autoinmune.

35 Métodos para someter a ensayo una reactividad de un fluido corporal contra antígenos neuronales son bien conocidos en la técnica. En una realización, el ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA) se utiliza para someter a ensayo la presencia de un anticuerpo. En otra realización, la inmunoprecipitación se utiliza para someter a ensayo la presencia de un anticuerpo. En otra realización, la inmunoprecipitación se utiliza para someter a ensayo la presencia de un anticuerpo. En otra realización, se utiliza uno de los métodos enumerados en esta memoria. En otra realización, el tejido neuronal se fija con PFA. En otra realización, se utiliza cualquier otro método conocido en la técnica.

40 Métodos y kits para la detección de anticuerpos son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Ances BM et al (Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. Brain 2005;128:1764-1777) y Vitaliani et al (Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma. Ann Neurol 2005;58:594-604.).

45 Métodos para diagnosticar encefalitis límbica (LE) son bien conocidos en la técnica. En otra realización, los pacientes con LE desarrollan confusión sub-aguda, irritabilidad, depresión, trastornos del sueño, convulsiones, pérdida de la memoria a corto plazo y/o demencia. En otra realización, el sustrato patológico de la LE es un trastorno inflamatorio que implica predominantemente el sistema límbico (hipocampus, amígdala y giro cingulado). En otra

realización, estudios de biopsia y autopsia demuestran infiltrados intersticiales y perivasculares de células T y, con menos frecuencia, de células B, junto con la activación microglial, la degeneración neuronal y/o gliosis. En otra realización, los infiltrados inflamatorios se encuentran en zonas distantes del sistema límbico. En otra realización, los infiltrados siguen siendo suaves y clínicamente silenciosos. En otra realización, los infiltrados se vuelven prominentes y se convierten en un trastorno conocido como encefalomiелitis. Se describen métodos adicionales de diagnosticar LE, por ejemplo, en Gultekin SH et al (Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. Brain 2000;123:1481-1494).

Los términos "homología", "homólogo", etc., cuando se usan en referencia a cualquier proteína o péptido, se refieren, en una realización, a un porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de homología, y no considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de la secuencia. Métodos y programas de ordenador para la alineación son bien conocidos en la técnica.

La homología se determina, en otra realización, por el algoritmo de ordenador para la alineación de secuencias, por métodos bien descritos en la técnica. Por ejemplo, el análisis de algoritmo informático de homología de secuencias de ácidos nucleicos puede incluir la utilización de cualquier número de paquetes de software disponibles tales como, por ejemplo, los paquetes BLAST, DOMAIN, BEAUTY (siglas inglesas de BLAST Enhances Alignment Utility), GENPEPT y TREMBL.

En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-6 mayor que 70%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-6 mayor que 72%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad de una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 75%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-6 mayor que 78%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad de una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 80%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad de una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 82%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad de una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 83%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad de una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 85%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad de una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 87%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1-6 mayor que 88%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 90%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 92%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 93%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 95%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 96%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 97%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 98%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 mayor que 99%. En otra realización, "homología" se refiere a la identidad con una de las SEQ ID NO: 1-6 de 100%.

En otra realización, la homología se determina mediante la determinación de la hibridación de la secuencia candidato, cuyos métodos se describen bien en la técnica (véase, por ejemplo, , "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., Comps. (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 and Wiley Interscience, N.Y). En otras realizaciones, los métodos de hibridación se llevan a cabo bajo condiciones de moderadas a rigurosas, con el complemento de un ADN que codifica un péptido caspasa nativo. Siendo las condiciones de hibridación, por ejemplo, la incubación durante una noche a 42 °C en una disolución que comprende: 10-20% de formamida, 5 X SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución 5 X Denhardt, 10% sulfato de dextrano y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado, desnaturalizado.

La homología de la proteína y/o péptido de para cualquier secuencia de aminoácidos enumerada en esta memoria se determina, en otra realización, por métodos bien descritos en la técnica, incluyendo análisis de inmunotransferencia, o por medio de análisis de algoritmo por ordenador de secuencias de aminoácidos, utilizando cualquiera de un cierto 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, emplean el uso de los algoritmos de Smith y Waterman, y/o alineaciones globales/locales o BLOCKS para el análisis, por ejemplo.

[001] Tal como se utiliza en esta memoria, "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. La expresión o el término incluye, en una realización, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en una realización, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. ARN está, en una realización, en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN anti-sentido, ARN inhibidor pequeño (ARNip), microARN (miARN) y ribozimas. El uso de ARNip y miARN se ha descrito (Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96, y las referencias citadas en el mismo). ADN puede estar, en otras realizaciones, en forma de ADN plasmídico, ADN viral, ADN lineal o ADN cromosómico, o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden ser de cadena sencilla, doble, triple o cuádruple. El término también incluye, en otra realización, ácidos nucleicos artificiales que contienen otros tipos de cadenas principales, pero las mismas bases. En una realización, el ácido nucleico artificial es un ANP (ácido nucleico peptídico). El ANP contiene cadenas principales peptídicas y bases de nucleótidos y son capaces de unirse, en una realización, tanto a moléculas de ADN como de ARN. En otra realización, el nucleótido es oxetano modificado. En otra realización, el nucleótido es modificado por sustitución de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra realización, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la cadena principal de fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos fosforotioato y ANP son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen en, por ejemplo, en 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 se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook y Russell, comps. y Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio y G. C. Fareed.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: El Receptor GABA_B es un Nuevo Auto-antígeno de Encefalitis Límbica Grave con Convulsiones Prominentes

Materiales y Métodos

Pacientes y Controles. Los autores de la presente solicitud estudiaron 410 pacientes de encefalitis de la que se sospechaba que era paraneoplásica o estaba inmuno-mediada contra antígenos de la superficie de células neuronales. Los anticuerpos fueron identificados en 357: 275 tenían anticuerpos contra la subunidad NR1 del NMDAR, 27 canales de potasio sincronizados en tensión (VGKC), 19 ácido glutámico descarboxilasa (GAD), 15 subunidades GluR1/2 del AMPAR, 11 MA2, 8 HUD y 2 contra CRMP5. De los 53 pacientes restantes, 15 tenían suero o anticuerpos CSF contra los antígenos de la superficie de células neuronales predominantemente visibles en el neuropilo de cerebro de rata, mostrando todos una inmunotinción similar. Estas características y la respuesta drástica al tratamiento del caso índice (paciente nº 1) se centraron en el estudio actual en estos 15 pacientes. La información se obtuvo de los autores o fue proporcionada por los médicos tratantes. CSF o suero de 104 pacientes, incluidos 91 seleccionados al azar de los anteriores y 13 con síndromes asociados con el anticuerpo GAD sirvieron como controles.

Tejido animal, anticuerpos e inmunohistoquímica en el cerebro de rata. Ratas Wistar hembras fueron sacrificadas y se les extrajo el cerebro, se seccionaron sagitalmente, se sumergieron en paraformaldehído al 4% a 4°C durante 2 horas, se crioprecipitaron con sacarosa al 40% durante 24 horas, y se congelaron rápidamente en isopentano enfriado rápidamente.

Inmunohistoquímica en el cerebro de rata y tejido humano. Tejido embebido en parafina se desparafinó y los antígenos se recuperaron. Secciones de tejido de siete micrómetros de espesor (o 4 µm de parafina) congelados se incubaron en serie con H₂O₂ al 0,3% durante 20 minutos, suero de cabra al 10% durante 1 hora, y suero de paciente o control (1:250), CSF (1:10) o un anticuerpo policlonal de cobaya contra un epítipo intracelular del receptor GABA_B (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA) a 4°C durante la noche. Después de utilizar los anticuerpos secundarios apropiados (todos 1:2.000), las reactividades fueron desarrolladas con el método de avidina-biotina-peroxidasa. Los resultados se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia utilizando el software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY).

La inmunohistoquímica con tejido humano (tumores SCLC) utilizó IgG purificada a partir de sueros de los pacientes y se marcó con biotina. En estos estudios no se necesitaba anticuerpo secundario, evitando el fondo provocado por IgG humana irrelevante presente en el tejido.

La inmunohistoquímica en secciones congeladas de cerebro de rata se realizó con suero de pacientes o control (1:250), CSF (1:10), o anticuerpo GABA_{B1} utilizando un método estándar de avidina-biotina peroxidasa, o doble inmunomarcaje con suero de los pacientes o CSF y el anticuerpo GABA_{B1}, seguido de los anticuerpos secundarios Alexa Fluor apropiados.

- 5 ***Inmunocitoquímica en cultivos neuronales y células HEK293.*** Se prepararon cultivos neuronales de hipocampo de rata. Neuronas vivas cultivadas en cubreobjetos se incubaron durante 1 hora a 37°C con suero del paciente o control (dilución final 1:200) o CSF (1:10). Después de retirar los medios y de un extenso lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las neuronas se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y se inmuno-marcaron una o dos veces con un anticuerpo receptor GABA_{B1} policlonal de cobaya (1:200), seguido por los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa Fluor diluidos en la relación 1:2000 (Molecular Probes, Eugene, OR). Los resultados se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia utilizando el software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY).

- 15 Células HEK293 se transfectaron con plásmidos que contenían subunidades GABA_{B1} o GABA_{B2} de roedores del receptor GABA_B o plásmidos sin inserción (control), utilizando un método previamente reseñado. En otros experimentos, las células se co-transfectaron con GABA_{B1} y GABA_{B2} en relaciones equimolares. Las células fueron cultivadas durante 24 horas después de la transfección antes de la evaluación. Las células transfectadas se fijaron en paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% y después se incubaron con suero de los pacientes (1:200) o CSF (100%) y el anticuerpo policlonal del receptor GABA_{B1} de cobaya indicado (1:20.000) o un anticuerpo policlonal del receptor GABA_{B2} (1:10.000, generada por el Dr. Moss) durante la noche a 4°C, se lavaron en PBS y se incubaron con los anticuerpos Alexa Fluor secundarios apropiados (1:2.000; Molecular Probes). Los resultados se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia utilizando el software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY).

Los títulos de anticuerpos se determinaron utilizando células HEK293 que expresan GABA_{B1/B2} incubadas con diluciones en serie de suero y CSF, comenzando a una dilución de 1/2.

- 25 Subtipos de IgG de anticuerpos de pacientes se determinaron en suero o CSF utilizando las células HEK293 transfectadas indicadas, y anticuerpos anti-humanos secundarios contra IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (todos diluidos en la relación 1:200; Sigma, St. Louis, MO) tal como se reseñó.

- 30 ***Inmunoprecipitación e inmunotransferencia.*** Neuronas vivas, obtenidas como antes, se cultivaron en pocillos de 100 mm (densidad 10⁶ neuronas/pocillo) y se incubaron a 37°C con suero de paciente filtrada (diluido en la relación 1:500) durante 1 hora. A continuación, las neuronas se lavaron con PBS, se lisaron con tampón (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, tris(hidroximetil)aminometano [Tris]-HCl 100 mM, ácido desoxicolato al 0,5%, Triton X-100 al 1% [Laboratorios de Sigma., St. Louis, MO], pH 7,5) que contiene inhibidores de proteasa (P8340, Laboratorios de Sigma), y se centrifugó a 16,1 x 10³ g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se retuvo y se incubó con perlas de proteína A/G agarosa (20423; Pierce, Rockford, IL) durante la noche a 4°C, se centrifugó, y luego se lavó el sedimento que contenía las perlas con anticuerpos de los pacientes unidos al antígeno de la superficie de la célula diana con PBS, se dividió en partes alícuotas y se mantuvo a -80°C. Una parte alícuota de este sedimento se resuspendió en tampón de Laemmli, se hirvió durante 10 minutos, se separó en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 4 a 15%, y las proteínas visualizaron con tinción con gel EZBlue (G1041; Laboratorios de Sigma). Bandas de proteínas distintivas precipitadas por el suero del paciente se escindieron del gel y se analizaron utilizando espectrometría de masas en la instalación proteómica de la Universidad de Pennsylvania. Después de la caracterización del antígeno, partes alícuotas congeladas de los sedimentos indicados se separaron en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio como se ha descrito anteriormente, se transfirieron a nitrocelulosa (162-0115; Bio-Rad, Hercules, CA) y se transfirieron con los anticuerpos policlones indicados contra subunidades del receptor GABA_{B1} (1:2000) o GABA_{B2} (1:1000). La reactividad se desarrolló utilizando los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados (1:2000) y el método de avidina-biotina-peroxidasa, diaminobencidina.

- 50 ***Análisis cuantitativo de racimos del receptor GABA_B utilizando microscopía confocal.*** Neuronas del hipocampo de rata vivas de catorce a 21 días in vitro (div) fueron incubadas con el CSF de pacientes (dilución 1:30 en medio Neuro-Basal B27; Gibco, Carlsbad, CA) durante 24 horas, se lavaron, se fijaron en paraformaldehído (paraformaldehído al 4%, sacarosa al 4% en PBS) durante 5 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,25% durante 10 minutos y se bloquearon con suero de cabra normal al 5% durante 1 hora. Las neuronas se incubaron a continuación con un anticuerpo policlonal de cobaya contra un epitopo intracelular del receptor GABA_B (1:1000; Invitrogen) y un anticuerpo monoclonal de ratón contra el marcador presináptico Bassoon (1:200; Stressgen,

Victoria, Columbia Británica, Canadá), se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados de forma fluorescente apropiados (1:1000, Molecular Probes).

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de escaneo láser confocal (Leica TCS SP2; Leica, Deerfield, IL). Para cada una de las imágenes, los niveles de luz láser y la ganancia del detector y el desplazamiento se ajustaron de manera que no se saturaran valores de los píxeles. Imágenes de neuronas marcadas se almacenaron digitalmente para su posterior análisis. Las imágenes fueron umbralizadas, se seleccionaron las áreas de interés que contenían dendritas, y se determinó el número de racimos individuales a lo largo de las dendritas neuronales utilizando software interactivo (ImageJ; Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). La co-localización de racimos marcados con los anticuerpos de pacientes, anticuerpos comerciales GABA_B y el marcador sináptico Bassoon se cuantificó utilizando un software Macro implementado en ImageJ.

Resultados

Paciente Índice (Caso nº 1 en las tablas): Una mujer de 60 años de edad fue hospitalizada debido a confusión, problemas de memoria y la nueva aparición generalizadas convulsiones tónico-clónicas y complejas parciales refractarias al tratamiento. En el examen, se encontraba desorientada en cuanto al lugar y la hora, y tenía muy mala concentración y memoria a corto plazo. Aparte de actividades sacádicas con una mirada lateral, no se observaron anomalías en los nervios craneales. Fuerza, sensibilidad, reflejos y coordinación eran normales. La MRI del cerebro reveló una señal incrementada de la recuperación de inversión atenuada de fluido (FLAIR) del lóbulo temporal medial bilateral compatible con la encefalitis límbica (Figura 1a). El EEG mostró una ralentización difusa y descargas epileptiformes bilaterales periódicas lateralizadas (PLEDS). El CSF demostró 9 leucocitos (WBC)/ μ l, concentración total de proteínas 35 mg/dL, glucosa, 71 mg/dL y bandas oligoclonales y citología negativas. La PCR para el virus herpes simplex, el virus del Nilo Occidental y la encefalitis de St. Louis fueron negativos. Se observó una hiponatremia (119 mEq/L) debida al síndrome de una secreción inapropiada de la hormona antidiurética (SIADH). El análisis del suero y el LCR de anticuerpos paraneoplásicos eran negativos. CT y fluorodeoxiglucosa (FDG)-PET combinado reveló linfadenopatías mediastínicas, que demostraron por biopsia ser cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). La paciente fue tratada con antiepilépticos (levetiracetam, ácido valproico, fenitoína) e inmunoterapia (inmunoglobulinas intravenosas [IVIg], corticosteroides), seguido inmediatamente por la quimioterapia con cisplatino y etopósido. Hubo una mejora rápida y drástica de la memoria a corto plazo y la cognición, y las convulsiones se resolvieron por completo. Después de la compleción de estos tratamientos, el paciente recibió radioterapia total del cerebro profiláctica estándar. La MRI del cerebro repetida un mes después de la presentación de los síntomas mostró una mejoría de la señal FLAIR anormal (Figura 1b); MRIs posteriores 3 y 9 meses más tarde se mantuvieron sin cambios, excepto por la atrofia general progresiva, probablemente secundarios a la radiación (Figura 1c, d). Un año después de la presentación de los síntomas, el paciente tenía sólo leves déficits de memoria y cognitivos y vivía de forma independiente.

Detección de anticuerpos contra un nuevo auto-antígeno neuronal de la superficie celular. Análisis de suero y CSF del caso índice y 14 pacientes adicionales de la selección indicada de los casos mostró reactividad con el neuropilo de cerebro de rata (Figura 2), en un patrón diferente de la descrita con la subunidad NR1 del NMDAR, subunidades GluR1/2 del AMPAR, o anticuerpos VGKC. Para determinar si los anticuerpos reaccionaban con epítomos extracelulares, cultivos no fijados y no permeabilizados de neuronas del hipocampo de rata se incubaron con suero o CSF de los pacientes, mostrando una reactividad intensa con la superficie celular (Figura 3a).

El antígeno de la superficie de la célula neuronal es el receptor GABA_B metabotrópico. Para identificar el antígeno de la superficie celular, neuronas del hipocampo de rata vivas fueron incubadas con anticuerpos de los pacientes y se inmunoprecipitó el antígeno diana. Estos estudios produjeron dos bandas de proteínas de aproximadamente 105 y 90 kDa (Figura 3b) que se analizaron por espectrometría de masas demostrando secuencias derivadas de la subunidad B1 del receptor GABA_B metabotrópico. Debido a que el receptor GABA_B es un heterodímero compuesto por dos subunidades, B1 y B2, ambas con un peso molecular similar, los autores de la invención examinaron seguidamente por inmunotransferencia y anticuerpos policlonales específicos para cada una de las subunidades para determinar si los anticuerpos de los pacientes habían precipitado ambas subunidades. Estos estudios confirmaron que los anticuerpos de pacientes co-precipitaban subunidades B1 y B2 del receptor GABA_B (Figura 3c).

La especificidad de los anticuerpos de pacientes para los receptores GABA_B se determinó por el triple inmunomarcaje de neuronas cultivadas (anticuerpos del paciente; un anticuerpo policlonal de cobaya a un epítipo del receptor GABA_{B1} intracelular no competidor, y un marcador de pre-sináptico [Bassoon]), y el grado de co-localización cuantificado por microscopía confocal, tal como se informó (Figura 4). La unión de anticuerpos a racimos de

receptores GABA_B se analizó en las dendritas de 24 neuronas en 4 cubreobjetos separados. Esto mostró que 103±0,8% de los racimos de receptores GABA_B marcados con anticuerpos de pacientes se co-localizaban con racimos marcados por el anticuerpo policlonal del receptor GABA_B de cobaya, y 107±0,7% de los racimos de receptores marcados con anticuerpos de cobaya se co-localizaban con los marcados por los anticuerpos de los

- 5 pacientes anticuerpos (se producen cifras ligeramente superiores a 100% debido al solapamiento de unos pocos racimos marcados por los anticuerpos de pacientes con dos racimos marcados por los anticuerpos de cobaya y viceversa). Estos resultados indican que esencialmente todos los anticuerpos de la superficie celular anti-neuronales de pacientes fijan como objetivo los receptores GABA_B y que virtualmente todos los receptores GABA_B neuronales son marcados por los anticuerpos de los pacientes.
- 10 Para determinar cuál de las dos subunidades del receptor GABA_B contenía el epítipo diana, células HEK293 se transfectaron con GABA_{B1}, GABA_{B2}, o ambas subunidades del receptor y se sometieron a ensayo inmunocitoquímicamente con anticuerpos de los pacientes. Todos los 15 pacientes tenían anticuerpos de suero o CSF que reaccionaban específicamente con la subunidad del receptor GABA_{B1} (Figura 5) y uno tenía reactividad
- 15 adicional con la subunidad GABA_{B2}. Estos hallazgos indican que las células HEK293 que expresan subunidades del receptor GABA_{B1/B2} o GABA_{B1} proporcionan un sustrato para una prueba de diagnóstico inequívoca. Estudios similares con los 104 casos de control demostraron que dos pacientes, ambos con síndromes atribuidos a autoinmunidad GAD, tenían anticuerpos contra el receptor GABA_{B1} en títulos bajos (CSF 1:2, suero negativo), no visibles con la inmunohistoquímica del cerebro.

- 20 Se realizó un análisis de los subtipos de anticuerpos IgG en suero o CSF de 6 pacientes seleccionados al azar. Todos tenían anticuerpos IgG1 GABA_{B1}; dos tenían IgG3 adicional y uno anticuerpos IgG2.

- Síntomas neurológicos.** La información demográfica, características clínicas, el tratamiento y los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2. Entre los 15 pacientes con alto título de anticuerpos del receptor GABA_{B1} y encefalitis límbica (casos n° 1-15), la edad mediana era de 62 años (intervalo, 24-75); 8 eran hombres. Trece pacientes
- 25 presentaron una aparición sub-aguda de convulsiones, confusión y pérdida de memoria grave, y en dos (n°s 3 y 13) el déficit de memoria y confusión precedieron a las convulsiones en unas pocas semanas. La mayoría de las convulsiones tenían un inicio del lóbulo temporal con generalización secundaria, y tres pacientes tenían un estado epiléptico. Diez pacientes tenían una señal incrementada de FLAIR/T2 unilateral o bilateral del lóbulo temporal medial consistente con la encefalitis límbica, 1 tenía una pequeña zona de señal FLAIR incrementada en el cuerpo calloso y 4 tenían una MRI normal del cerebro. El CSF era anormal en 9 de 10 pacientes de los que se disponía de
- 30 datos. La anomalía más común era la pleocitosis linfocítica en 8 pacientes. Estaban disponibles estudios de EEG de 12 pacientes; 9 mostraron convulsiones del lóbulo temporal, descargas epileptiformes o ralentización del lóbulo temporal; 2 tenían una ralentización generalizada y 1 era normal. Varios tipos de convulsiones se observaron en el EEG, incluyendo convulsiones parciales complejas (con frecuencia de aparición del lóbulo temporal), estado epiléptico y convulsiones sub-clínicas.
- 35 Los dos casos control con un título bajo de anticuerpos GABA_{B1} (casos n°s 16 y 17 en las Tablas 1 y 2) desarrollaron diferentes síndromes en asociación con anticuerpos GAD de alto título en el suero y el CSF. Ninguno de estos 2 pacientes desarrolló convulsiones o disfunción límbica. Uno tenía ataxia cerebelosa progresiva, y el otro inestabilidad de la marcha, rigidez muscular, rigidez, mioclonos y disartria, categorizados como encefalomiелitis con rigidez.

- 40 Tabla 1: Características demográficas y síntomas

Caso N°.	Sexo/Edad (años)	Tumor	Síntomas que Presentan	Otros rasgos clínico-inmunológicos
08-299	F/60	SCLC	Aparición sub-aguda de convulsiones parciales complejas, confusión, deterioro de la memoria	SIADH

06-165	M/66	SCLC	Aparición sub-aguda de convulsiones parciales complejas, confusión, déficit de memoria, problemas de comportamiento	Anticuerpos VGCC de tipo N
06-235	F/53	SCLC	Déficits de memoria rápidamente progresivos, hábitos anormales de sueño, seguidos de convulsiones frecuentes (focales, secundariamente generalizadas), confusión, disminución del estado mental que conduce a coma	Erupción prurítica con debilidad inicial
08-017	M/75	Adenopatía mediastinal	Aparición sub-aguda de convulsiones, psicosis, encefalitis. Progresan rápidamente a la muerte antes de un diagnóstico o tratamiento definitivo.	Estado respiratorio deficiente, entubación rechazada
08-152	M/68	Tumor neuroendocrino del pulmón	Aparición sub-aguda de convulsiones, estado epiléptico, confusión	-
08-623	F/43	CT y FDG/PET negativo	Aparición sub-aguda de convulsiones tónico-clónicas secundariamente generalizadas, comportamientos bizarros, delirios, paranoia, deterioro de la memoria.	Anticuerpos VGCC de tipo N
09-086	M/69	CT y FDG/PET negativo	Aparición sub-aguda de convulsiones del lóbulo temporal derecho, estado epiléptico, encefalopatía grave, déficit de memoria grave, confusión	Historial previo de trastorno bipolar
07-305	F/24	CT y FDG/PET negativo	Aparición sub-aguda de convulsiones, estado epiléptico, confusión, fiebre. Entubación y ventilación requeridas debido al deficiente nivel de conciencia y protección de las vías respiratorias	Anticuerpos VGCC de tipo N
06-026	M/63	CT y FDG/PET negativo	Aparición sub-aguda de convulsiones, déficit de memoria, paranoia, psicosis, alucinaciones gustatorias	Anticuerpos TPO y GAD; hipotiroidismo y diabetes mellitus tipo 2
08-278	F/45	Masa ovárica benigna	Aparición sub-aguda de convulsiones complejas parciales y generalizadas y déficits de memoria a corto plazo	-
09-176	F/62	CT pecho, abdomen, pelvis negativo	Aparición sub-aguda de convulsiones generalizadas confusión, nivel disminuido de conciencia, afasia fluente, movimientos orolinguales anormales.	-
07-004	M/29	Ninguno	Aparición sub-aguda de epilepsia del lóbulo temporal izquierdo; convulsiones refractarias tónico-clónicas generalizadas. Sin deterioro cognitivo.	Convulsiones en la infancia
09-083	F/30	CT y FDG/PET negativo	Historial de 3 meses de déficit grave de la memoria, seguido de convulsiones (generalizadas, subclínicas)	Anticuerpos GAD sin endocrinopatía

01-696 Graus	M/69	SCLC	Aparición sub-aguda de convulsiones tónico-clónicas generalizadas, déficit de memoria a corto plazo empeorado	Déficit de memoria a corto plazo suave de historial pasado de hemorragia subaracnoidea
07-1051 Graus	M/70	SCLC	Aparición sub-aguda de convulsiones (motoras parciales y generalizadas). Pérdida de memoria grave a corto plazo, confabulación, alucinaciones visuales, desorientación, agitación	Anticuerpos GAD, TPO y SOX1. Sin endocrinopatía
08-114	F/63	CT y FDG/PET negativo	Progreso de 1 año de ataxia cerebelosa. Estado mental normal, sin convulsiones, sin espasmos musculares o rigidez	Anticuerpos GAD, aparición en adultos de diabetes mellitus insulino-dependiente
08-398	F/61	CT y FDG/PET negativo	Historial de 6 semanas de perturbación de los andares, mioclonos y rigidez de la extremidad inferior; disfagia, disartria, nistagmo, parálisis de la mirada a la izquierda. Sin convulsiones o síntomas cognitivos	Anticuerpos GAD, TPO y tiroglobulina (disfunción suave del tiroides)

SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas; FDG/PET: Fluoro-desoxiglucosa/tomografía de emisión de positrones; SIADH: síndrome de hormona anti-diurética inapropiada; GAD: ácido glutámico decarboxilasa; TPO: tiroide peroxidasa; VGCC: canales de calcio sincronizados en tensión.

Tabla 2: Ensayos de diagnóstico, tratamiento y resultados.

Caso Nº	MRI	CSF	Títulos de CSF en suero	Lista cronológica de tratamientos	Resultado (duración del seguimiento)
08-299	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulos temporales mediales	9 WBC/ μ L; proteína 35; sin OCBs	S, 1:640 CSF, 1:160	IVlg, corticosteroides, quimioterapia	Mejoría sustancial. Déficit de memoria residual suave a corto plazo. Vive de forma independiente. Libre de convulsiones (12 meses)
06-165	Normal	Normal	S, 1:1280 CSF, n/a	Corticosteroides, IVlg, quimioterapia	Mejoría sustancial. Falleció de enfermedad metastásica (15 meses)
06-235	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulos temporales mediales	n/a	S, 1:160 CSF, n/a	Extirpación del tumor (lobectomía) IVlg	Mejoría parcial después de la extirpación del tumor e IVlg (4 meses); perdido para el seguimiento.
08-017	Normal	n/a	S, 1:2560 CSF, 1:640	Ninguna	Falleció pronto tras la presentación de insuficiencia respiratoria rápidamente progresiva

08-152	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulos temporales mediales	n/a	S, 1:1280 CSF, n/a	De apoyo	Falleció 6 meses después de la presentación de los síntomas. Anticuerpos GABA _B detectados después de la muerte del paciente en suero archivado
08-623	Señal FLAIR/T2 incrementada en pequeña zona del cuerpo calloso	95 WBC/ μ L; proteína 104; índice de IgG incrementado	S, n/a CSF, 1:640	Corticosteroides, micofenilato mofetilo	Mejoría sustancial. Vive de forma independiente. Libre de convulsiones (9 meses)
09-086	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulo temporal mesial	n/a	S, n/a CSF, 1:640	Corticosteroides, intercambio de plasma	Respuesta inicial a corticosteroides. Recayó 1 mes más tarde. Falleció después de 5 meses en la UCI con convulsiones refractarias, estado epiléptico y complicaciones sistémicas.
07-305	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulos temporales mediales	19 WBC/ μ L; proteína 46	S, 1:5120 CSF, 1:2560	Corticosteroides, intercambio de plasma	Mejoría sustancial. Déficit de memoria a corto plazo residual suave. Libre de convulsiones (3 meses)
06-026	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulos temporales mediales	75 WBC/ μ L; proteína 26 ; + OCBs	S, negativa CSF, 1:4	Corticosteroides	Recuperación completa (41 meses)
08-278	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulos temporales mediales	81 WBC, proteína 30	S, 10,240 CSF, n/a	Corticosteroides	Mejoría sustancial. Déficit de memoria a corto plazo residual. Vive de forma independiente. Libre de convulsiones (72 meses)
09-176	Normal	20 WBC/ μ L; proteína 22	S, 1:40 CSF, 1:40	Corticosteroides	Recuperación completa (6 meses)
07-004	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulo temporal medial izquierdo e insula	950 WBC/ μ L; + OCB	S, negativo CSF, 1:10	Sintomático	Biopsia del lóbulo temporal 20 meses después de la presentación de los síntomas muestra astrocitosis reactiva, sin inflamación. Sin seguimiento disponible tras la biopsia.
09-083	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulos temporales mediales	4 WBC/ μ L; proteína 109; 6 OCBs	S, negativo CSF, 1:4	Corticosteroides	Recuperación completa, excepto por breves episodios infrecuentes de alucinaciones visuales (10 meses)

01-696 Graus	Señal FLAIR/T2 incrementada en lóbulo temporal medial izquierdo	Traumático; citología negativa.		Quimioterapia	Déficit de memoria residual a corto plazo; convulsiones controladas; falleció de sepsis (3 meses)
07-1051 Graus	Normal	0 WBC/ μ L; proteína 95	S, n/a CSF, 1:640	IVIg, corticosteroides, quimioterapia	Convulsiones respondían a anti-epilépticos; persistía déficit de memoria; falleció de tratamiento relacionado con el cáncer (2 meses)
08-114	Normal	3 WBC/ μ L; proteína 78; 1 OCB	S, negativo CSF, 1:2	IVIg	Sin convulsiones ni déficits cognitivos. Respuesta limitada de ataxia cerebelosa a IVIg (12 meses)
08-398	Normal	2 WBC/ μ L; Proteína 52; + OCBs	S, negativo CSF, 1:2	IVIg, corticosteroides	Sin convulsiones ni déficits cognitivos. Recuperación completa después de esteroides e IVIg (12 meses)

WBC: leucocitos (normal $<4 \mu$ L), FLAIR: recuperación de inversión atenuada de fluido; n/a: no disponible; IVIg: inmunoglobulina intravenosa. UCI: unidad de cuidados intensivos.

Otros auto-anticuerpos. Además de los anticuerpos de GABA_B, 6 de 15 pacientes (40%) tenían anticuerpos contra uno o más de los siguientes: 3 con anticuerpos GAD, 2 con anticuerpos de peroxidasa tiroidea (TPO), 3 con anticuerpos VGCC de tipo N y 1 con anticuerpo SOX1. Sólo 1 de 3 pacientes con anticuerpos GAD tenía endocrinopatía y 1 de los 3 pacientes con anticuerpos VGCC tenía un SCLC. El paciente con anticuerpos SOX1 tenía un SCLC.

Tumores Asociados. Siete pacientes tuvieron un nódulo pulmonar o adenopatía mediastinal, con confirmación patológica de SCLC o tumor neuroendocrino en 6. En todos los casos se detectó el tumor en el momento de presentación de síntomas neurológicos. Dado que la mayoría de los tumores de pulmón fueron diagnosticados por biopsia con aguja, no había tejido disponible para el análisis de la expresión del receptor GABA_B. Sin embargo, 3 de 4 SCLCs de casos control (sin anticuerpos ni encefalitis) mostraron reactividad con un anticuerpo policlonal de cobaya a receptor GABA_{B1} e IgG biotinilada de los pacientes, lo que sugiere que estos receptores son expresados por SCLC.

Tratamiento y Resultados. Nueve pacientes (60%) tuvieron respuesta neurológica sustancial a la inmunoterapia o tratamiento del tumor. El seguimiento mediano de estos pacientes es de 10 meses (3-72); 1 murió posteriormente de la progresión del tumor (15 meses) y 1 se perdió para el seguimiento (4 meses). Seis pacientes no mostraron mejoría neurológica sostenida; tres (nº 4, 14, 15 en las Tablas 1 y 2) falleció poco después de la presentación del trastorno como resultado del tumor o complicaciones relacionadas con la quimioterapia, y los otros tres fueron diagnosticados con anticuerpos del receptor GABA_B después de la muerte (nºs 5 y 7) o se perdieron para el seguimiento (nº 12). En los tres últimos casos, un proceso autoinmune se consideró sólo en el paciente nº 7 quien recibió corticosteroides e intercambio de plasma; los otros dos pacientes no recibieron inmunoterapia. En general, con exclusión de los dos pacientes que se perdieron para el seguimiento, la mejora neurológica se correlacionaba con un control rápido del tumor o la inmunoterapia (test exacto de Fisher = 0,003).

Los autores de la presente solicitud han descubierto una nueva forma de encefalitis autoinmune que se asocia con anticuerpos frente a epítomos extracelulares del receptor GABA_B y es potencialmente sensible al tratamiento. En base a los hallazgos clínicos, de MRI y EEG, las regiones del cerebro más afectadas son los hipocampos y los lóbulos temporales. Por lo tanto, no es sorprendente que el síndrome resultante sea indistinguible de otros tipos de encefalitis límbica, aunque algunas de las características clínicas e inmunológicas pueden sugerir una autoinmunidad del receptor GABA_B. Un hallazgo notable es el desarrollo de convulsiones graves y prominentes en todos los pacientes, que representan la principal razón de la atención médica o el ingreso hospitalario. Dos

características asociadas con frecuencia son la identificación de un cáncer de pulmón, y la presencia concurrente de auto-anticuerpos contra antígenos de significado poco claro con el síndrome límbico. Por el contrario, la interrupción farmacológica o genética de receptores GABA_B resulta en fenotipos que se asemejan mucho al síndrome límbico de pacientes con anticuerpos contra el receptor GABA_B. Además de ello, en los seres humanos, un polimorfismo del receptor GABA_B común se asocia con epilepsia del lóbulo temporal.

Cuarenta y siete por ciento de los pacientes con encefalitis y anticuerpos del receptor GABA_B tenía un nódulo pulmonar o adenopatía mediastinal, cuyos rasgos patológicos, radiológicos y demográficos (intervalo de edades 53-75 años, todos fumadores) eran consistentes con un SCLC o tumor neuroendocrino. Por lo tanto, la autoinmunidad GABA_B está probablemente implicada en un cierto número de pacientes con encefalitis límbica y SCLC considerado previamente "sin anticuerpos" o atribuida a anticuerpos contra antígenos intracelulares, en particular si una mejora drástica (e inesperada) se producía después del tratamiento del tumor o la inmunoterapia. Además de ello, la encefalitis del receptor anti-GABA_B puede producirse sin la asociación del cáncer. Cinco de estos pacientes eran jóvenes (edad media 30 años, intervalo 24-45), sin antecedentes de tabaquismo, detección de cáncer integral negativa incluyendo CT/PET-FDG y, en algunos casos, seguimiento a largo plazo (41 y 72 meses), haciendo poco probable la presencia de un cáncer oculto en todos los casos. A este respecto, la encefalitis del receptor anti-GABA_B es similar a otras autoinmunidades sinápticas del sistema nervioso central (NMDAR, AMPAR) o periférico (receptor de acetilcolina, VGCC de tipo P/Q) que puede producirse con o sin asociación con el cáncer. Como ocurre en estos trastornos, el 40% de los pacientes con encefalitis del receptor anti-GABA_B (el 50% de las personas sin tumor) tenía auto-anticuerpos adicionales, lo que indica una propensión a la autoinmunidad. El solapamiento inmunológico más interesante fue con anticuerpos contra GAD (un antígeno intracelular), con lo que se considera que un subgrupo de pacientes con encefalitis límbica atribuida a la autoinmunidad GAD puede tener anticuerpos contra epítomos extracelulares del receptor GABA_B como causa plausible de los síntomas. Todos juntos, los anticuerpos contra el receptor GABA_{B1} se pueden utilizar para diagnosticar la encefalitis, por lo general manifestándose como un síndrome límbico, pero con convulsiones tempranas y prominentes. En el momento en el que se determinaron anticuerpos, los títulos en suero pueden ser muy bajos, y se prefiere el examen de suero y CSF. La identificación de estos anticuerpos debería incitar a la búsqueda de un SCLC, aunque aproximadamente el 50% de los pacientes no tienen cáncer. El tratamiento del tumor y la inmunoterapia con corticosteroides, IVIg, o intercambio de plasma a menudo resulta en una mejora. La unión drástica y específica del anticuerpo del receptor GABA_B en las neuronas vivas y la similitud con fenotipos experimentales en los que se suprime la función del receptor demuestra que los anticuerpos son patógenos.

Ejemplo 2: Anticuerpos del receptor GABA_B en la Encefalitis Límbica y Trastornos Neurológicos Asociados a Anti-GAD

Los autores de la invención analizaron la frecuencia de GABA_BR-ab en 147 pacientes con LE o síndromes neurológicos asociados con GAD-ab. Examinaron la presencia de GABA_BR-ab en 70 pacientes con LE (33 paraneoplásicos con anticuerpos onconeurales, 18 paraneoplásicos sin anticuerpos onconeurales y 19 idiopáticos con GAD-ab o seronegativos) y 77 pacientes con síndromes neurológicos asociados a GAD-ab distintos de LE (29 con síndrome de persona rígida (SPS), 28 con ataxia cerebelosa, 14 con epilepsia y 6 con diversos síndromes neurológicos paraneoplásicos). GABA_BR-ab fueron analizados en las muestras almacenadas de suero o CSF mediante inmunofluorescencia indirecta en células HEK293 transfectadas con subunidades del receptor GABA_{B1} y GABA_{B2}.

GABA_BR-ab se detectaron en 10 de los 70 pacientes con LE (14%). Ocho tenían SCLC y dos eran idiopáticos. Uno de los ocho pacientes de LE con SCLC tenían un anticuerpo onconeural adicional (Hu) y dos GAD-ab. GABA_BR-ab fueron identificados en 7 (70%) de los 10 pacientes con LE y SCLC sin anticuerpos onconeurales. Anticuerpos GABA_BR-ab no se encontraron en pacientes con GAD-ab y SPS, ataxia cerebelosa o epilepsia. Sin embargo, un paciente con GAD-ab y ataxia cerebelosa también presentó GABA_BR-ab en el entorno de un carcinóide anaplásico del timo.

Los resultados de los autores de la invención demuestran que GABA_BR-ab son los anticuerpos más comunes que se encuentran en LE asociada con SCLC que antes se consideraban "seronegativos". En pacientes con GAD-ab, la frecuencia de GABA_BR-ab es baja y solamente se observa en el contexto del cáncer.

Métodos

Pacientes. Los autores de la invención revisaron todos los pacientes con diagnóstico final de LE, o con otros síndromes neurológicos asociados con el GAD-ab, cuyo suero o CSF fue enviado a su laboratorio (Barcelona, España) para el análisis de anticuerpos antineuronales. La LE se definió por la aparición sub-aguda de la pérdida de memoria a corto plazo, el cambio de comportamiento, convulsiones y la participación de los lóbulos temporales por EEG, estudios de formación de imágenes o examen post mortem. La LE se consideró definitiva paraneoplásica si se diagnosticó un tumor o el suero presentaba anticuerpos onconeurales bien caracterizados (Hu, Yo, Ri, CV2, Ma2, anfifisina). El diagnóstico de la LE idiopática definida requería la ausencia de cáncer y anticuerpos onconeurales bien caracterizados, y un seguimiento de al menos tres años. Los pacientes con LE con un seguimiento más corto se clasificaron como LE idiopáticos posibles. Los pacientes con GAD-ab se clasificaron, como se informó anteriormente, en uno de los siguientes grupos: síndrome de persona rígida (SPS), ataxia cerebelosa, epilepsia aislada y síndromes neurológicos paraneoplásicos. La información se obtuvo de impresos cumplimentados por los neurólogos de referencia, entrevistas telefónicas y la revisión de los historiales clínicos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clinic.

Estudios inmunológicos. Anticuerpos onconeurales, SOX1-ab y GAD-ab fueron rastreados por inmunohistoquímica realizada en cortes congelados de cerebelo de rata perfundidos con paraformaldehído, utilizando una técnica de avidina-biotina inmunoperoxidasa y fueron confirmados por inmunotransferencia cuando fuese indicado. GAD-ab fueron confirmados por radioinmunoensayo. Anticuerpos neurófilos fueron examinados por inmunohistoquímica en cortes congelados de cerebro de rata post-fijados con paraformaldehído al 4%. La presencia de anticuerpos contra el receptor de glutamato AMPA se confirmó por inmunofluorescencia en células HEK-293 transfectadas con plásmidos que contienen los antígenos apropiados y anticuerpos de canales de potasio sincronizados en tensión (VGKC) fueron confirmados por radioinmunoensayo.

GABA_BR-ab fueron rastreados en células HEK293 transfectadas con plásmidos que contenían GABA_{B1} y GABA_{B2} de roedores en relaciones equimolares. Muestras positivas fueron también analizadas por inmunocitoquímica de cultivos neuronales del hipocampo de ratas. Ambas técnicas se han descrito previamente. En síntesis, células HEK293 transfectadas se incubaron con suero de los pacientes (dilución 1:20) o CSF (1:2) durante 1 h a 37°C, se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4%, se incubaron con un anticuerpo GABA_{B1} policlonal de conejo (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, sc-14006, Santa Cruz, California), seguido de los anticuerpos secundarios Alexa Fluor apropiados (Molecular Probes, Eugene, OR). Para la inmunocitoquímica de cultivos neuronales del hipocampo de ratas, las neuronas vivas cultivadas en cubreobjetos se incubaron con suero de los pacientes (1:100) o CSF (1:2) durante 1 h a 37°C, se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se hicieron reaccionar en condiciones inmunológicas con anticuerpo secundario anti-humano IgG Alexa Fluor. Los resultados se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia utilizando el software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY). Para confirmar la especificidad de la reactividad neuronal, todas las muestras positivas se pre-absorbieron con la línea celular no neuronal HEK293 para separar los anticuerpos que podrían reaccionar con antígenos de superficie específicos no neuronales.

Resultados

Once pacientes dieron positivo para GABA_BR-ab en el rastreo de células HEK293 transfectadas con las subunidades B1 y B2 del GABA_BR (Figura 7). Todas las muestras positivas reaccionaban *in vivo* en condiciones inmunológicas con cultivos primarios de neuronas del hipocampo (Figura 8). GABA_BR-ab eran positivos tanto en suero como en CSF en los 5 pacientes de los cuales estaban disponibles muestras emparejadas. El título mediano de GABA_BR-ab era 1/120 (intervalo 40-2000) en suero y 1/60 (intervalo 20-640) en el CSF.

Los autores de la invención encontraron GABA_BR-ab en 10 pacientes con LE. GABA_BR-ab positivos se identificaron con mayor frecuencia en el grupo de LE paraneoplásica sin anticuerpos onconeurales (previamente considerados "seronegativos") (Tabla 3). Siete (39%) de los 18 pacientes eran GABA_BR-ab-positivos y todos tenían SCLC. En total, GABA_BR-ab-positivos fueron identificados en 7 (70%) de los 10 pacientes con LE y SCLC sin anticuerpos onconeurales. Los otros tres pacientes eran positivos para AMPAR-ab. La coincidencia de GABA_BR-ab y GAD-ab se produjo en 2 pacientes con SCLC, mientras que los otros tres pacientes con LE y GAD-ab se asocia con otros tumores (timoma 2, linfoma) y eran GABA_BR-ab-negativos.

En este estudio, los autores de la invención analizaron 33 pacientes con LE y anticuerpos onconeurales, y sólo uno, con Hu-ab y SCLC, dio positivo para GABA_BR-ab. Sin embargo, 4 de los 7 pacientes con LE con GABA_BR-ab sin anticuerpos onconeurales presentaban anticuerpos contra antígenos intracelulares (Tabla 4). Dos pacientes tenían GAD-ab (uno también SOX1-ab), uno Hu-ab y, en dos casos previamente reseñados, uno tenía serina/treonina quinasa (BRSK)2-ab del cerebro y el otro SOX1 y VGKC-ab.

No se identificó tumor en los 2 pacientes GABA_BR-ab-positivos restantes, pero el seguimiento es demasiado corto como para clasificarlos como LE idiopática definitiva. Ninguno de los 5 pacientes con LE idiopática y GAD-ab eran positivos para GABA_BR-ab (Tabla 3).

5 Un resumen de las características clínicas de los pacientes GABA_BR-ab-positivos se presenta en la Tabla 4. Nueve de los 10 pacientes con GABA_BR-ab y LE eran hombres. La mediana de edad era de 60 años (intervalo: 47-70 años). Las convulsiones eran el síntoma predominante y 8 pacientes presentaban síntomas y 2 requirieron ingreso en la unidad de cuidados intensivos para el control de las convulsiones. Todos los pacientes presentaban también confusión, desorientación, pérdida de memoria o cambios en el comportamiento consistentes con la encefalitis que implica predominantemente el sistema límbico. El CSF reveló pleocitosis linfocitaria leve en 4 pacientes. El MRI del cerebro mostró una señal incrementada de recuperación de inversión atenuada de fluidos en uno o ambos hipocampos y amígdala en 7 pacientes. En 4 de ellos la MRI del cerebro inicial se reseñó como normal. Sólo 1 paciente tenía hiponatremia. Siete pacientes fueron tratados con esteroides, inmunoglobulinas intravenosas o la combinación de ambos fármacos. Tres de los 8 pacientes con SCLC fueron también tratados con quimioterapia. Sólo 2 pacientes consiguieron una recuperación completa (uno sin cáncer) y ninguno de ellos tenía anticuerpos antineuronales concurrentes. Respuestas parciales a los tratamientos indicados se lograron en 4 con una recaída en uno de ellos.

20 GABA_BR-ab no se detectaron en 71 pacientes con GAD-ab y SPS, ataxia cerebelosa o epilepsia. Por el contrario, uno de los 6 pacientes con síndromes neurológicos paraneoplásicos y GAD-ab era GABA_BR-ab positivo (Tabla 3). Era una mujer de 57 años de edad con un carcinoide anaplásico conocido de metástasis de timo y huesos. Desarrolló náuseas, vómitos, inestabilidad de los andares y diplopía. El examen neurológico reveló un estado mental normal, nistagmo horizontal bilateral y ataxia cerebelosa en los andares. La paciente fue tratada con esteroides orales y los síntomas se resolvieron lentamente durante los siguientes tres meses.

Tabla 3. Frecuencia de GABA_BR-ab en 147 pacientes con encefalitis límbica o síndromes neurológicos asociados a GAD-ab

Síndrome	Número de sueros (CSF)	GABA _B R-ab positivos (%)	Comentarios sobre casos positivos
<u>LE paraneoplásica</u>	51(21)	8 (16)	
Con ab onconeural ¹	33 (14)	1(3)	Hu-ab con SCLC
Sin ab onconeural ²	18 (7)	7(39)	Todos SCLC, GAD-ab: 2
<u>LE idiopática</u> ³	19(15)	2(14)	Seguimiento corto
<u>GAD-ab-positivos, no-LE</u>	77 (48)	1(1)	
Síndrome de persona rígida	29 (16)	0 (0)	
Ataxia cerebelosa	28 (19)	0 (0)	
Epilepsia	14 (9)	0 (0)	
Paraneoplásicos	6 (4)	1(17)	Ataxia cerebelar

25 1. Hu-ab (26), Ma2-ab (4), anifisina-ab (3). Cáncer de pulmón en 18 pacientes
 2. GAD-ab en cinco pacientes. Cáncer de pulmón en 11 pacientes (SCLC: 10; NSCLC: 1)
 3. GAD-ab en cinco pacientes. LE idiopática definida: 7 pacientes
 SCLC: carcinoma de pulmón de células pequeñas; LE: encefalitis límbica

Tabla 4. Rasgos clínicos y resultado de pacientes con anticuerpos GABA_BR positivos

Caso	Edad/ sexo	Cáncer	Síntomas que presenta ^c	MRI Lesiones temporales	CSF pleocitosis (WBC)	Otros ab antineurona- les	Tratamiento	Resultado (meses)
1	60/M	SCLC	Estado epiléptico	Izquierdo	Sí (desconocida)	Ninguno	Esteroides, IVlg	Control parcial de las convulsiones (fallece por complicaciones en la UCI)
2	57/F	SCLC	Convulsiones, cambio en el comportamiento	Bilateral	No	Ninguno	Esteroides, IVlg	Recuperación completa ^d
3	66/M	SCLC	Convulsiones, confusión	Normal	Sí (18)	GAD	Esteroides, IVlg	No disponible (seg. corto)
4 ^a	47/M	SCLC	Convulsiones, cambio en el comportamiento deterioro de la memoria	Bilateral	Sí (20)	SOX1, VGKC	Esteroides, IVlg, quimioterapia	Recuperación parcial, curso de recaída (fallece por progreso del cáncer)
5 ^b	69/M	SCLC	Convulsiones, deterioro de la memoria, confusión	Izquierdo	Traumática	Ninguno	Quimioterapia	Respuesta parcial. Fallece por tratamiento relacionado con el cáncer (3 meses)
6 ^b	70/M	SCLC	Convulsiones, deterioro de la memoria, confusión	Normal	No	GAD, SOX1	Esteroides, quimioterapia	Sin respuesta. Fallece por tratamiento relacionado con el cáncer (2 meses)
7	58/M	SCLC	Convulsiones, deterioro de la memoria	Bilateral	Sí (15)	Hu	Esteroides, quimioterapia	Sin respuesta (fallece por LE)
8 ^a	61/M	SCLC	Deterioro de la memoria	Bilateral	No	BRSK2	Ninguno	Sin respuesta. Perdido cuando se diagnosticó el tumor 9 meses más tarde

9	61/M	No	Confusión, cambio en el comportamiento	Normal	No	Ninguno	IVIg	Mejoría parcial. Neuropatía por UCI grave
10	50/M	No	Convulsiones, deterioro del comportamiento y la memoria	Bilateral	No	Ninguno	Antiepilépticos sólo	Recuperación completa
11	57/F	Carcinoma del timo	Ataxia cerebelosa aguda	Normal	No	GAD	Esteroides	Recuperación completa

SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas; WBC: leucocitos; BRSK2: serina/treonina quinasa 2 del cerebro. a: pacientes que han sido reseñados previamente en las referencias 10 y 9; b: incluidos en la serie inicial de GABAR-ab (referencia 4); c: síntoma predominante enumerado en primer lugar; d: Recuperación antes del inicio de la quimioterapia.

Para ver si GABA_BR-ab se asocian con otros casos de degeneración cerebelosa paraneoplásica (PCD), los autores de la invención analizaron el suero o el CSF de una serie de 45 pacientes con PCD y cáncer de pulmón (35 con SCLC). La mayoría (73%) se incluyeron en un estudio previo. Estos pacientes tenían Hu-ab (15%) o anticuerpos de canales de potasio sincronizados en tensión (50%). Sin embargo, todos eran negativos para GABA_BR-ab.

5 Los autores de la invención encontraron que GABA_BR-ab son los anticuerpos más comunes identificadas en pacientes con SCLC y LE previamente considerados "seronegativos". Aunque la aparición de GABA_BR-ab y GAD-ab se observó en una serie inicial de 15 pacientes, cuando los autores de la invención sometieron a ensayo una serie mayor de pacientes con varios tipos de síndromes neurológicos asociados con GAD-ab, GABA_BR-ab solamente fueron identificados en los que tenían un síndrome paraneoplásico.

10 En el momento de la descripción inicial de Hu-ab como marcadores de síndromes neurológicos asociados con SCLC, los autores de la invención observaron que hasta el 50% de los pacientes con LE eran "seronegativos". El síndrome de estos pacientes estaba muy restringido al sistema límbico y parecía mejorar con mayor frecuencia después del tratamiento del cáncer que el de los pacientes con Hu-ab. En el presente estudio, 7 de cada 10 (70%)
15 pacientes con LE y SCLC tenían GABA_BR-ab. Los otros 3 pacientes eran positivos para AMPAR-ab. Considerados en conjunto, todos los pacientes con LE y SCLC previamente considerados seronegativos para anticuerpos paraneoplásicos clásicos (onconeurales) tenían anticuerpos contra los receptores sinápticos.

En el presente estudio los autores de la invención demostraron que Hu-ab y GABA_BR-ab sólo se producían en 1 de 33 pacientes, lo que sugiere que esta asociación específica es poco común. Por el contrario, los autores de la invención confirman que el 40% de estos pacientes tenían anticuerpos que son marcadores del SCLC subyacente
20 (SOX1, BRSK2) o están dirigidos contra VGKC o GAD.

En este estudio, todos los pacientes con GABA_BR-ab y GAD-ab concurrentes tenían un trastorno paraneoplásico. En la serie inicial, 2 de los 8 pacientes con encefalitis LE idiopática tenían GAD-ab adicionales. Los autores de la invención no encontraron GABA_BR-ab en pacientes con LE o epilepsia aislada con GAD-ab, excepto en los dos
25 pacientes con SCLC. Sus cinco pacientes con LE idiopática y GAD-ab eran mujeres con una media de edad de 29 años y cuatro presentaban convulsiones. Para determinar la frecuencia con la que ambos anticuerpos coinciden en pacientes con LE idiopática, los autores de la invención sugieren la búsqueda rutinaria de GABA_BR-ab en todos los pacientes con LE sospechosa de estar relacionada con GAD-ab.

Habiendo descrito realizaciones preferidas de la invención con referencia a los dibujos que se acompañan, ha de entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones precisas, y que pueden efectuarse diversos cambios
30 y modificaciones en la misma por los expertos en la técnica sin apartarse del alcance o espíritu de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar
 - a) una encefalitis autoinmune,
 - b) un tumor oculto que provoca una encefalitis autoinmune, o
 - c) en un sujeto con epilepsia, un tumor que provoca la epilepsia,
- 5 comprendiendo el método testar una muestra biológica de un sujeto para determinar la presencia de un anticuerpo contra un receptor GABA_B, en el que la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra biológica es indicativa de que el sujeto tiene
 - a) una encefalitis autoinmune, o
 - b) un tumor oculto que provoca dicha encefalitis autoinmune, o
 - c) en los casos en los que el sujeto tiene epilepsia, la presencia de dicho anticuerpo es indicativa de un tumor en dicho sujeto que provoca dicha epilepsia.
- 10
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une a la subunidad B1 de dicho receptor GABA_B.
- 15
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une a la subunidad B2 de dicho receptor GABA_B.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la encefalitis autoinmune es una encefalitis autoinmune paraneoplásica.
- 20
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la encefalitis autoinmune es una encefalitis del receptor anti-GABA_B.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la encefalitis autoinmune es una encefalitis autoinmune no paraneoplásica.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha encefalitis autoinmune comprende una encefalitis límbica.
- 25
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha encefalitis autoinmune está asociada a síntomas patológicos.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los síntomas son convulsiones; síntomas psiquiátricos; anomalía en la cognición y el comportamiento; un trastorno en el movimiento o movimientos anormales; un nivel disminuido de conciencia; hipoventilación; amnesia o déficit de memoria; o una combinación de los mismos.
- 30
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha encefalitis autoinmune está asociada con un tumor.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho tumor es un cáncer de pulmón de células pequeñas o un tumor neuroendocrino del pulmón u otros órganos.
- 35
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es una muestra de fluido cerebroespinal (CSF).
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de suero o de plasma.

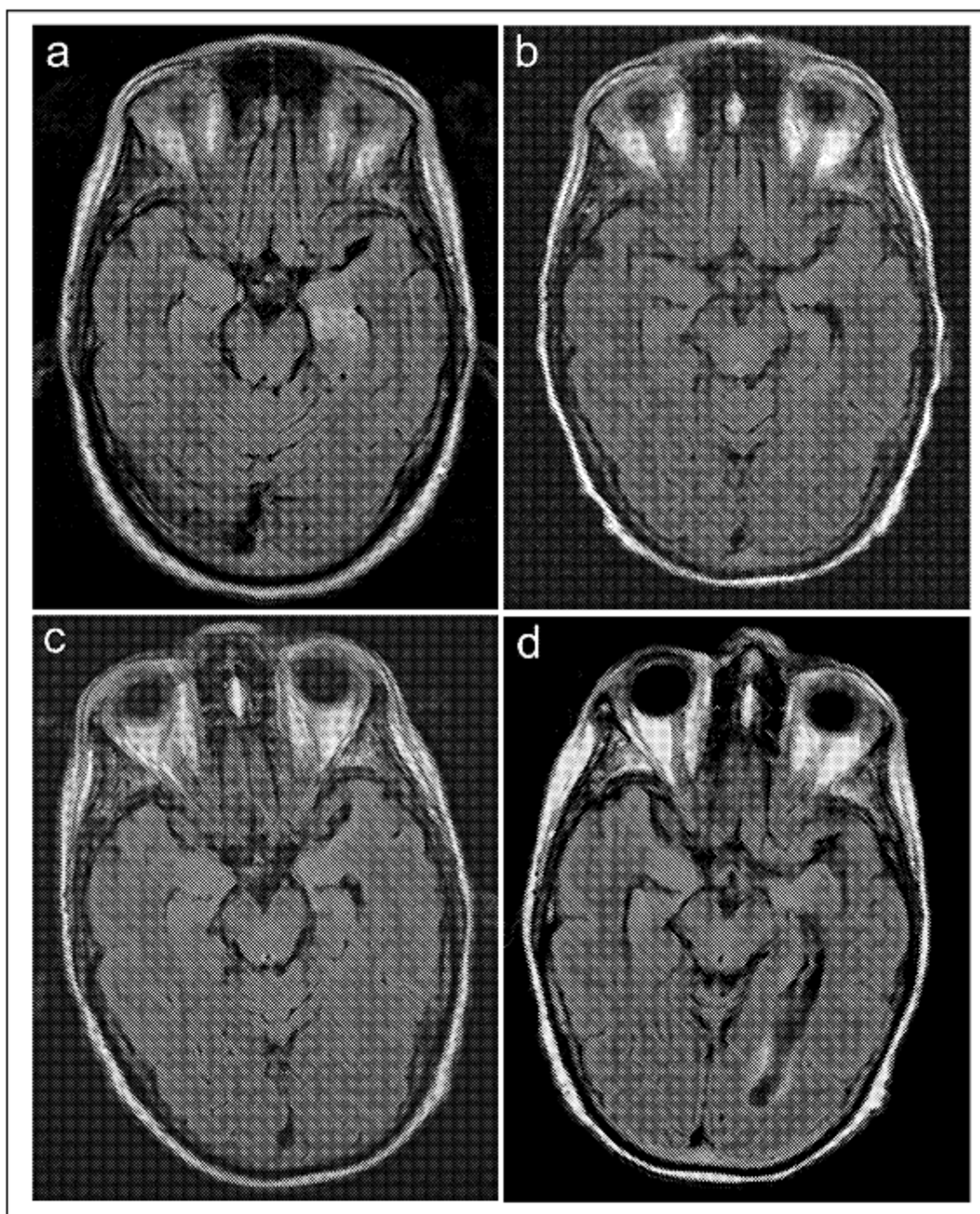


FIGURA 1

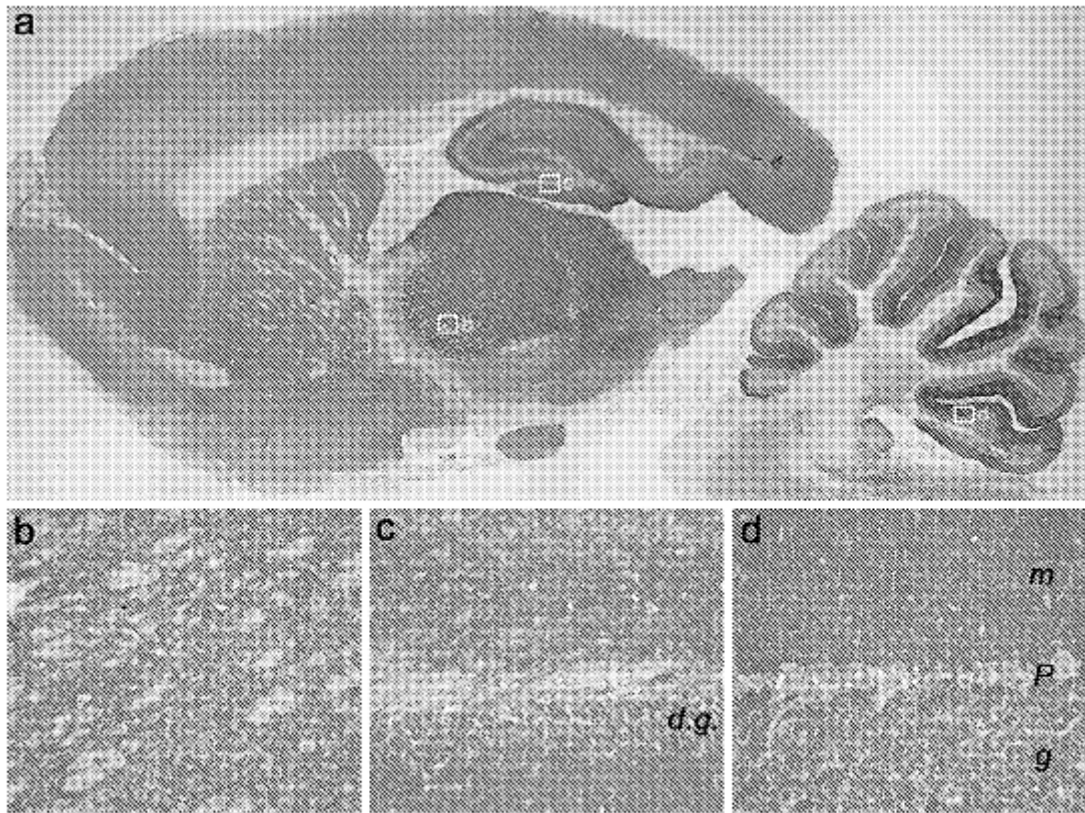


FIGURA 2

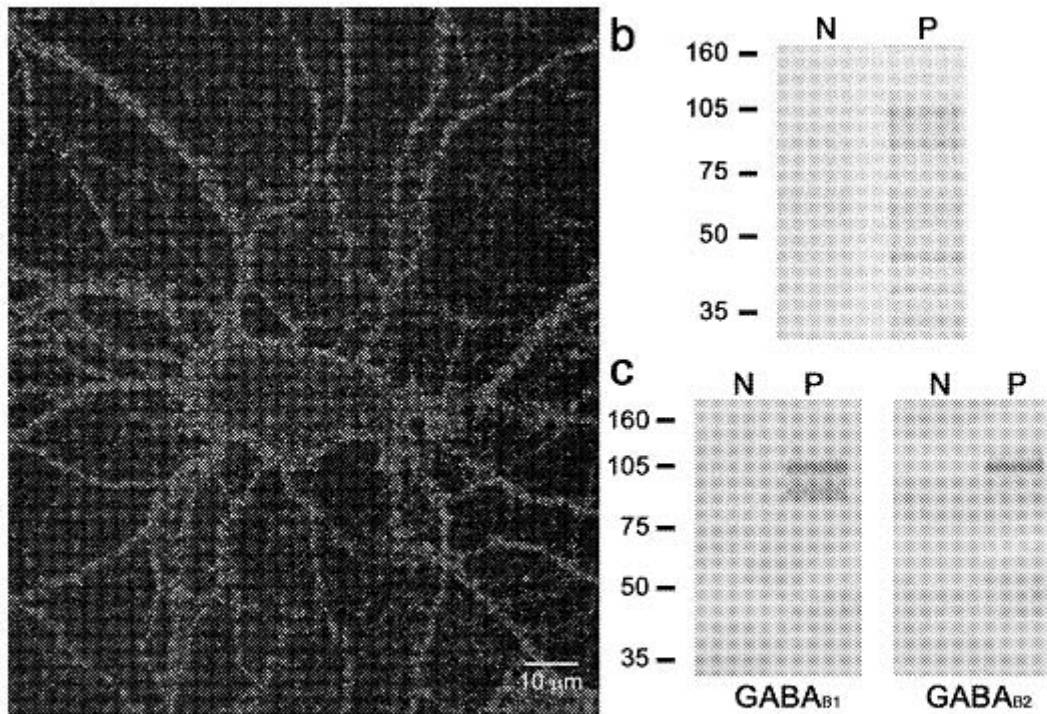


FIGURA 3

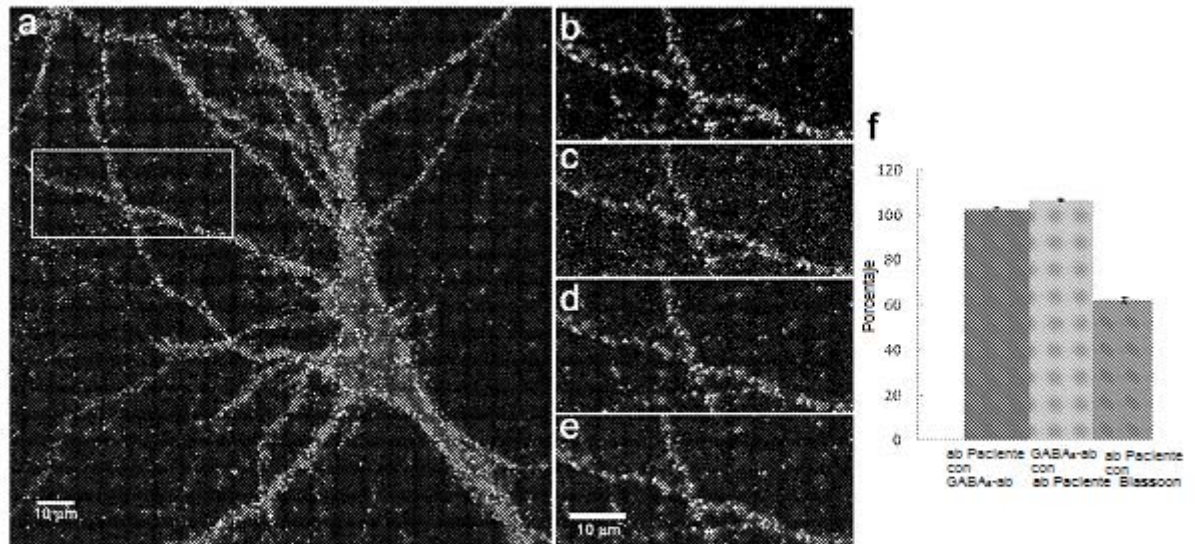


FIGURA 4

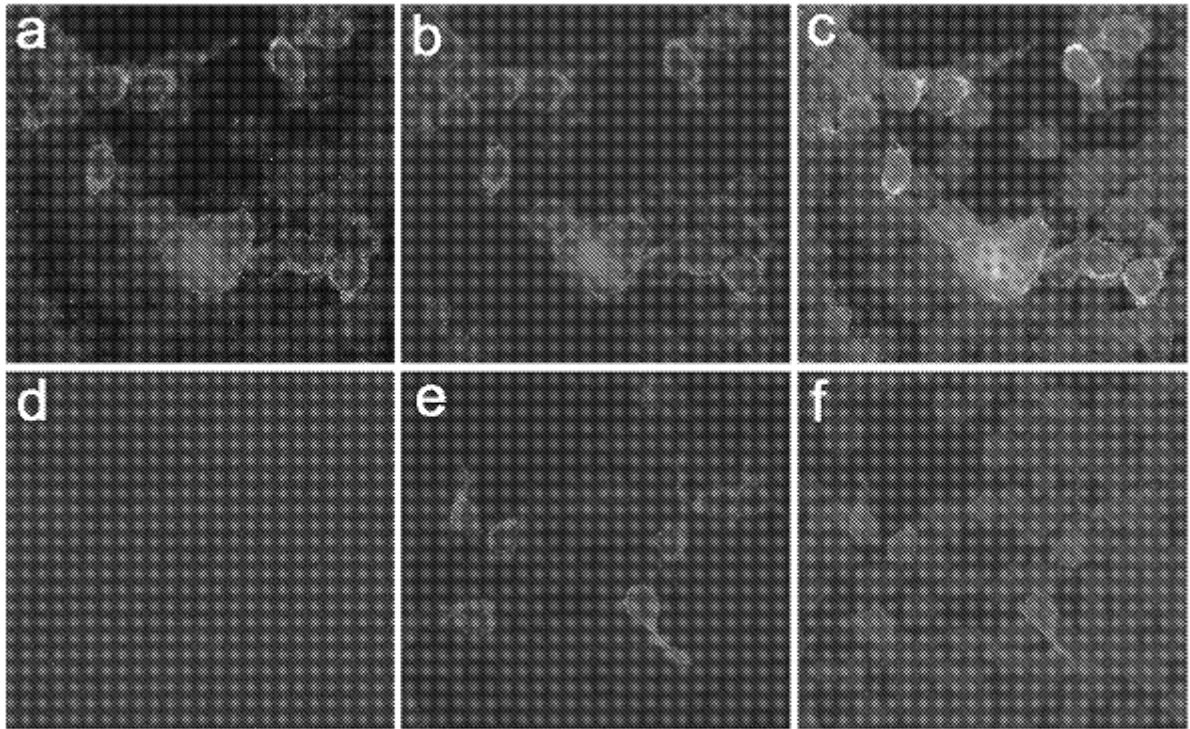


FIGURA 5

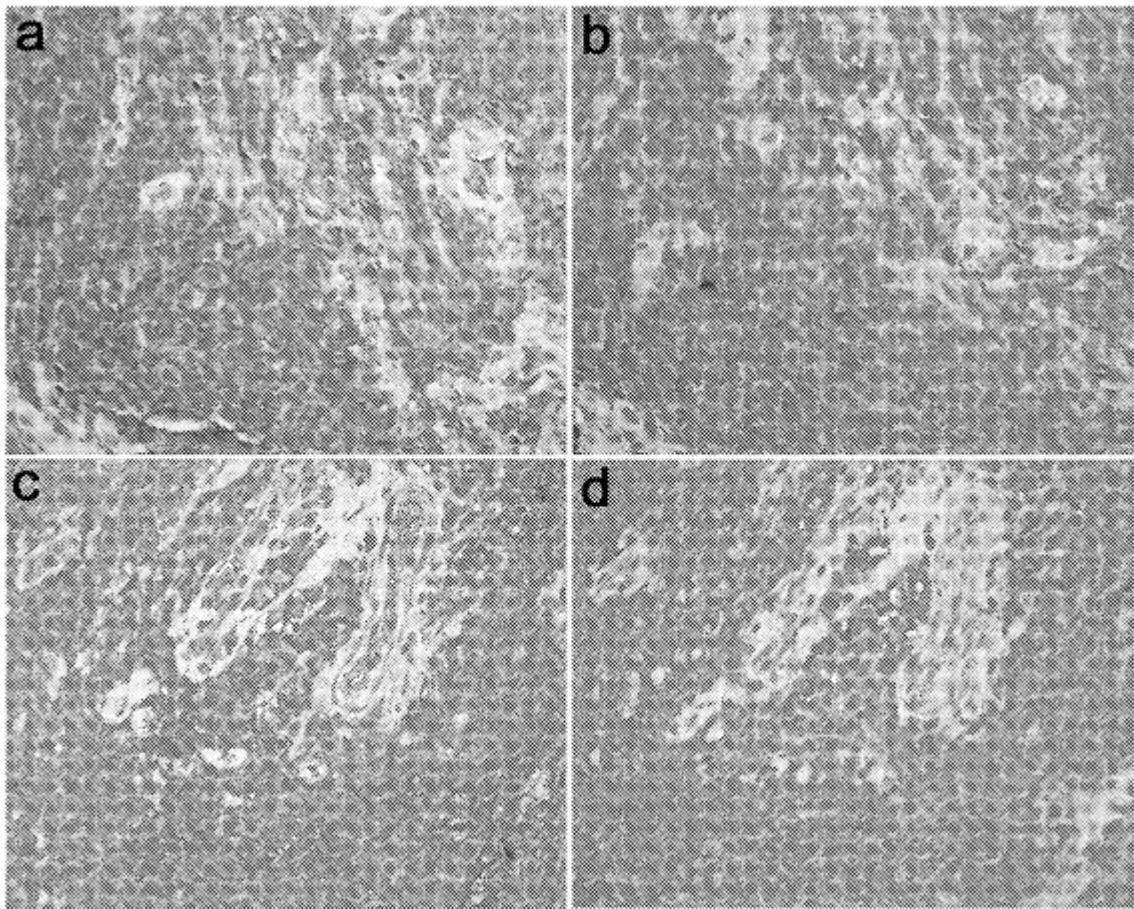


FIGURA 6

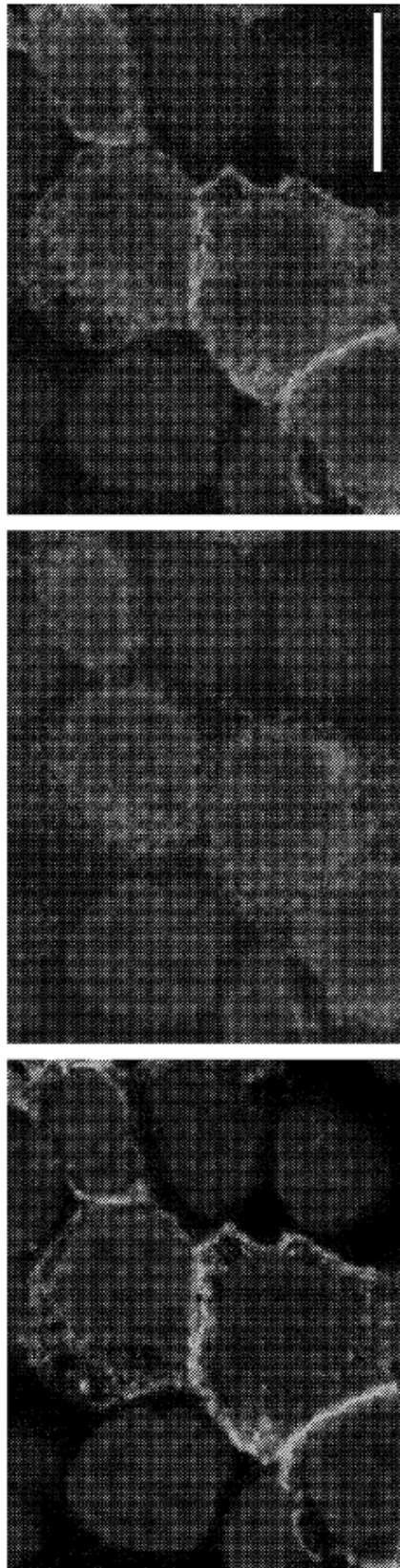


FIGURA 7

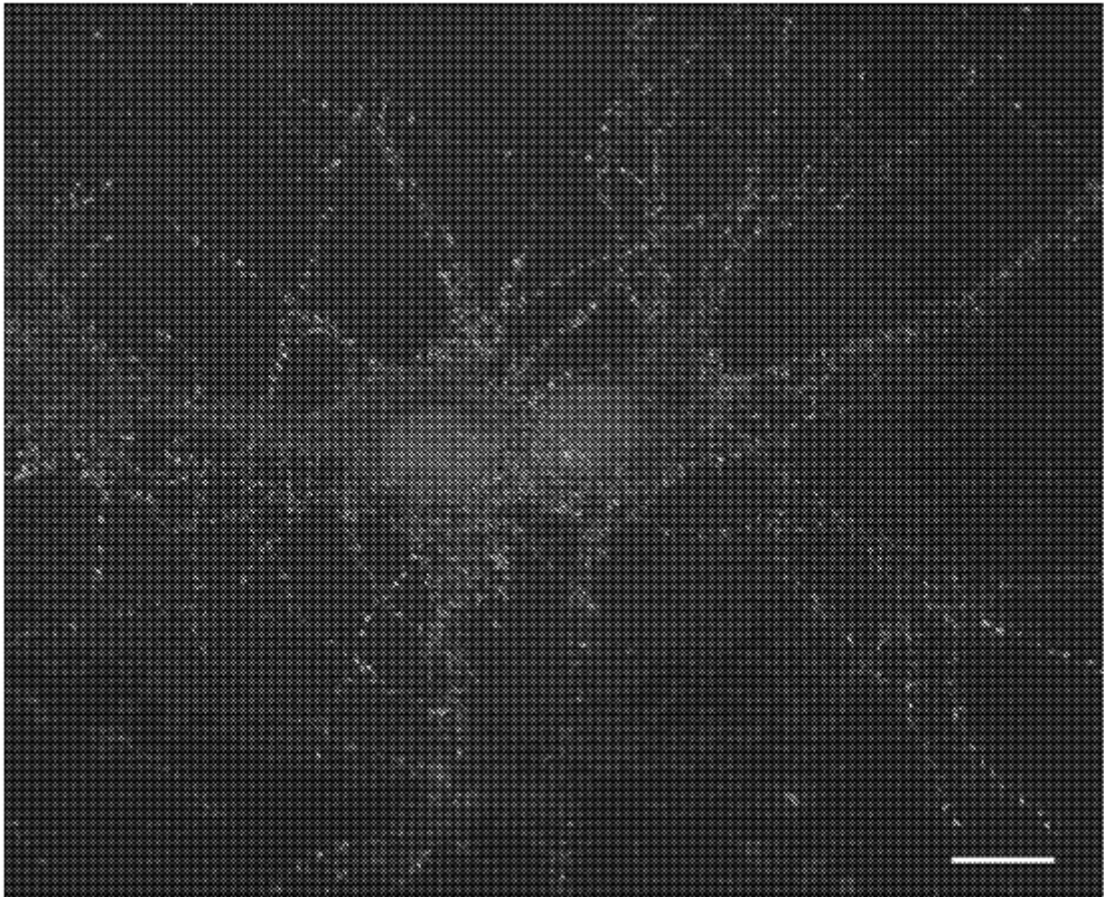


FIGURA 8