

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 474**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61L 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2013 PCT/EP2013/068845**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14041035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2013 E 13762461 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2895507**

54 Título: **Método de diagnóstico para la detección de una enfermedad autoinmune y materias relacionadas**

30 Prioridad:

11.09.2012 EP 12380048

11.09.2012 EP 12183919

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

13.05.2019

73 Titular/es:

**INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (50.0%)**

Passeig Lluís Companys 23, 3er

08010 Barcelona, ES y

INSTITUT D'INVESTIGACIONES BIOMÈDIQUES

AUGUST PI I SUNYER (50.0%)

72 Inventor/es:

DALMAU, JOSEP

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 712 474 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 de diagnóstico para la detección de una enfermedad autoinmune y materias relacionadas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al diagnóstico de trastornos autoinmunes recién identificados, proporcionando un polipéptido o proteína que comprende al menos un epítipo derivado de un nuevo autoantígeno de superficie celular y los medios y métodos asociados para la detección de dicho trastorno autoinmune.

10

Antecedentes de la invención

El descubrimiento de que la memoria, el comportamiento, la cognición, y los procesos del pensamiento pueden ser alterados por autoanticuerpos ha cambiado el enfoque al diagnóstico y tratamiento de los trastornos neuropsiquiátricos considerados previamente idiopáticos. Desde 2007, se han identificado siete de dichos anticuerpos (anti-NMDAR, AMPAR, GABA(B), LG11, Caspr2, GlyR y mGluR5), todos apuntando a las proteínas de la superficie celular involucradas en la transmisión sináptica, la plasticidad, o la excitabilidad nerviosa, y asociadas con síndromes a menudo severos, pero que a menudo responden a la inmunoterapia¹. Los pacientes pueden estar comatosos durante varios meses, con comportamientos extraños, movimientos anormales, o convulsiones refractarias y se recuperan con inmunoterapia y amplia atención². Considerando que hasta hace poco estos trastornos eran desconocidos, la frecuencia relativamente alta de algunos ha sido sorprendente. Por ejemplo, en un centro enfocado al diagnóstico y epidemiología de la encefalitis (California Encephalitis Project) la frecuencia de la encefalitis anti-NMDAR superó a la de cualquier encefalitis vírica individual³. Por estas razones, mecanismos inmunes similares son considerados cada vez más en pacientes que desarrollan rápidamente síntomas neuropsiquiátricos progresivos en el contexto de encefalitis de etiología desconocida, una situación que ocurre frecuentemente. Hoy en día aproximadamente el 70% de las encefalitis de etiología poco clara permanecen no diagnosticadas tras una evaluación extensiva de etiologías infecciosas⁴. En este contexto, la identificación de autoanticuerpos frente a antígenos de superficie de célula neuronal cambia la gestión al uso de inmunoterapia y puede extender el apoyo de cuidados intensivos en casos que de otro modo podrían ser considerados inútiles.

30

El documento WO 2005/108997 A1 da a conocer el enzima humano dipeptidil aminopeptidasa (DPP6/DPPX), pero no da a conocer el uso de este enzima para el uso en un método de diagnóstico de una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central en un sujeto. Este documento se refiere a una larga lista de enfermedades no relacionadas y los autores especulan que la expresión o actividad de DPP6 en ciertos tejidos puede ser relevante, pero no menciona si un incremento o disminución en la expresión o actividad indica que es probable que el sujeto sufra o desarrolle cierta enfermedad.

35

En vista de lo anterior, el problema subyacente en la presente invención reside en proporcionar medios para el diagnóstico de una encefalitis autoinmune previamente no identificada, o encefalitis de etiología desconocida, respectivamente.

40

Resumen de la invención

Este problema es solucionado por el sujeto de las reivindicaciones, en particular mediante el uso de un polipéptido o proteína que comprende al menos un epítipo derivado de DPPX, un autoantígeno novedoso para la detección de un trastorno autoinmune, en particular encefalitis, un ácido nucleico o vector que codifica dicho polipéptido o proteína, una célula que comprende dicho vector, y un kit de ensayo o una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido o proteína.

45

Una ventaja de la presente invención reside en el hecho de que el diagnóstico de encefalitis de etiología desconocida permite la identificación de la enfermedad como encefalitis autoinmune, distinción de otras formas (no autoinmunes) de encefalitis u otras enfermedades o síntomas relacionados, respectivamente.

50

Breve descripción de las figuras

55

Figura 1 muestra la inmunoprecipitación de DPPX;

Figura 2 muestra la expresión de DPPX en el plexo mientérico;

Figura 3 muestra el análisis de anticuerpos DPPX usando un ensayo basado en células;

60

Figura 4 muestra una comparación de la reactividad de suero de pacientes usando cerebro de ratón mutante DPPX-nulo y tipo salvaje;

Figura 5 muestra una inmunotinción de cerebro de rata con suero de un paciente;

Figura 6 muestra un análisis de anticuerpos de un paciente usando un ensayo basado en células expresando un mutante (DPPXed-myc) con el dominio extracelular de DPPX borrado; y

65

Figura 7 muestra el análisis de anticuerpos de un paciente usando un ensayo basado en células expresando Kv4.2

Descripción detallada de la invención

Un "polipéptido", de acuerdo con la presente invención, se entiende que es un polímero de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más aminoácidos, el cual puede incluir aminoácidos estándar, así como aminoácidos no estándar. Los términos polipéptido, péptido y proteína se usan aquí de forma intercambiable.

5 El término "enfermedad autoinmune", en lo referente a la presente invención se refiere a enfermedades que están asociadas con la emergencia de anticuerpos contra DPPX. Como se indica aquí, los pacientes que presentan dicha enfermedad autoinmune sufren, por ejemplo, de síntomas que incluyen convulsiones, disfunción cognitiva, alucinaciones, síntomas psiquiátricos, agitación, confusión, temblor en reposo y mioclono. La mayoría de estos
10 síntomas están asociados con un trastorno neuronal. Así, de acuerdo con una realización preferida de la invención, una enfermedad autoinmune es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso. Además, los síntomas listados aquí están asociados al menos en parte con defectos en el sistema nervioso central. Por consiguiente, de acuerdo con otra realización de la invención, la enfermedad autoinmune es una encefalitis autoinmune. Aún más, cierto conjunto de síntomas, como el temblor, también pueden ser resultado de defectos en el sistema nervioso periférico,
15 p. ej. por enfermedades autoinmunes que afectan las neuronas motoras. Correspondientemente, de acuerdo con otra realización de la presente invención, la enfermedad autoinmune es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso periférico. Además, se observó diarrea severa, estreñimiento y pérdida de peso en pacientes aquejados de las enfermedades descritas aquí, indicando que también otros tejidos, tales como tejidos de tracto digestivo, pueden estar afectados por dichas enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente
20 invención, la enfermedad autoinmune es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso autónomo. Los términos trastorno y enfermedad se usan aquí de forma intercambiable.

Un "epítopo", dentro del alcance de la presente invención, se entiende que es una parte de un polipéptido el cual puede ser reconocido específicamente (es decir, unido) por un anticuerpo. El epítopo puede ser un epítopo conformacional, compuesto por secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del polipéptido, o un epítopo lineal, compuesto por secciones continuas de la secuencia de aminoácidos del polipéptido.

El término "derivado", referido a epítopos, dentro del alcance de la presente invención se refiere a epítopos formados a partir de secciones discontinuas o continuas de la secuencia del aminoácido primario de un polipéptido o proteína. Es conocido en la técnica, que uno o varios aminoácidos en epítopos pueden sustituirse p. ej. mediante sustitución conservadora de aminoácidos (p. ej. glutamato a aspartato E→D, glutamina a asparaginas Q→N, fenilalanina a tirosina F→Y, leucina a isoleucina L→I) sustancialmente sin cambiar la fuerza o especificidad de la unión a anticuerpos. Correspondientemente, el término "derivado" se refiere también a aquellos epítopos que, mientras presentan diferencias en la secuencia de aminoácido, muestran una fuerza o especificidad de la unión a anticuerpos sin cambios
35 o sustancialmente sin cambios en comparación con los epítopos con la secuencia de aminoácidos original.

"Ácido nucleico", de acuerdo con la presente invención, se refiere a polímeros de ADN o ARN incluyendo también derivados químicos de los mismos o análogos sintéticos como ácidos peptidonucleicos o ácidos morfolinonucleicos. Es conocido en la técnica, debido a la degeneración del código genético, que ciertos cambios del código del ácido nucleico no tienen como resultado cambios de la secuencia peptídica codificada en su interior. Por lo tanto, el término "ácido nucleico" también abarca secuencias de ácidos nucleicos que difieren en su secuencia de las secuencias de ácido nucleico originales mientras codifiquen por la misma secuencia peptídica.

Un "vector" de acuerdo con la presente invención se entiende que es una secuencia de ácidos nucleicos circular o lineal que incluye un inserto, por ejemplo, una secuencia génica o de ácido nucleico que codifica una proteína deseada, y otras características tales como las secuencias necesarias para la replicación vectorial, la expresión del inserto, la selección positiva de las células huésped portadoras de vectores o la expresión de proteínas marcador. Dichos vectores y secuencias son conocidos extensivamente por la técnica anterior.

50 Una "célula" dentro del alcance de la presente invención es cualquier célula huésped procarionta o eucariota capaz de ser transformada con un vector. Por ejemplo, una célula puede ser tanto una célula bacteriana como una célula de *Escherichia coli* o una célula eucariota como un cultivo celular humano inmortalizado. Un ejemplo de un cultivo celular humano inmortalizado es una célula HEK293.

55 El término "DPPX" se refiere a la proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa (DPP6 o DPPX), una subunidad auxiliar de la superficie celular de los canales de potasio Kv4.2. Los sinónimos de DPPX incluyen la proteína relacionada con dipeptidilaminopeptidasa, dipeptidil peptidasa 6, la proteína similar a dipeptidil peptidasa IV, y dipeptidil peptidasa VI. DPPX está altamente conservada de manera que incluso DPPX de especies relacionadas sólo a distancia con los humanos es apropiada para provocar la unión específica con anticuerpos anti-DPPX humanos. Esto se considera
60 verdad para todas las isoformas humanas de la proteína DPPX. Además, se sabe que, por ejemplo, los epítopos de clase I MHC lineales tienen una longitud de unos 8 a 11 aminoácidos. Por lo tanto, en un homólogo de DPPX, las regiones de entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, conservadas entre las respectivas especies y los humanos, en principio ya son suficientes para obtener unión específica de anticuerpos anti-DPPX humanos. En conexión con esto, las secuencias conservadas que componen un epítopo conformacional pueden ser incluso más cortas. En consecuencia, "DPPX" con respecto a la presente invención se refiere a cualquier isoforma conocida de la proteína DPPX partiendo de eucariotas, preferentemente mamíferos, más preferentemente *Homo sapiens* o *Rattus norvegicus*.

Además, la unión específica a anticuerpos anti-DPPX humanos puede obtenerse también con homólogos de DPPX, como los homólogos de DPPX existentes de forma natural. También están incluidos los homólogos de DPPX existentes de forma no natural, como los homólogos derivados de homólogos de DPPX existentes de forma natural, por ejemplo, por eliminación o intercambio de aminoácidos individuales o múltiples o incluso de motivos o dominios de proteínas. En consecuencia, "DPPX" con respecto a la presente invención se refiere a homólogos de DPPX existentes de forma natural y no-natural.

Aquí se informa sobre 4 pacientes con un trastorno autoinmune novedoso caracterizado por desarrollo subagudo de disfunción cognitiva, agitación, alucinaciones, confusión, temblor en reposo y mioclono en asociación con anticuerpos contra DPPX, una unidad auxiliar de superficie celular del canal de potasio Kv4.2. En tres pacientes, los síntomas neurológicos estuvieron precedidos o superpuestos con diarrea severa y pérdida de peso hasta el punto de que dos pacientes se sometieron a extensivas biopsias endoscópicas sin un diagnóstico claro. El apoyo para una etiología autoinmune de este trastorno es proporcionado por la presencia de pleocitosis cerebroespinal (FCS), índice IgG aumentado o bandas oligoclonales, y la respuesta neurológica a la inmunoterapia intensiva o persistente. Usando anticuerpos de pacientes, tres conjuntos de experimentos establecieron DPPX como el antígeno principal: inmunoprecipitación de DPPX de cultivos de neuronas disociadas de hipocampo de rata; inmunotinción de DPPX en un ensayo basado en células; e inmunotinción de cerebro comparativa de ratones tipo salvaje y *DPPX*-nulo, mostrando abrogación de la reactividad de los anticuerpos de los pacientes con el cerebro de ratón *DPPX*-nulo, y revelando en un paciente anticuerpos adicionales para un antígeno desconocido.

DPPX tiene un papel crítico "poniendo a punto" los canales Kv4.2 mediante la remodelación de la puerta del canal⁵. Este tipo de canal de potasio pertenece a la familia del canal Shal K⁺ mamífero⁶ el cual tiene diferentes propiedades comparado con la familia Shaker K⁺ (Kv1), considerada previamente la diana de la encefalitis límbica asociada a anticuerpos, la neuromiotonia, o el síndrome de Morvan (los autoantígenos principales son LGI1 y Caspr2).^{7,8} Los canales Kv4.2 operan en el intervalo por debajo del umbral de potenciales de membrana.⁵ Esta corriente K⁺ tipo A somatodendrítica por debajo del umbral (I_{SA}) es un componente crítico del conjunto de corrientes iónicas controladas por voltaje que determinan la integración de la señal somatodendrítica.⁹ En muchas neuronas, los potenciales de acción que empiezan en el cono axónico se propagan hacia abajo por el axón pero también hacia atrás en las dendritas. En el árbol dendrítico, estos potenciales de acción sirven como señales que indican el estado de la salida de la neurona. La corriente transitoria por debajo del umbral I_{SA} en las dendritas atenúa esta propagación trasera de los potenciales de acción. Bajo condiciones de reposo I_{SA} cierra el potencial de acción al intentar extenderse en las regiones distales del árbol dendrítico. Sin embargo, cuando las entradas sinápticas excitadoras y los potenciales de acción somática están emparejados dentro de cierta ventana de tiempo, la consiguiente despolarización por debajo del umbral en las dendritas distales inactiva I_{SA} , y la atenuación de la propagación trasera del potencial de acción se reduce sustancialmente⁶. Se cree que esta interacción proporciona un mecanismo de detección de coincidencia que juega un papel importante en la señalización Ca⁺⁺ dendrítica, la integración de la señal y la plasticidad sináptica.^{5,6,9}

La función de los canales Kv4 depende de dos subunidades auxiliares, las proteínas intracelulares que interaccionan con el canal Kv (KChIPs),¹⁰ y el DPPX extracelular que se expresa predominantemente en las neuronas piramidales del hipocampo y el cerebelo, o DPP10 que tiene un perfil de expresión cerebral diferente y también está presente en el páncreas.^{11,12} DPPX está compuesto por un extremo N-terminal citoplasmático corto, un dominio transmembrana individual, y un extremo C-terminal extracelular grande. Dependiendo de la longitud del dominio citoplasmático, dos formas adultas, DPPX-S y DPPX-L, han sido identificadas.^{13,14} Consistente con la presencia de anticuerpos frente a epítopos extracelulares, nuestro suero de 4 pacientes y FCS reconocieron igualmente DPPX-S y DPPX-L, pero dos pacientes tuvieron anticuerpos adicionales frente a los epítopos intracelulares presentes en una construcción mutante en la cual se eliminó el extremo C-terminal extracelular.

La evaluación extensiva y el seguimiento prolongado de tres pacientes indican que este trastorno es severo, resultando en hospitalizaciones prolongadas o múltiples recaídas que ocurrieron normalmente cuando la inmunoterapia se redujo. El paciente # 1 fue capaz de volver a casa 15 meses después del inicio de los síntomas, y tuvo una recaída clínica cuando se redujo la prednisona. El paciente #2 pasó 10 meses en el hospital y actualmente continúa recibiendo tratamientos de rituximab cuando la cuenta de CD19 aumenta al 1%. En una ocasión el retraso del tratamiento resultó en recurrencia sintomática. El paciente #3 tuvo 7 recaídas en 5 años, la mayoría relacionadas con intentos de reducir la dosis de esteroides.

Los síntomas principales de este trastorno incluyen, agitación, mioclono, temblor, y convulsiones, que aunque no son características de un síndrome específico, son compatibles con hiperexcitabilidad neuronal, y consistentes con el aumento de excitabilidad observada en estudios electrofisiológicos de DPPX-knock outs.¹⁵ Curiosamente, una mutación de truncamiento de Kv4.2 identificada en un paciente con epilepsia del lóbulo temporal tuvo como resultado excitabilidad aberrante de las células que expresan el canal mutante.¹⁶ En conjunto, todos estos hallazgos sugieren que la alteración genética o inmunológica del complejo DPPX-Kv4.2 conduce a hiperexcitabilidad neuronal.

En la práctica clínica, la combinación de los síntomas neurológicos indicados arriba con diarrea severa y anticuerpos no específicos de órganos (p. ej. ANA) puede conducir a un amplio diagnóstico diferencial que incluye entre otros la enfermedad de Whipple o el lupus eritematoso, como ocurrió en nuestros pacientes.

En este momento el significado de la diarrea no está claro, pero este síntoma es notable porque fue severo, duró varias semanas y sólo ocurrió en el episodio inicial de encefalitis. Además, la revisión de nuestra experiencia con la

encefalitis sospechosa de ser autoinmune sugiere una relación entre la diarrea y la encefalitis asociada al anticuerpo DPPX. De hecho, entre 1429 casos de encefalitis de etiología poco clara examinados entre 2009 y 2012, sólo 11 tuvieron diarrea severa al inicio de los síntomas. Tres de estos 11 pacientes corresponden a los casos presentados aquí, y los otros 8 no tenían anticuerpos DPPX; ninguno de los 1418 casos sin diarrea tuvo reactividad cerebral en suero o FCS como la mostrada en las muestras positivas de anticuerpo DPPX (véase la Figura 5A). Una explicación plausible para la asociación de diarrea y encefalitis asociada a anticuerpo DPPX es que en algunos pacientes la respuesta inmune puede resultar de mimetismo molecular entre DPPX y un agente infeccioso aún desconocido. Este paradigma sería similar al mecanismo que desencadena los anticuerpos GM1 en pacientes con síndrome de Guillain-Barré e infección de *Campylobacter jejuni*. Además, la expresión robusta de DPPX por neuronas de plexo mientérico apoya la posibilidad de que los anticuerpos de los pacientes puedan alterar la función del plexo dando como resultado hiperactividad gastrointestinal, similar a la hiperexcitabilidad del SNC que se produce cuando DPPX es ablacionado en el cerebro.¹⁵

Sobre este trasfondo, la presente invención proporciona un polipéptido o proteína para el uso en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad autoinmune en un sujeto, cuyo polipéptido o proteína está caracterizado por comprender uno o varios epítomos derivados de la proteína DPPX.

En varias realizaciones de la invención el polipéptido o proteína de acuerdo con la invención incluye o tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID. N°: 2, correspondiente al dominio extracelular común a DPPX-S y DPPX-L de *Rattus norvegicus*. Alternativamente o adicionalmente, el polipéptido o proteína de acuerdo con la invención puede incluir o tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC. ID. N°: 3, correspondiente al dominio intracelular y transmembrana de DPPX-L de *Rattus norvegicus*. En otras realizaciones de la invención, el polipéptido o proteína de acuerdo con la invención, alternativamente o adicionalmente a lo anterior, incluye o tiene la secuencia de aminoácido de acuerdo con SEC. ID. N°: 4, correspondiente al dominio intracelular y transmembrana de DPPX-S de *Rattus norvegicus*.

De acuerdo con otras realizaciones de la invención, el polipéptido o proteína para el uso de acuerdo con la invención incluye o tiene una secuencia con al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99% de identidad de secuencia respecto a la proteína DPPX o las secuencias de acuerdo con SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 3 o SEC. ID. N°: 4. En otras realizaciones, la invención se refiere a un fragmento de la proteína o polipéptido DPPX con al menos 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos consecutivos de secuencias de acuerdo con SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 3 o SEC. ID. N°: 4. En realizaciones adicionales de la invención, la invención se refiere a un homólogo de dichos fragmentos con al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99% de identidad de secuencia de la secuencia de dichos fragmentos.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el polipéptido o proteína comprende otros aminoácidos, los cuales se unen de forma N-terminal o C-terminal y facilitan la purificación del polipéptido o proteína. Dichos aminoácidos pueden, por ejemplo, constituir ciertas secuencias o etiquetas que son específicamente reconocidas por otras moléculas, preferentemente proteínas, más preferentemente anticuerpos. Dichas etiquetas se conocen extensivamente en la técnica y comprenden, por ejemplo, etiquetas-bandera, etiquetas-myc o etiquetas-strep.

De acuerdo con otra realización preferida, el polipéptido o proteína para el uso de acuerdo con la invención, alternativamente o adicionalmente a lo anterior, está unido a una molécula reportera o a una fase sólida.

Una molécula reportera, dentro del alcance de la presente invención, se entiende que es una molécula que permite la detección directa o indirecta de la ausencia o presencia del polipéptido o proteína al que está unida, o la ausencia o presencia de un anticuerpo unido a ella. Se conocen en la técnica muchos tipos de molécula reportera, incluyendo por ejemplo etiquetas radioactivas, colorantes fluorescentes o proteínas (p. ej. fluoresceína, tetrametilrodamina, proteína fluorescente verde (GPF)), haptenos (p.ej. biotina) o enzimas (p. ej. alfa-galactosidasa A, luciferasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, apropiadas para la detección usando colorantes convertibles en enzimas). Dichas moléculas reporteras se pueden añadir a la proteína diana bien durante la síntesis de proteínas (inclusión de aminoácidos marcados radioactivamente, generación de proteínas de fusión) o tras la síntesis de proteínas por acoplamiento químico.

Una fase sólida en relación con la presente invención se refiere a cualquier sustrato sólido, al cual se puede unir un polipéptido o proteína, por ejemplo, por enlace covalente directo o indirecto o por enlace de afinidad vía enlaces de hidrógeno y/o interacción lipófila. Por ejemplo, el polipéptido o proteína de la presente invención se puede unir al material de una placa de microtitulación, la superficie de perlas magnéticas, una membrana (p. ej. una membrana de nitrocelulosa o PVDF) o a la fase sólida de una columna o placa de cromatografía.

La presente invención proporciona también un ácido nucleico y un vector que codifica un polipéptido o proteína de acuerdo con la invención. En una realización preferida, el vector de acuerdo con la presente invención se ajusta para la expresión del polipéptido o proteína de acuerdo con la invención.

Además, la presente invención proporciona también una célula que comprende un vector de acuerdo con la invención. Dicha célula puede ser utilizada por métodos conocidos en la técnica para producir copias del vector o para expresar

el polipéptido o proteína de acuerdo con la invención. Además, dicha célula también puede constituir un medio de diagnóstico para la detección del enlace de un anticuerpo al polipéptido o proteína p. ej. presentando el polipéptido o proteína en su superficie.

5 La presente invención proporciona también un método de diagnóstico in vitro caracterizado porque una muestra de un sujeto se pone en contacto con un polipéptido o proteína de acuerdo con la invención y se detecta el enlace de un anticuerpo de la muestra al polipéptido o proteína. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el método de diagnóstico in vitro comprende la detección del enlace de un anticuerpo de la muestra del paciente al polipéptido o proteína con un ensayo de inmunofluorescencia, micromatriz de proteínas, ELISA, ensayo de luminiscencia, blot, ensayo radioinmune, western blot o dot blot.

10 Dicha muestra puede ser una parte aislada del cuerpo humano, como una parte de tejido o fluido corporal, siempre que la parte contenga anticuerpos. Por ejemplo, la muestra es una muestra líquida como fluido cerebroespinal (licor), sangre o plasma sanguíneo, linfa o fluido intersticial, o una muestra de tejido como tejido de nódulo linfático, tejido neuronal, tejido muscular o tejido del tracto digestivo.

Además, se proporciona un kit de ensayo para la detección de anticuerpos en el contexto de la presente invención, comprendiendo dicho kit de ensayo uno o varios polipéptidos o proteínas de acuerdo con la invención.

20 Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o proteína de acuerdo con la invención. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender una o varias sustancias farmacéuticamente activas además del polipéptido o proteína de acuerdo con la invención.

25 Además, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender uno o varios excipientes farmacéuticos. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención es particularmente útil para la unión/absorción de anticuerpos de diferentes clases (IgA, IgG) de la sangre o plasma de un sujeto y en particular para el tratamiento extracorpóreo de un trastorno autoinmune. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica se puede emplear en inmunoféresis. En relación con esto, la presente invención proporciona también un dispositivo médico recubierto con un polipéptido, una proteína o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

30 Por ejemplo, dicho dispositivo médico puede ser un dispositivo empleado convencionalmente o en inmunoféresis u comprende superficies que entran en contacto con sangre o plasma del sujeto que se debe tratar.

35 Además, la presente invención proporciona también la base para un método para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de

- a. someter una muestra líquida de un sujeto a un método de diagnóstico in vitro de la invención, y
- b. tratar el sujeto con al menos una sustancia farmacéuticamente apropiada y/o intercambio de plasma

40 Una sustancia farmacéuticamente apropiada puede incluir una sustancia moduladora, en particular que suprime el sistema inmunitario del sujeto o una parte específica del mismo. Una sustancia farmacéuticamente apropiada puede ser también una sustancia para el tratamiento de los síntomas y condiciones relacionados con o causados por el trastorno autoinmune que debe ser tratado. La sustancia farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo consistente en Rituximab, prednisona, metilprednisolona, ciclofosfamida, lamotrigina, clonazepam, aripiprazol, fentoína, micofenolatemofetil, inmunoglobulina intravenosa, tacrolimus y ciclosporina.

45 Además, la presente invención proporciona las bases de un método para el tratamiento de un trastorno autoinmune en un sujeto, donde preferentemente el sujeto es un humano, comprendiendo el método las etapas de

- a. extraer sangre o plasma de un sujeto,
- b. poner en contacto la sangre o el plasma con la composición farmacéutica o el dispositivo médico de la invención para eliminar los anticuerpos asociados con la enfermedad, y
- c. readministrar la sangre o el plasma al sujeto.

50 En un método de este tipo, p. ej. la inmunoféresis, los anticuerpos asociados con la enfermedad son eliminados del plasma del sujeto poniendo en contacto la sangre o el plasma con el polipéptido o proteína inmovilizados de acuerdo con la invención. Los métodos correspondientes se han descrito p. ej. para el tratamiento de una cardiomiopatía dilatada basado en la secuencia del receptor beta-adrenérgico.¹⁷

Leyenda de las Figuras

Figura 1: Inmunoprecipitación de DPPX

65 En cultivos de neuronas disociadas del hipocampo de rata, los anticuerpos de los pacientes mostraron una reactividad intensa con la superficie celular neuronal (A), bar = 10 µm. La inmunoprecipitación del antígeno con el suero del caso

indizado se muestra en B, donde las proteínas precipitadas se corrieron en un gel y posteriormente se tiñeron con EZblue. Destacar que los anticuerpos de los pacientes precipitaron una proteína (banda cercana a 102 kDa en el carril P), la cual se extrajo del gel y se analizó mediante espectrometría de masas, demostrando secuencias de DPPX. El carril N es el precipitado obtenido del suero de control. El inmunoblot de estas proteínas con un anticuerpo policlonal de conejo contra DPPX (1:1000, desarrollado por BR) confirmó que la banda correspondía a DPPX (C).

Figura 2: Expresión de DPPX en el plexo mientérico

Sección transversal del intestino delgado de rata mostrando la capa muscular longitudinal (LM), la capa muscular circular (CM), la capa submucosa (SM), y el glánde (G). El plexo mientérico (Plex) se revela en agrupaciones de neuronas grandes entre las dos capas musculares. (Figura 2A)

En los 3 paneles (A-C) el núcleo de las neuronas (rojo) se marcó con anti-Hu (un marcador neuronal altamente específico). El panel A muestra en verde la inmunotinción de DPPX utilizando un anticuerpo policlonal de conejo (1:1000, desarrollado por BD); el panel B muestra la reactividad de DPPX del suero de uno de los pacientes con encefalitis, y el panel C muestra la falta de reactividad del suero de un sujeto sano. Destacar que DPPX se expresa predominantemente en el citoplasma-membrana de grandes agrupaciones neuronales del plexo mientérico, y se detecta también en un patrón longitudinal fino en CM y SM donde se localiza el plexo mientérico. Bar = 20 µm. (Figura 2B)

Figura 3: Análisis de anticuerpos DPPX utilizando un ensayo basado en células

Células HEK 293 expresando DPPX-L (ver más abajo en el ejemplo 4) inmunoteñidas con suero de pacientes (A, D, G, J) y un anticuerpo monoclonal de ratón contra DPPX (B, E, H, K). Las reactividades fusionadas se muestran en los correspondientes paneles (C, F, I, L). Estudios similares comparando el suero de un individuo sano y el anticuerpo monoclonal de DPPX se muestran en M y N, y las reactividades fusionadas en O. Notar que los anticuerpos de los pacientes inmunoreaccionan con las células que expresan DPPX. Bar = 10 µm.

Figura 4: Comparación de la reactividad del suero de pacientes utilizando el cerebro de ratones mutantes *DPPX-nulo* y de tipo salvaje

La reactividad del suero de los pacientes con el hipocampo de ratones tipo salvaje se muestra en A, C, E y G. La reactividad del anticuerpo DPPX policlonal de conejo con el hipocampo de ratones de tipo salvaje se muestra en I. Los paneles a la derecha muestran los resultados de un experimento similar pero utilizando el hipocampo de ratones *DPPX-nulo*. Destacar que las reactividades de los sueros de los tres primeros pacientes (casos 1, 2 y 3 de la Tabla 1) y el anticuerpo DPPX policlonal de conejo están abrogados en el hipocampo de ratones *DPPX-nulo* (paneles B, D, F, J). El paciente 4, no incluido en la tabla (paneles G y H) mostró la reactividad remanente con el hipocampo de ratones *DPPX-nulo* indicando que este paciente tenía dos anticuerpos, uno contra DPPX y otro contra un antígeno desconocido. Bar = 200 µm.

Figura 5: Inmunotinción de cerebro de rata con el suero de un paciente

Secciones sagitales de cerebro de rata inmunoteñido con fluido cerebroespinal (FCS) de un paciente (A) y un individuo sano (B). Notar que el FCS del paciente muestra una intensa reactividad con el neuropilo del cerebro, predominantemente el hipocampo y el cerebelo, mientras que el control de FCS no produce reactividad. Bar = 500 µm.

Figura 6: Análisis de anticuerpos de pacientes utilizando un ensayo basado en células expresando un mutante (DPPXed-myc) con el dominio extracelular de DPPX anulado

Células HEK 293 expresando el constructo DPPXed-myc mutado inmunoteñido con el suero de pacientes (A, D, G, J) y un anticuerpo monoclonal Myc-tag de ratón diluido 1:500 (B, E, H, K). Las reactividades fusionadas se muestran en los correspondientes paneles (C, F, I, L). Estudios similares utilizando el suero de individuos sanos y el anticuerpo de anti-Myc-tag se muestran en M y N, y las imágenes fusionadas en O. Destacar que dos pacientes (paneles A y J) tenían anticuerpos que no reaccionaron con este constructo indicando que los epítomos objetivo estaban presentes sólo en el dominio extracelular (Figura 3); por contra, dos pacientes tenían anticuerpos que reaccionaron con este constructo indicando que reconocieron los epítomos intracelulares (D y G) adicionalmente a los epítomos extracelulares presentes en el constructo completo de DPPX (Figura 3) y en los cultivos de neuronas vivas. Bar = 10 µm.

Figura 7: Análisis de anticuerpos de pacientes utilizando un ensayo basado en células expresando Kv4.2

Células HEK 293 expresando Kv4.2 inmunoteñido con el suero de pacientes (A, D, G, J) y un anticuerpo policlonal de conejo (Alomone labs, #APC-023) contra Kv4.2 (B, E, H, K). Las reactividades fusionadas se muestran en los correspondientes paneles (C, F, I, L). Estudios similares comparando el suero de un individuo sano y el anticuerpo policlonal de conejo se muestran en M y N, y las imágenes fusionadas en O. Destacar que los anticuerpos del paciente no reconocen Kv4.2. Bar = 10 µm.

Ejemplos

En la presente se informa de las características clínicas e inmunológicas de 4 pacientes con síntomas neuropsiquiátricos prominentes (precedidos en 3 de ellos por diarrea intensa) y anticuerpos contra un novedoso antígeno de superficie celular, proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa (DPP6 o DPPX), una subunidad auxiliar de la superficie celular de los canales de potasio de Kv4.2. Adicionalmente a la conocida expresión robusta de DPPX en el hipocampo y cerebelo, los inventores muestran que DPPX se expresa también en el plexo mientérico.

La observación de los 4 pacientes con un principio subagudo de síntomas neuropsiquiátricos y suero o anticuerpos del FCS mostrando un patrón similar de inmunotinción del neuropilo de hipocampo y cerebelo de roedor, así como la inmunomarcación de la superficie celular de cultivos disociados de neuronas del hipocampo lleva a la inmunoprecipitación del antígeno objetivo. El suero o el FCS de 149 sujetos incluyendo los pacientes con la inflamación autoinmune y encefalopatías no-inflamatorias, e individuos normales sirvieron como controles.

Ejemplo 1: pacientes

Los pacientes se describen en detalle a continuación (casos 1 a 3) y se resumen en la Tabla 1. El cuarto caso era un hombre de 76 años que había desarrollado una diarrea prominente y pérdida de peso junto a una confusión que progresaba rápidamente, declive cognitivo, convulsiones, paso inseguro y evidencia de producción de IgG-intratecal (IgG índice 1,49); no está incluido en la tabla debido a información limitada y falta de seguimiento.

Paciente 1:

Un hombre de 61 años con un historial de obesidad, hipertensión, y un principio de diabetes *mellitus* de inicio adulto fue ingresado durante 4 semanas por dolor abdominal y diarrea seguida de un cambio subagudo en el estado mental, caracterizado por depresión, agresividad, retracción, alucinaciones visuales, mutismo, mioclonos y una exagerada respuesta al sobresalto. La resonancia magnética del abdomen mostró un hígado graso pero sin evidencia de tumor y un examen gastrointestinal extensivo fue negativo para leucocitos fecales, *clostridium difficile*, parásitos y huevos. Las biopsias endoscópicas de estómago, intestino delgado y colon mostraron únicamente gastritis crónica (suero H, positivo para IgG Pylori sin bacterias en la histología). La diarrea persistió durante un mes sin otros síntomas de disfunción autónoma.

Estudios del FCS, resonancia magnética y electroencefalograma (EEG) se describen en la Tabla 1. El PCR del FCS para HSV, VZV, *Tropheryma Whipplei* y enterovirus fue negativo. Los paneles reumatológicos, paraneoplásicos y de anticuerpos de la superficie celular neuronal (los cuales incluyeron también el receptor de glicina) fueron negativos. La exploración completa del cuerpo con TC y PET y ultrasonido testicular no revelaron ningún cáncer.

Se intubó brevemente al paciente al deteriorarse su estado mental, y se trató con metilprednisolona intravenosa (1000 mg/día x 5 días) con una notable mejora neurológica. Se le puso en tratamiento prolongado menguante de esteroides durante 4 meses y se transfirió a una instalación de atención médica especializada. Cuatro meses más tarde se volvió a readmitir debido a un empeoramiento de su estado mental e infección del tracto urinario. El tratamiento con antibióticos seguido de Ig IV (2 g/Kg durante 5 días) resultó en una breve mejora neurológica. A continuación, desarrolló sepsis y fue transferido a la UCI requiriendo traqueotomía y tubo PEG. Repetidas Ig IV no mejoraron su estado mental. Se le trató entonces con Rituximab (1000 mg iv x 2 dosis separadas por 15 días) y se tituló la prednisona a 5 mg en días alternos. El curso clínico se complicó por infecciones del tracto urinario y neumonía, mientras que su estado mental permaneció pobre durante 5 meses. Como mucho podía vocalizar algunas palabras y seguir órdenes simples. Un descubrimiento sorprendente durante el examen en esta fase de la enfermedad es la exagerada respuesta al sobresalto por ruido o contacto. Adicionalmente exhibió frecuentes episodios de mioclonos, disquinesia oral y paratonía; la fuerza muscular era normal.

Se le trató eventualmente con plasmaféresis. Después de este primer cambio de plasma fue capaz de conversar normalmente con sus examinadores y contestar preguntas, pero no lo suficiente como para participar en un test cognitivo formal. A continuación, recibió mensualmente pulsos intravenosos de ciclofosfamida con una mejora constante pero incompleta de la cognición. Fue capaz de volver a casa tras 15 meses desde la aparición de los síntomas. En el seguimiento tras 21 meses desde la aparición de los síntomas y después de recibir 9 dosis mensuales de ciclofosfamida intravenosa, continuaba en casa con la familia pero requería asistencia con muchas actividades cotidianas. En la prueba cognitiva, la orientación estaba relativamente preservada pero presentaba deficiencias de atención y concentración, función ejecutiva, abstracción, función espacio-visual y fluidez fonémica. Una prueba de memoria verbal reveló éxito en la codificación (requirió apunte). Consiguió una puntuación de 9 sobre 30 puntos en la Evaluación Cognitiva Montreal (MOCA). Perdió 45 kg durante el curso de la enfermedad.

Paciente 2:

En abril de 2008, una mujer de 45 años de edad presentaba una diarrea progresiva y una pérdida de peso de 30 kg. La endoscopia y la biopsia no pudieron encontrar una causa. Durante las siguientes 6 a 8 semanas notó deficiencias cognitivas, realizando un número creciente de errores en el trabajo. En julio, fue ingresada en el hospital por agitación y alucinaciones. En el examen se encontró paranoia, ansiedad, insomnio y se quejaba de sudoración durante el sueño. Estos síntomas junto con la identificación de anticuerpos antinucleares del suero (ANA > 2560) llevaron inicialmente

a un diagnóstico de lupus eritematoso.

En septiembre se transfirió a la paciente a una unidad de neurología. Nada más ingresar se encontró que padecía sacudidas mioclónicas ocasionales, temblor en reposo de todas las extremidades, marcado nistagmo bilateral horizontal e hiperreflexia generalizada con los dedos de los pies hacia abajo. La resonancia magnética del cerebro fue normal y el EEG mostró episodios intermitentes de actividad generalizada de onda baja theta y delta. Los extensos análisis de sangre para infección y desórdenes autoinmunes fueron negativos excepto para el anteriormente mencionado ANA (patrón homogéneo). Análisis del FCS reveló 15 células sanguíneas blancas (predominantemente linfocitos), concentración de proteína y glucosa normal y bandas oligoclonales sin pareja. TC de pecho, abdomen y pelvis sugería engrosamiento adnexal que se confirmó con ultrasonido. Un FDG-PET fue normal. Durante las siguientes 3 semanas se volvió cada vez más agitada con un empeoramiento del mioclono y cursó temblor en reposo de todas las extremidades. El Diazepam proporcionó un cierto alivio sintomático pero a lo largo de las siguientes 2 semanas desarrolló episodios de reducido nivel de conciencia y movimiento orofacial. La repetición de EEG demostró descargas epileptiformes generalizadas de bajo voltaje, y se inició medicación anti-epiléptica. La repetición de la resonancia magnética del cerebro fue normal. Sobre la base de una presumible inflamación encefalopática recibió metilprednisolona intravenosa (1 g diario durante 3 días) sin efecto. La frecuencia de las convulsiones empeoró y desarrolló frecuentes episodios de estadios epilépticos que fueron refractarios a numerosas medicaciones anti-epilépticas, necesitando en última instancia sedación, intubación y apoyo ventilatorio. Cualquier intento de disminuir la sedación resultaba en la recurrencia de los ataques epilépticos. En base a la lesión adnexal se llevó a cabo una histerectomía y una salpingo-ooforectomía bilateral. La patología mostró un útero fibroide. Se la empezó a tratar entonces con inmunoglobulina intravenosa (Ig IV) resultando en una mejora lenta y progresiva que permitió la extubación y el alta de la UCI.

En enero de 2009, el análisis del suero y del FCS reveló un autoanticuerpo novedoso reaccionando con la superficie celular neuronal. Este descubrimiento y la persistencia de los síntomas neurológicos llevaron a la iniciación del tratamiento con rituximab que se asoció con una recuperación más rápida y fue dada de alta en mayo de 2009. Posteriormente continuó mejorando y se discontinuó la medicación antiepileptica. Actualmente tiene una cognición normal y vive de forma independiente. Lleva a cabo controles regulares del conteo de linfocito CD 19 y recibe tratamiento adicional con rituximab cuando el conteo supera el 1%. En una ocasión este tratamiento fue retrasado provocando temblores recurrentes y nistagmo.

Paciente 3:

En junio 2006, esta mujer diestra de 58 años de edad desarrolló alucinaciones y falta de equilibrio y fue ingresada en el hospital. Los siguientes exámenes fueron normales: conteo de células sanguíneas y química, función tiroidea, anticuerpos de ANA y dsADN y estudios para la enfermedad de Lyme, fiebre de las montañas rocosas, virus de Coxsackie, Babesia y virus de la hepatitis C. La velocidad de eritrosedimentación fue ligeramente superior a 43. La resonancia magnética del cerebro mostró cambios no específicos en la materia blanca sin contraste. La radiografía del pecho fue normal. Los ultrasonidos carótidos no mostraron estenosis significativa. El EEG reveló una ralentización suave. El análisis del FCS mostró 11 células sanguíneas blancas/mm³, todas mononucleares, proteína 50 mg/dL y glucosa 74 mg/dL. El PCR del FCS para HSV, cultivos víricos, titulación de Lyme y antígeno de criptococo fueron negativos. Se encontró una banda oligoclonal. Fue visitada por especialistas de neurología, enfermedades infecciosas, medicina interna y psiquiatría, y se la trató con risperidona, gabapentina, escitalopram y carvedilol. Con estas medicaciones recuperó un 80% de su capacidad habitual y fue dada de alta.

En noviembre de 2006 desarrolló un incremento en la inestabilidad, con frecuentes caídas, temblores, disartria, alucinaciones recurrentes y sonambulismo, con lo que fue reingresada. La repetición de la resonancia magnética del cerebro, angiografía por resonancia magnética y angiografía cerebral fueron normales. La resonancia magnética abdominal mostró la aparición de un adenoma adrenal benigno. El EEG mostró una ralentización de fondo predominantemente en el hemisferio derecho. La TC de pecho, abdomen y pelvis mostró algún fluido alrededor del hombro, un páncreas homogéneamente activado y la lesión adrenal indicada anteriormente. La biopsia de la arteria temporal fue negativa. El FCS mostró 1 célula sanguínea blanca, 0 células sanguíneas rojas, glucosa a 87 mg/dL, proteína a 38 mg/dL y cultivos negativos. Los estudios para HSV, antígeno criptococal, virus del oeste del Nilo, enzima conversor de la angiotensina (ACE) y citología fueron todos negativos. Fue positivo para anti ADN monocadena, pero una vez negativo para anti doble cadena de ADN y una vez positivo a 62 (nl: < 25). Las pruebas negativas o normales incluyeron factor reumatoide, anticuerpo de anticardiolipina, IgG, SPEP, B12, SSA, SSB, Lyme, HSV, plomo, anticuerpo de histonas, LA, ANA, ANCA, antígeno de superficie de hepatitis B, ceruloplasmina C3, C4, RNP, Smith, RPR, CRP, B12, RF, crioglobulinas, mercurio y arsénico en la orina y un panel completo paraneoplásico. Se la trató con 60 mg diarios de prednisona y mejoró.

En el transcurso de 2 meses se redujo la prednisona a 10 mg y se evaluó en nuestra institución por primera vez en febrero de 2007. En el historial anterior eran destacables la hipertensión, colecistectomía y reemplazo de cadera. La medicación incluía 10 mg diarios de prednisona, pantoprazol, amlopídina, isosorbidemononitrato, carvedilol, clonidina, alendronato, levofloxacina y albuterol. Durante el examen estaba alerta y respondía al lenguaje normal, recordó 2/3 palabras y 3/3 con algún apunte. Tenía nistagmo congénito pero los nervios craneales por otro lado eran normales. Mostraba debilidad en dorsiflexión y en los tobillos. Sensación y reflejos eran normales. El andar era lento y mal coordinado. Se repitieron paneles reumatológicos y paraneoplásicos, porfirinas, beta-2-glicoproteínas, crioglobulinas

y anticuerpos para TPO, siendo todos negativos.

Se redujo hasta su eliminación la prednisona al mes siguiente y empeoró con alucinaciones, lentitud en el habla, temblores, mioclonos y ataxia, y fue ingresada en el hospital. La resonancia magnética del cerebro mostró un nuevo infarto no-agudo en el frontal derecho. La tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) del cerebro mostró una moderada hipoperfusión global. El EEG mostró una ralentización de fondo suave. La repetición del análisis de FCS fue normal. El ecocardiograma trans-esofágico mostró un pequeño defecto de comunicación interauricular. La repetición del angiograma cerebral mostró solamente pequeños cambios arterioescleróticos y bifurcaciones carótidas. La biopsia cerebral reveló un infarto sin evidencia de inflamación o vasculitis. La repetición del TC de pecho, abdomen y pelvis mostró los quistes renales y adenoma adrenal previamente mencionados. Fue tratada con esteroides por vía intravenosa, seguido de esteroides orales, aspirina, atorvastatina y sertralina. Sus síntomas neurológicos mejoraron y fue dada de alta con 80 mg diarios de prednisona. Posteriormente se redujo lentamente la prednisona y se añadieron lamotrigina, clonazepam y aripiprazol. Aunque los síntomas mejoraron continuó con disartria fluctuante, inestabilidad, temblores y mioclonos. El análisis del FCS en diciembre de 2007 mostró 1 célula blanca sanguínea, glucosa de 83 mg/dL, proteína de 53 mg/dL y bandas oligoclonales positivas. Se añadió micofenolatemofetil 100 mg dos veces al día.

En abril de 2008 se redujo aún más la dosis de prednisona. Entonces desarrolló herpes zóster y sus síntomas empeoraron con estado mental alterado y ataxia, y fue reingresada. Análisis del FCS mostró 53 células blancas sanguíneas (94% linfocitos y 6% mononuclear), glucosa de 70 mg/dL y proteína de 62 mg/dL. PCR para HSV, HHV-6, VZV, CMV, EBV, EEE, SLE, enterovirus y virus del oeste del Nilo fueron todos negativos. Se la trató con aciclovir intravenoso, se aumentó la dosis de prednisona y se discontinuó el micofenolato. En ese momento el análisis de FCS reveló un anticuerpo novedoso contra la superficie celular de las neuronas. Se comenzó la Inmunoglobulina intravenosa (Ig IV) 2g/kg y se la dio de alta con prednisona 80 mg diarios con una suave reducción y ciclos mensuales de Ig IV.

En septiembre de 2008 después de la reducción de la prednisona a 50 mg diarios, desarrolló un incremento en las alucinaciones. Se detuvo el Ig IV y se aumentó la dosis de esteroides, primero usando esteroides intravenosos y posteriormente esteroides orales. Se comenzó con Rituximab (650 mg semanalmente x 4 dosis). La repetición de las pruebas de FCS mostró ausencia de reactividad con la superficie celular de las neuronas. Mejoró inicialmente pero volvió a deteriorarse durante la lenta reducción de esteroides desde 80 mg diarios a 50 mg diarios. En noviembre de 2008 recibió 1 dosis de 1000 mg de ciclofosfamida intravenosa, pero desarrolló neumonía criptocócica impidiendo tratamiento adicional. El análisis neuropsicológico mostró deficiencias en la velocidad motora visual, comprensión de órdenes complejas y secuencias manuales. Menos deficiente pero por debajo de las expectativas fue su capacidad memorística, atención auditiva, análisis visual y razonamiento por ensayo y error. Otros rendimientos en comprensión/expresión del lenguaje, juicio, memoria para historias y orientación fueron consistentes con la estimada función premórbida. Debido al agravamiento de la confusión se la trató 5 veces con plasmaféresis y prednisona continua diaria. La repetición del análisis neuropsicológico en enero de 2009 mostró un nivel de cognición general estable comparado con noviembre de 2008. El EEG continuo mostró ralentización de fondo pero debido a altibajos en el estado mental se añadió fenitoína. Mejoró y fue dada de alta para rehabilitación con prednisona 50 mg diarios y fenitoína 100 mg dos veces al día.

Fue reingresada en febrero de 2009 con una trombosis venosa bilateral profunda y embolia pulmonar y se la trató con anticoagulantes y colocación de un filtro en la vena cava inferior. Fue dada de alta en marzo de 2009 con 45 mg diarios de prednisona, 100 mg dos veces al día de fenitoína junto con medicación para sus otros problemas médicos. Se redujo gradualmente la prednisona a lo largo de 30 meses y se discontinuó eventualmente. En enero de 2012, tras 4 meses de detener el tratamiento de prednisona, no presentaba síntomas de empeoramiento y estaba alerta, concentrada, totalmente orientada con un 3/3 de memoria y buen conocimiento de hechos actuales. No presentaba temblores, mioclonos o alucinaciones. Camina con un paso ligeramente amplio y mal coordinado.

Resultados:

Los 4 pacientes (2 hombres, 2 mujeres; edades en el rango de 45-76 años) desarrollaron una encefalopatía de progreso rápido caracterizada por agitación, delirios, alucinaciones y espasmos mioclónicos, de los cuáles 3 pacientes se asoció con diarrea prominente de etiología indeterminada. Todos tenían ataques confirmados o con sospechas clínicas y pleocitosis en FCS con evidencia de producción intratecal de IgG o bandas oligoclonales. Información detallada de 3 pacientes mostró que tras múltiples inmunoterapias todos presentaron una recuperación sustancial hasta el último seguimiento (18-68 meses desde la aparición de los síntomas); no había más que una mínima información de seguimiento del cuarto paciente.

Ejemplo 2: inmunohistoquímica en cerebro, intestino delgado y cultivos neuronales de ratas

Inmunohistoquímica de cerebro y plexo mientérico de rata:

Ratas Wistar hembra fueron sacrificadas y se retiró el cerebro e intestino delgado, se seccionaron (cerebro de forma sagital, intestino transversalmente), se sumergieron en paraformaldehído 4% a 4°C durante 1 hora, se crioprotegieron con sucrosa al 40% durante 24 horas y se congelaron súbitamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido.¹⁸

Secciones de tejido de 7 μm de grosor fueron incubadas secuencialmente con H_2O_2 al 0,3% durante 20 minutos, suero de cabra al 10% durante 1 hora y suero del paciente o control (1:200), FCS (1:2) o un anticuerpo policlonal de conejo para DPPS (diluido 1:1000, anticuerpo desarrollado por BR) a 4°C durante una noche. Después de utilizar los anticuerpos biotinilados secundarios apropiados (cabra anti-humano BA-3000, o cabra anti-conejo BA-1000, laboratorios Vector, todos 1:2000), la reactividad fue desarrollada con el método avidin-biotin-peroxidasa tal y como se indica.¹⁸

Para el análisis de la expresión de DPPX en el intestino delgado de rata se utilizó anti-Hu IgG biotinilado humano (un marcador nuclear neuronal específico) con una dilución de 1:200 junto con los anteriormente indicados anticuerpos policlonales DPPX de conejo (1:1000) o los anticuerpos de DPPX del FCS de pacientes, seguido por avidina-rhodamina (1:500) y los anticuerpos fluorescentes secundarios adecuados a 1:1000 (IgG Alexa de cabra anti-conejo Fluor 488, o IgG Alexa de cabra anti-humano Fluor 488; Molecular Probes, Invitrogen). Se fotografiaron los resultados bajo microscopio de fluorescencia utilizando software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY).

15 Inmunocitoquímica en cultivos neuronales:

Cultivos neuronales de hipocampo de rata se prepararon como se indica.¹⁹ Neuronas vivas cultivadas en portaobjetos fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con suero del paciente o control (dilución final 1:750) o FCS (1:10). Después de eliminar el medio y tras lavado intensivo con tampón fosfato salino (PBS), se fijaron las neuronas con paraformaldehído al 4%, se permeabilizó con Triton X-100 0,1% y se inmunomarcó con IgG Alexa de cabra anti-humano Fluor 488 (1:1000).

20 Resultados:

25 Los 4 pacientes tenían anticuerpos en suero o FCS que reaccionaron con el neuropilo del cerebro de los roedores (Figura 1 suplementaria) y con la superficie celular de cultivos vivos no permeabilizados de neuronas disociadas de hipocampo de rata (Figura 1A).

30 El análisis inmunohistoquímico del intestino delgado demostró que DPPX se expresó específicamente en neuronas del plexo mientérico y que los anticuerpos de los pacientes también reaccionaron con el DPPX expresado en estas neuronas (Figura 2).

Ejemplo 3: inmunoprecipitación, espectrometría de masas e inmunoblot

35 Inmunoprecipitación e inmunoblot:

Se cultivaron neuronas de hipocampo de rata en pocillos de 100 mm (densidad 10^6 neuronas/pocillo) y se incubaron a 37 °C con suero filtrado del paciente (dilución 1:100) durante 1 hora. Se lavaron las neuronas con PBS, se lisaron con tampón (NaCl 150 mM, EDTA 1mM, tris(hidroximetil)aminometano [Tris]-HCl 100 mM, ácido desoxicólico 0,5%, Triton X-100 1% [Sigma Labs, St. Louis, MO], pH 7,5) conteniendo inhibidores de proteasa (P8340; Sigma Labs) y centrifugado a $16,1 \times 10^3$ g durante 20 minutos a 4 °C. Se retuvo el sobrenadante y se incubó con proteína A/G en perlas de agarosa (20423; Pierce, Rockford, IL) durante una noche a 4 °C, se centrifugó, y el pellet conteniendo las perlas con los anticuerpos de los pacientes ligados al antígeno de superficie celular se lavó con PBS, se alicuotó y se conservó a -80 °C. Se resuspendió una alícuota de este pellet en tampón de Laemmli, se hirvió durante 10 minutos, se separó en un gel de poliacrilamida para electroforesis al 4 a 15% en dodecil sulfato sódico, y se visualizó las proteínas con gel de tinción EZBlue (G1041; Sigma Labs). Las bandas visibles de proteína precipitada por el suero de los pacientes fueron extraídas del gel y analizadas utilizando espectrometría de masas en la instalación central de proteómica del Instituto de genómica en el Abramson Cancer Center (Universidad de Pennsylvania). Después de la caracterización del antígeno, se separaron alícuotas congeladas de los pellets indicados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico como se describió anteriormente, se transfirió a una membrana immobilon-P (Millipore IPVH00010) y se tiñó con el anticuerpo indicado contra DPPX (desarrollado por BR, 1:0000). La reactividad se desarrolló utilizando los anticuerpos secundarios apropiados biotinilados (1:2000) y el método de avidina-biotina peroxidasa y el método de diaminobencidina.

55 Espectrometría de masas:

Se cortaron las bandas de proteína de los geles y se enviaron a la instalación de proteómica de la Universidad de Pennsylvania. Se digirieron las bandas de proteína con tripsina y se analizaron con un espectrómetro de masas (Thermo Electron Corporation, San José, CA) de cromatografía nano líquida (nano LC)/nanospray/trampa de iones lineal (LIL) tal y como se indica.²⁰ Brevemente, se inyectaron 3 μL de muestra digerida con tripsina en el autocargador de Eksigent (Dublin, CA). Las muestras digeridas se separaron en una columna C18 de 10 cm, utilizando nano LC de Eksigent con un flujo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, gradiente de 45 minutos. Se utilizó nanospray en línea para la separación de los péptidos en LTQ y el software Xcalibur (Thermo Scientific, Waltham, MA) para la adquisición de datos en bruto. Los ficheros de los datos en bruto se exploraron utilizando Mascot (Matrix Science, Boston, MA) contra las bases de datos NCBI y Swissprot (Swiss Institute of Bioinformatics, Basilea, Suiza). El corte para la identificación de confianza de la proteína fue ≥ 70 .

Resultados:

La inmunoprecipitación del antígeno objetivo con el suero de uno de los pacientes, seguido de separación electroforética de proteínas y tinción en gel EZBlue mostró una banda distintiva de aproximadamente 100 kDa que no estaba presente en el inmunoprecipitado utilizando el suero de control (Figura 1B). La excisión de la banda del gel y el análisis mediante espectrometría de masas demostró que contenía secuencias derivadas de DPPX (puntuaciones 6441, 5945 y 383; puntuación de corte para identificación de confianza de la proteína ≥ 70). Este descubrimiento se confirmó mediante inmunoblotting del precipitado con un anticuerpo específico para DPPX (Figura 1C).

Ejemplo 4: inmunocitoquímica en células HEK293

Se transfectaron células HEK293 con plásmidos conteniendo DPPX-S de rata (dominio citoplásmico corto de 32 aminoácidos), DPPX-L (dominio citoplásmico largo de 88 aminoácidos), DPPXed-myc (constructo DPPX con dominio extracelular eliminado, y ligado a myc-tag), rata Kv4.2, DPPX humano (DPP6; Origene, secuencia NM_001039350.1; SEC ID N°: 1), humano DPP10, o plásmido sin inserto (control).¹¹ En otros experimentos se co-transfectaron las células con DPPX y Kv4.2 en relaciones equimolares. La reactividad de los anticuerpos de pacientes se evaluó como se ha indicado anteriormente.²¹ Para este propósito se cultivaron las células durante 24 horas tras la transfección antes de la evaluación. Las células transfectadas se fijaron con paraformaldehído 4%, se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% y se incubaron con suero de pacientes (1:200) o FCS (1:2) y dependiendo del antígeno de interés uno de los siguientes anticuerpos, DPPX (policlonal de conejo desarrollado por BR diluido 1:1000; policlonal de conejo abcam 41811 diluido 1:200 o monoclonal de ratón Sta Cruz #365147 diluido 1:500), Kv4.2 (policlonal de conejo, Alomone Labs, #APC-023 diluido 1:500), o anticuerpo myc-tag (monoclonal de ratón myc-tag 9B11, Cell Signaling, diluido 1:2000) durante 2 horas, y el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente (cabra anti-humano IgGAlexa Fluor 488; cabra anti-conejo IgG Alexa Fluor 555, o cabra anti-ratón IgGAlexa Fluor 555, todos a 1:1000). Los resultados se fotografiaron bajo un microscopio de fluorescencia utilizando el software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY).

Resultados:

Las células transfectadas con DPPX-S o DPPX-L de rata mostraron reactividad similar con suero o FCS de pacientes, consistente con el reconocimiento de un epítipo extracelular (la Figura 3 muestra la reactividad con DPPX-L; se obtuvo reactividad similar con DPPX-S, no mostrado). Los anticuerpos de los pacientes no reaccionaron con las células expresando Kv4.2 (Figura 2 suplementaria) y la reactividad con DPPX no se modificó cuando se coexpresó con Kv4.2 (datos no mostrados). Análisis posteriores utilizando un plásmido de DPPX de rata en el cual se eliminó el dominio extracelular (DPPXed-myc)¹¹ mostraron abrogación de la reactividad con el suero y FCS de los pacientes 1 y 4, y reactividad débil con el suero y FCS de los pacientes 2 y 3, indicando que los últimos dos pacientes tenían anticuerpos contra la superficie celular y epitopos intracelulares (paneles D y G de la Figura 3 suplementaria). Adicionalmente, las células HEK293 transfectadas con DPPX humano también mostraron reactividad con el suero o FCS de los 4 pacientes con anticuerpos DPPX (muestra que reaccionan con secuencias de DPPX de rata) mientras que no mostraron reactividad con el suero y FCS de 10 individuos sanos. Aunque DPPX y DPP10 tienen un 51% de identidad de la secuencia de aminoácidos,¹² los anticuerpos de los pacientes no reaccionaron con DPP10 (datos no mostrados). Globalmente estos descubrimientos demuestran que los anticuerpos de los pacientes son específicos de DPPX pero no del canal Kv4.2, y que algunos pacientes tienen anticuerpos contra ambos, los dominios intracelular y extracelular de DPPX.

A continuación, los inventores determinaron la reactividad del suero o FCS de los 149 controles con un ensayo basado en células coexpresando DPPX y Kv4.2. No se encontró que ninguno de estos sujetos tuviera anticuerpos que reaccionasen contra estas 2 proteínas, sugiriendo que los anticuerpos contra DPPX son específicos del subgrupo de pacientes con encefalitis autoinmune. Contrariamente, un paciente sin encefalitis con un timoma y miastenia seronegativa grave (incluido en los controles) tenía anticuerpos para DPP10, pero no para DPPX (Martínez-Hernández, datos no mostrados).

Ejemplo 5: inmunohistoquímica con ratones de tipo salvaje y *DPPX*-nulo

Se generaron y genotipificaron ratones de tipo salvaje y *DPPX*-nulo tal y como se ha indicado previamente.²² Los cerebros se extrajeron, seccionaron sagitalmente, procesaron y examinaron mediante el método estándar de inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa utilizando suero (1:200) o FCS (1:5) de los pacientes tal y como se ha indicado para el cerebro de rata.

Resultados:

Para acabar de confirmar la especificidad de los anticuerpos de los pacientes para DPPX, se comparó la inmunohistoquímica del cerebro de ratones de tipo salvaje con el de ratones *DPPX*-nulo. Estos experimentos demostraron abrogación de la reactividad del suero o FCS de 3 pacientes (aquellos mostrados en la Tabla 1) con el cerebro de ratones *DPPX*-nulo indicando que los anticuerpos de los pacientes se dirigieron únicamente contra DPPX, y que el paciente 1 tenía anticuerpos adicionales contra otra proteína de identidad desconocida (Figura 4H).

Tabla 1: Características clínicas, tratamiento y resultado

Sexo, edad	Síntomas iniciales	Síntomas principales	Otros	FCS inicial	Resonancia magnética del cerebro	EEG	Tratamiento (ordenado cronológicamente)	Resultado (duración del seguimiento)
M, 61	Dolor abdominal, diarrea, depresión, agresividad, retracción	Delirios paranoides, alucinaciones visuales, mutismo, temblor en reposo, mioclonos, exagerada respuesta al sobresalto	Reducido nivel de conciencia, capaz de detectar, pero no seguir órdenes, disquinesia orofacial. Sospecha de convulsiones	Células blancas sanguíneas 117, proteína 82, glucosa normal, índice IgG 1,36, no BOC. En el curso de 1 año: células blancas sanguíneas (1-28), proteína (34-111), IgG índice (0,92-1,36).	Múltiples resonancias: señal incrementada T2/FLAIR materia blanca periventricular y subcortical parcheada no-específica	Vídeo EEG: ralentización difusa, organización pobre; sin actividad epiléptica	Metilprednisolona IV, esteroides orales: mejora sustancial pero recaída con la reducción de esteroides. Ig IV: suave mejora. Rituximab: suave mejora. Plasmaféresis: mejora sustancial. Ciclofosfamida: estable, pero mejora incompleta.	Capaz de volver a casa tras 15 meses desde la aparición de los síntomas. Actualmente completando el 6 ciclo mensual de ciclofosfamida. Consciente de la persona, lugar y tiempo, capaz de seguir conversaciones simples. Episodios ocasionales de agitación. Déficits persistentes en la función ejecutiva, atención/concentración, funcionamiento visual-espacial (SE = 21 meses)
F, 45	Diarrea, pérdida de peso, déficit de memoria, insomnio, ansiedad	Agitación, paranoia, alucinaciones, ansiedad, insomnio. Convulsiones generalizadas recurrentes, episodios de estado epiléptico, mioclonos, temblor en reposo intenso	Reducido nivel de conciencia, hiperreflexia, movimientos orofaciales, nistagmo horizontal, ANA > 2560	Células blancas sanguíneas 15, proteína normal; glucosa normal, BOC positivo.	Múltiples resonancias: normal	Fondo con theta, delta y PLEDS generalizados intermitentes.	Metilprednisolona IV: sin respuesta. Ig IV: mejora lenta. Rituximab: mejora acelerada (permanece con rituximab periódico).	Buena. Recaida suave cuando se saltó rituximab. Viviendo de forma independiente, cognición normal. Dependiente de rituximab. (SE= 49 meses)

(continuación)

Sexo, edad	Síntomas iniciales	Síntomas principales	Otros	FCS inicial	Resonancia magnética del cerebro	EEG	Tratamiento (ordenado cronológicamente)	Resultado (duración del seguimiento)
F, 58	ninguno	Alucinaciones, lentitud en el habla, parasomnias, mioclonos temblor, paso inseguro	Psicosis (admitido en psiquiatría). Ataques clínicamente sospechosos, nistagmo congénito, anticuerpos contra ADN monocatenario; sin anticuerpos contra ADNds.	11 glóbulos blancos, proteína 50, índice IgG aumentado, BOC positivas	Múltiples resonancias: cambios no específicos en la materia blanca. Uno muestra infarto infarto frontal derecho no agudo pero nuevo (biopsia = resolución de infarto sin vasculitis	actividad de fondo lenta	<p>Prehnisona: mejora (recaída a diversas reducciones). IVlg y rituximab: efecto no claro.</p> <p>Ciclofosfamida: 1 ciclo (no más ciclos debido a neumonía criptocócica).</p> <p>Intercambio de plasma: mejora parcial.</p>	En alerta, prestando atención, totalmente orientado, memoria normal a corto plazo, conoce acontecimientos actuales. No presenta temblor, mioclonos ni alucinaciones. Camina con un paso ligeramente amplio. (SE= 68 meses)

BOC: bandas oligoclonales; SE= seguimiento

Referencias

- 5 1. Lancaster E, Martínez-Hernández E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology* 2011;77: 179-189.
2. Frechette ES, Zhou L, Galetta SL, Chen L, Dalmau J. Prolonged follow-up and CSF antibody titers in a patient with anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology* 2011;76:S64-S66.
- 10 3. Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, Tilley DH, Glaser CA. The Frequency of Autoimmune N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis Surpasses That of Individual Viral Etiologies in Young Individuals Enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin Infect Dis* 2012.
4. Gable MS, Gavali S, Radner A, Tilley DH, Lee B, Dwyer L, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis: report of ten cases and comparison with viral encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1421-1429.
- 15 5. Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de ME, Ma Y, Mo W, et al. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 2003;37:449-461.
- 20 6. Jerng HH, Pfaffinger PJ, Covarrubias M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 2004;27:343-369.
7. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010;9:776-785.
- 25 8. Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 2010;133:2734-2748.
- 30 9. Kim J, Nadal MS, Clemens AM, Baron M, Jung SC, Misumi Y, et al. Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2008;100:1835-1847.
- 35 10. Nadal MS, Amarillo Y, Vega-Saenz de ME, Rudy B. Evidence for the presence of a novel Kv4-mediated A-type K(+) channel-modifying factor. *J Physiol* 2001;537:801- 809.
11. Zagha E, Ozaita A, Chang SY, Nadal MS, Lin U, Saganich MJ, et al. DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem* 2005;280:18853-18861.
- 40 12. Qi SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien JL, Akinsanya KO. Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* 2003;373:179-189.
- 45 13. Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:197-201.
14. Nadal MS, Amarillo Y, Vega-Saenz de ME, Rudy B. Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res* 2006; 1094:1-12.
- 50 15. Kaulin YA, De Santiago-Castillo JA, Rocha CA, Nadal MS, Rudy B, Covarrubias M. The dipeptidyl-peptidase-like protein DPP6 determines the unitary conductance of neuronal Kv4.2 channels. *J Neurosci* 2009;29:3242-3251.
16. Singh B, Ogiwara I, Kaneda M, Tokonami N, Mazaki E, Baba K, et al. A Kv4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2006;24:245-253.
- 55 17. Rönspack W, Brinckmann R, Egnér R, Gebauer F, Winkler D, Jekow P, et. al. Peptide based adsorbers for therapeutic immunoadsorption. *Ther Apher Dial* 2003 Feb;7(1):91-7.
18. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain* 2005; 128:1764-1777.
- 60 19. Buchhalter JR, Dichter MA. Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell culture of rat hippocampus. *Brain Res Bull* 1991;26:333-338.
- 65 20. Strader MB, Tabb DL, Hervey WJ, Pan C, Hurst GB. Efficient and specific trypsin digestion of microgram to nanogram quantities of proteins in organic-aqueous solvent systems. *Anal Chem* 2006;78(1):125-134.
21. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case

series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008;7:1091-1098.

22. Clark BD, Kwon E, Maffie J, Jeong HY, Nadal M, Strop P, Rudy B. DPP6 Localization in Brain Supports Function as a Kv4 Channel Associated Protein. *Front Mol Neurosci* 2008;1:8.

23. Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 2009;65:424-434.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUCIO CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANQATS (ICREA) INSTITUT D INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES AUGUST PI I SUNYER (ID IBAPS)

<120> Método de diagnóstico para la detección de una enfermedad autoinmune y materias relacionadas

<130> 103083PC

<160> 4

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 801

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SOURCE

<222> 1 ..801

<223> /mol_type="proteína"/organismo="*Homo sapiens*"

<400> 1

ES 2 712 474 T3

Met Lys Glu Lys Ala Met Ile Lys Thr Ala Lys Met Gln Gly Asn Val
 1 5 10 15
 Met Glu Leu Val Gly Ser Asn Pro Pro Gln Arg Asn Trp Lys Gly Ile
 20 25 30
 Ala Ile Ala Leu Leu Val Ile Leu Val Ile Cys Ser Leu Ile Val Thr
 35 40 45
 Ser Val Ile Leu Leu Thr Pro Ala Glu Asp Asn Ser Leu Ser Gln Lys
 50 55 60
 Lys Lys Val Thr Val Glu Asp Leu Phe Ser Glu Asp Phe Lys Ile His
 65 70 75 80
 Asp Pro Glu Ala Lys Trp Ile Ser Asp Thr Glu Phe Ile Tyr Arg Glu
 85 90 95
 Gln Lys Gly Thr Val Arg Leu Trp Asn Val Glu Thr Asn Thr Ser Thr
 100 105 110
 Val Leu Ile Glu Gly Lys Lys Ile Glu Ser Leu Arg Ala Ile Arg Tyr
 115 120 125
 Glu Ile Ser Pro Asp Arg Glu Tyr Ala Leu Phe Ser Tyr Asn Val Glu
 130 135 140
 Pro Ile Tyr Gln His Ser Tyr Thr Gly Tyr Tyr Val Leu Ser Lys Ile
 145 150 155 160
 Pro His Gly Asp Pro Gln Ser Leu Asp Pro Pro Glu Val Ser Asn Ala
 165 170 175
 Lys Leu Gln Tyr Ala Gly Trp Gly Pro Lys Gly Gln Gln Leu Ile Phe
 180 185 190
 Ile Phe Glu Asn Asn Ile Tyr Tyr Cys Ala His Val Gly Lys Gln Ala
 195 200 205
 Ile Arg Val Val Ser Thr Gly Lys Glu Gly Val Ile Tyr Asn Gly Leu
 210 215 220
 Ser Asp Trp Leu Tyr Glu Glu Glu Ile Leu Lys Thr His Ile Ala His
 225 230 235 240
 Trp Trp Ser Pro Asp Gly Thr Arg Leu Ala Tyr Ala Ala Ile Asn Asp
 245 250 255
 Ser Arg Val Pro Ile Met Glu Leu Pro Thr Tyr Thr Gly Ser Ile Tyr
 260 265 270
 Pro Thr Val Lys Pro Tyr His Tyr Pro Lys Ala Gly Ser Glu Asn Pro
 275 280 285
 Ser Ile Ser Leu His Val Ile Gly Leu Asn Gly Pro Thr His Asp Leu
 290 295 300
 Glu Met Met Pro Pro Asp Asp Pro Arg Met Arg Glu Tyr Tyr Ile Thr
 305 310 315 320
 Met Val Lys Trp Ala Thr Ser Thr Lys Val Ala Val Thr Trp Leu Asn

ES 2 712 474 T3

Arg Ala Gln Asn Val Ser Ile Leu Thr Leu Cys Asp Ala Thr Thr Gly
 Val Cys Thr Lys Lys His Glu Asp Glu Ser Glu Ala Trp Leu His Arg
 Gln Asn Glu Glu Pro Val Phe Ser Lys Asp Gly Arg Lys Phe Phe Phe
 Ile Arg Ala Ile Pro Gln Gly Gly Arg Gly Lys Phe Tyr His Ile Thr
 Val Ser Ser Ser Gln Pro Asn Ser Ser Asn Asp Asn Ile Gln Ser Ile
 Thr Ser Gly Asp Trp Asp Val Thr Lys Ile Leu Ala Tyr Asp Glu Lys
 Gly Asn Lys Ile Tyr Phe Leu Ser Thr Glu Asp Leu Pro Arg Arg Arg
 Gln Leu Tyr Ser Ala Asn Thr Val Gly Asn Phe Asn Arg Gln Cys Leu
 Ser Cys Asp Leu Val Glu Asn Cys Thr Tyr Phe Ser Ala Ser Phe Ser
 His Ser Met Asp Phe Phe Leu Leu Lys Cys Glu Gly Pro Gly Val Pro
 Met Val Thr Val His Asn Thr Thr Asp Lys Lys Lys Met Phe Asp Leu
 Glu Thr Asn Glu His Val Lys Lys Ala Ile Asn Asp Arg Gln Met Pro
 Lys Val Glu Tyr Arg Asp Ile Glu Ile Asp Asp Tyr Asn Leu Pro Met
 Gln Ile Leu Lys Pro Ala Thr Phe Thr Asp Thr Thr His Tyr Pro Leu
 Leu Leu Val Val Asp Gly Thr Pro Gly Ser Gln Ser Val Ala Glu Lys
 Phe Glu Val Ser Trp Glu Thr Val Met Val Ser Ser His Gly Ala Val
 Val Val Lys Cys Asp Gly Arg Gly Ser Gly Phe Gln Gly Thr Lys Leu
 Leu His Glu Val Arg Arg Arg Leu Gly Leu Leu Glu Glu Lys Asp Gln
 Met Glu Ala Val Arg Thr Met Leu Lys Glu Gln Tyr Ile Asp Arg Thr
 Arg Val Ala Val Phe Gly Lys Asp Tyr Gly Gly Tyr Leu Ser Thr Tyr
 Ile Leu Pro Ala Lys Gly Glu Asn Gln Gly Gln Thr Phe Thr Cys Gly
 Ser Ala Leu Ser Pro Ile Thr Asp Phe Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Phe
 Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Leu His Gly Leu Asp Asn Arg Ala Tyr Glu
 Met Thr Lys Val Ala His Arg Val Ser Ala Leu Glu Glu Gln Gln Phe
 Leu Ile Ile His Pro Thr Ala Asp Glu Lys Ile His Phe Gln His Thr
 Ala Glu Leu Ile Thr Gln Leu Ile Arg Gly Lys Ala Asn Tyr Ser Leu
 Gln Ile Tyr Pro Asp Glu Ser His Tyr Phe Thr Ser Ser Ser Leu Lys
 Gln His Leu Tyr Arg Ser Ile Ile Asn Phe Phe Val Glu Cys Phe Arg
 Ile Gln Asp Lys Leu Leu Thr Val Thr Ala Lys Glu Asp Glu Glu Glu
 Asp

<210> 2
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<220>
 <221> SOURCE

ES 2 712 474 T3

<222> 1 ..748

<223> /mol_type="proteína"/organismo="Rattus norvegicus"

<400> 2

5

Thr Pro Ala Glu Asp Thr Ser Leu Ser Gln Lys Lys Lys Val Thr Val
1 5 10 15
Glu Asp Leu Phe Ser Glu Asp Phe Lys Ile His Asp Pro Glu Ala Lys
20 25 30
Trp Ile Ser Asp Lys Glu Phe Ile Tyr Arg Glu Arg Lys Gly Ser Val
35 40 45
Ile Leu Arg Asn Val Glu Thr Asn Asn Ser Thr Val Leu Ile Glu Gly
50 55 60
Lys Lys Ile Glu Ser Leu Arg Ala Ile Arg Tyr Glu Ile Ser Pro Asp
65 70 75 80
Lys Glu Tyr Ala Leu Phe Ser Tyr Asn Val Glu Pro Val Tyr Gln His
85 90 95
Ser His Thr Gly Tyr Tyr Val Leu Ser Lys Ile Pro His Gly Asp Pro
100 105 110
Gln Ser Leu Asp Pro Pro Glu Val Ser Asn Ala Lys Leu Gln Tyr Ala
115 120 125
Gly Trp Gly Pro Lys Gly Gln Gln Leu Ile Phe Ile Phe Glu Asn Asn
130 135 140
Ile Tyr Tyr Cys Ala His Val Gly Lys Gln Ala Ile Arg Val Val Ser
145 150 155 160
Thr Gly Lys Glu Gly Val Ile Tyr Asn Gly Leu Ser Asp Trp Leu Tyr
165 170 175
Glu Glu Glu Ile Leu Lys Ser His Ile Ala His Trp Trp Ser Pro Asp
180 185 190
Gly Thr Arg Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Asn Asp Ser Arg Val Pro Leu
195 200 205
Met Glu Leu Pro Thr Tyr Thr Gly Ser Val Tyr Pro Thr Val Lys Pro
210 215 220
Tyr His Tyr Pro Lys Ala Gly Ser Glu Asn Pro Ser Ile Ser Leu His
225 230 235 240
Val Ile Gly Leu Asn Gly Pro Thr His Asp Leu Glu Met Met Pro Pro
245 250 255
Asp Asp Pro Arg Met Arg Glu Tyr Tyr Ile Thr Met Val Lys Trp Ala
260 265 270
Thr Ser Thr Lys Val Ala Val Thr Trp Leu Asn Arg Ala Gln Asn Val
275 280 285
Ser Ile Leu Thr Leu Cys Asp Ala Thr Thr Gly Val Cys Thr Lys Lys
290 295 300
His Glu Asp Glu Ser Glu Ala Trp Leu His Arg Gln Asn Glu Glu Pro
305 310 315 320
Val Phe Ser Lys Asp Gly Arg Lys Phe Phe Val Arg Ala Ile Pro
325 330 335
Gln Gly Gly Arg Gly Lys Phe Tyr His Ile Thr Val Ser Ser Ser Gln
340 345 350
Pro Asn Ser Ser Asn Asp Asn Ile Gln Ser Ile Thr Ser Gly Asp Trp
355 360 365
Asp Val Thr Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Glu Lys Arg Asn Lys Leu Tyr
370 375 380
Phe Leu Ser Thr Glu Asp Leu Pro Arg Arg Arg His Leu Tyr Ser Ala
385 390 395 400
Asn Thr Val Asp Asp Phe Asn Arg Gln Cys Leu Ser Cys Asp Leu Val
405 410 415
Glu Asn Cys Thr Tyr Val Ser Ala Ser Phe Ser His Asn Met Asp Phe
420 425 430
Phe Leu Leu Lys Cys Glu Gly Pro Gly Val Pro Thr Val Thr Val His
435 440 445
Asn Thr Thr Asp Lys Arg Arg Met Phe Asp Leu Glu Ala Asn Glu Gln
450 455 460
Val Gln Lys Ala Ile Tyr Asp Arg Gln Met Pro Lys Ile Glu Tyr Arg
465 470 475 480
Lys Ile Glu Val Glu Asp Tyr Ser Leu Pro Met Gln Ile Leu Lys Pro
485 490 495

ES 2 712 474 T3

Ala Thr Phe Thr Asp Thr Ala His Tyr Pro Leu Leu Leu Val Val Asp
 Gly Thr Pro 500 Ser Gln Ser Val Ser Glu Arg Phe Glu 510 Val Thr Trp
 Glu Thr Val 515 Leu Val Ser Ser His Gly Ala Val Val Val Lys Cys Asp
 Gly Arg Gly Ser Gly Phe Gln Gly Thr Lys Leu His Glu Val Arg
 Arg Arg Leu Gly Phe 550 Leu Glu Glu Lys Asp Gln Met Glu Ala Val Arg
 Thr Met Leu Lys 580 Glu Gln Tyr Ile Asp Lys Thr Arg Val Ala Val Phe
 Gly Lys Asp Tyr Gly Gly Tyr Leu Ser Thr Tyr Ile Leu Pro Ala Lys
 Gly Glu 610 Asn Gln Gly Gln Thr Phe Thr Cys Gly Ser Ala Leu Ser Pro
 Ile Thr Asp Phe Lys Leu Tyr Ala Ser Ala Phe Ser Glu Arg Tyr Leu
 Gly Leu His Gly Leu Asp Asn Arg Ala Tyr Glu Met Thr Lys Leu Ala
 His Arg Val Ser 660 Ala Leu Glu Asp Gln Gln Phe Leu Ile Ile His Ala
 Thr Ala Asp Glu Lys Ile His Phe Gln His Thr Ala Glu Leu Ile Thr
 Gln Leu Ile Lys Gly Lys Ala Asn Tyr Ser Leu Gln Ile Tyr Pro Asp
 Glu Ser His Tyr Phe His Ser Val Ala Leu Lys Gln His Leu Tyr Arg
 Ser Ile Ile Gly Phe Phe Val Glu Cys Phe Arg Ile Gln Asp Lys Leu
 Pro Thr Ala Thr 740 Ala Lys Glu Asp Glu Glu Glu Asp 745

5 <210> 3
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..111
 <223> /mol_type="proteína"/organismo="*Rattus norvegicus*"

15 <400> 3
 Met Ala Ser Leu Tyr Gln Arg Phe Thr Gly Lys Ile Asn Thr Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Phe Pro Ala Pro Pro Glu Ala Ser His Leu Leu Gly Gly Gln Gly
 20 25 30
 Pro Glu Glu Asp Ala Gly Ser Lys Pro Leu Gly Pro Gln Ala Gln Ala
 35 40 45
 Val Ala Pro Arg Glu Arg Gly Gly Ala Gly Gly Arg Pro Arg Phe Gln
 50 55 60
 Tyr Gln Ala Arg Ser Asp Cys Asp Glu Glu Asp Glu Leu Val Gly Ser
 65 70 75 80
 Asn Pro Pro Gln Arg Asn Trp Lys Gly Ile Ala Ile Ala Leu Leu Val
 85 90 95
 Ile Leu Val Ile Cys Ser Leu Ile Val Thr Ser Val Ile Leu Leu
 100 105 110

20 <210> 4
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<220>
 <221> SOURCE

ES 2 712 474 T3

<222> 1..55

<223> /mol_type="proteína" /organismo="Rattus norvegicus"

<400> 4

5

```
Met Thr Thr Ala Lys Glu Pro Ser Ala Ser Gly Lys Ser Val Gln Gln
 1      5      10
Gln Asp Gln Glu Leu Val Gly Ser Asn Pro Pro Gln Arg Asn Trp Lys
 20      25      30
Gly Ile Ala Ile Ala Leu Leu Val Ile Leu Val Ile Cys Ser Leu Ile
 35      40      45
Val Thr Ser Val Ile Leu Leu
 50      55
```

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido o proteína que comprende uno o varios epítomos de proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa en un método *in vitro* de diagnóstico de un trastorno autoinmune del sistema nervioso en un sujeto.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido o proteína comprende
- la secuencia de acuerdo con la SEC. ID N°: 1 o una secuencia de aminoácido con al menos 70%, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99% de identidad de secuencia respecto a SEC. ID. N°: 1, y/o
 - la secuencia de acuerdo con la SEC. ID N°: 2 o una secuencia de aminoácido con al menos 70%, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99% de identidad de secuencia respecto a SEC. ID. N°: 2, y/o
 - la secuencia de acuerdo con la SEC. ID N°: 3 o una secuencia de aminoácido con al menos 70%, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99% de identidad de secuencia respecto a SEC. ID. N°: 3, y/o
 - La secuencia de acuerdo con la SEC. ID N°: 4 o una secuencia de aminoácido con al menos 70%, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99% de identidad de secuencia respecto a SEC. ID. N°: 4.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde
- el polipéptido o proteína tiene al menos 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos consecutivos de secuencias de aminoácido de acuerdo con SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 3 o SEC. ID. N°: 4; o
 - el polipéptido o la proteína es un homólogo con al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99% de identidad de secuencia respecto al polipéptido o proteína de (a).
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el polipéptido o proteína comprende otros aminoácidos, los cuales se unen de forma N-terminal o C-terminal y facilitan la purificación del polipéptido o proteína.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el polipéptido o proteína está unido a una molécula reportera o una fase sólida.
6. Uso de un ácido nucleico que codifica un polipéptido o proteína que comprende uno o varios epítomos de proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa en un método *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad autoinmune del sistema nervioso en un sujeto.
7. Uso de un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido o proteína que comprende uno o varios epítomos de proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa en un método *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad autoinmune del sistema nervioso en un sujeto, en el que el vector se ajusta para la expresión de dicho polipéptido o proteína.
8. Uso de una célula que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido o proteína que comprende uno o varios epítomos de proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa en un método *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad autoinmune del sistema nervioso en un sujeto.
9. Un método de diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central que comprende la etapa de detección de un anticuerpo que se une específicamente a proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa humana en una muestra de un sujeto.
10. El método de diagnóstico *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque la muestra de un sujeto se pone en contacto con un polipéptido o proteína que comprende uno o varios epítomos de proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa humana y se detecta la unión de un anticuerpo de la muestra al polipéptido o proteína.
11. El método de diagnóstico *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, caracterizado porque la unión de un anticuerpo de la muestra al polipéptido o proteína se detecta con un ensayo de inmunofluorescencia, micromatriz de proteínas, ELISA, ensayo de luminiscencia, blot, ensayo radioinmune, western blot o dot blot.
12. Uso de un kit de ensayo que comprende un polipéptido o proteína que comprende uno o varios epítomos de proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa en un método *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad autoinmune del sistema nervioso en un sujeto.
13. Uso de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o proteína que comprende uno o varios epítomos de proteína-6 similar a dipeptidil-peptidasa en un método *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad autoinmune del sistema nervioso en un sujeto.

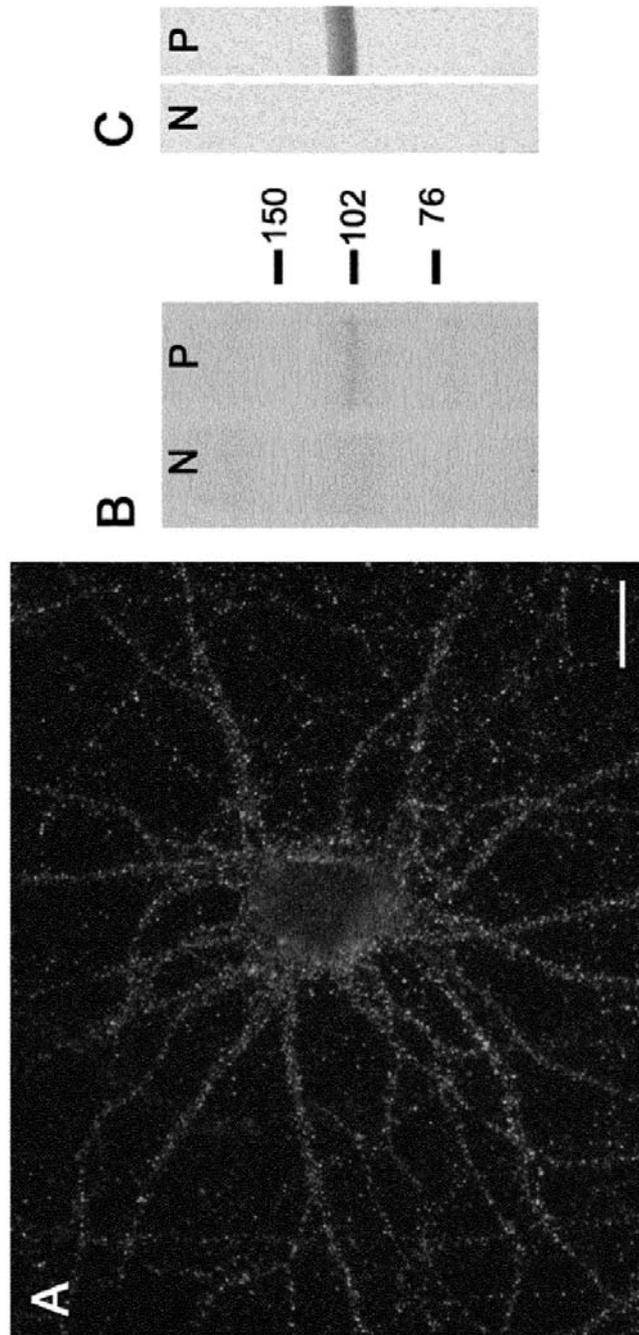


Figura 1

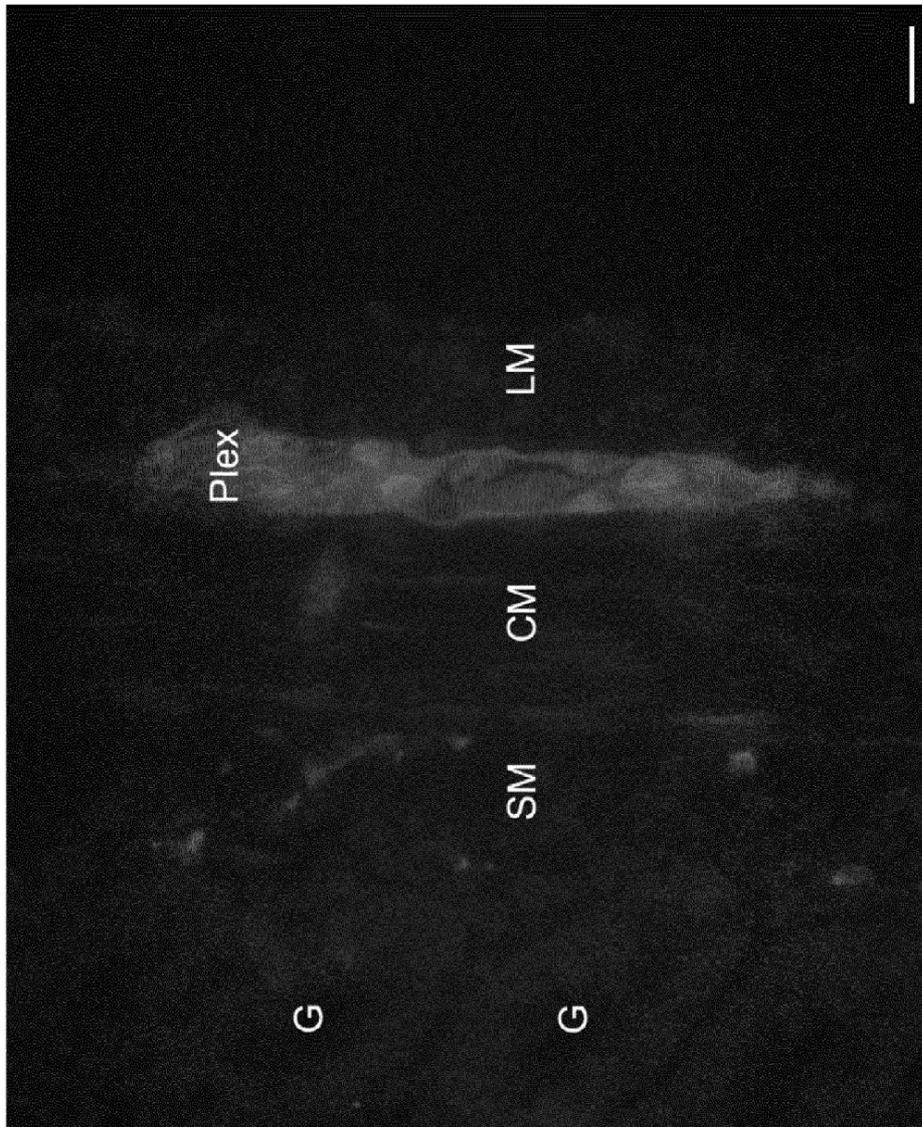


Figura 2A

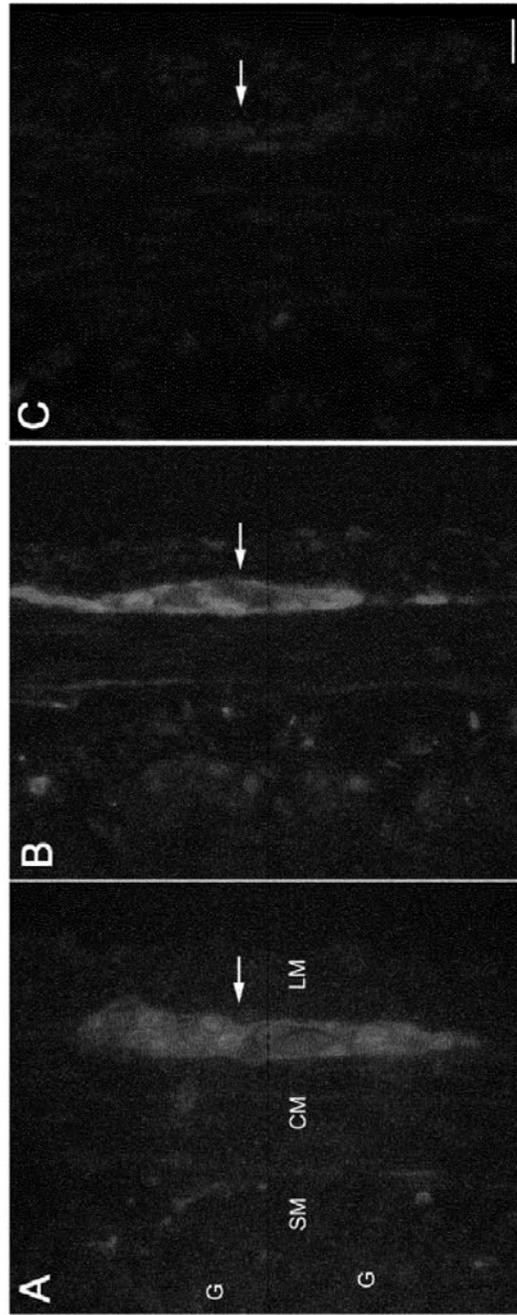


Figura 2B

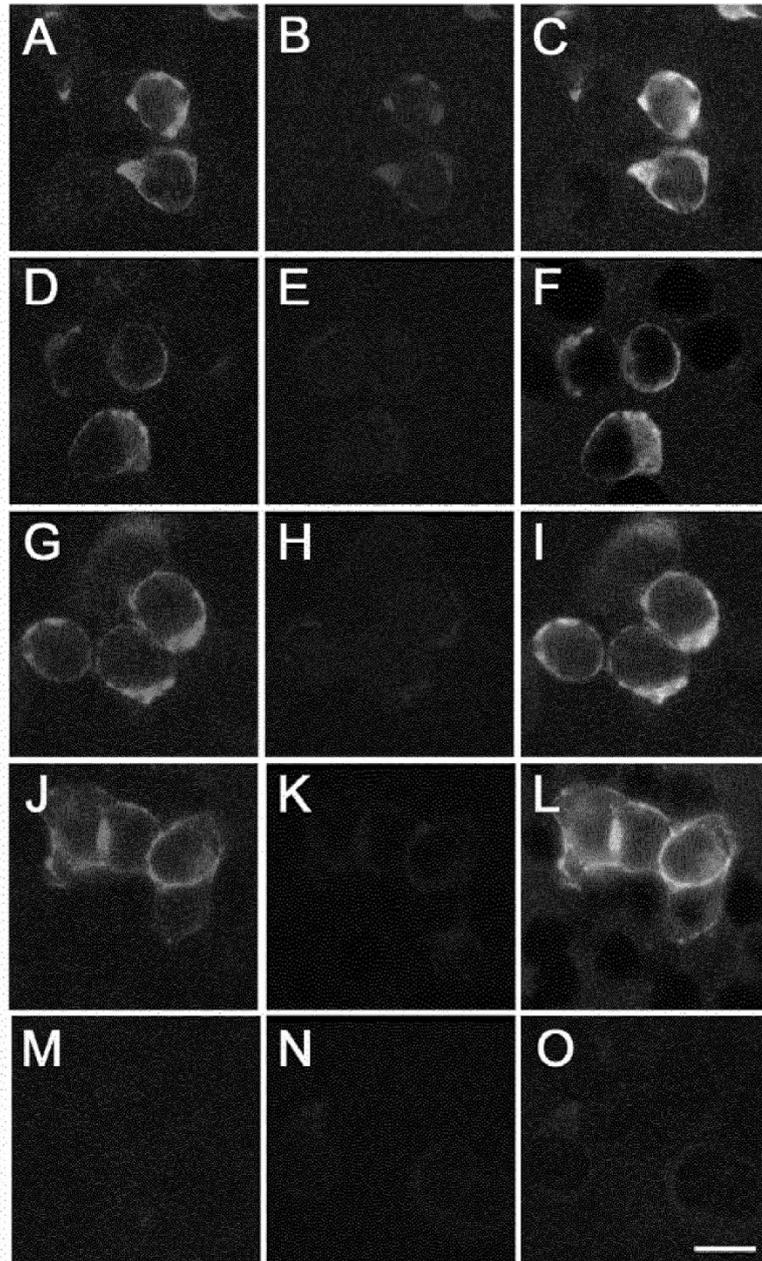


Figura 3

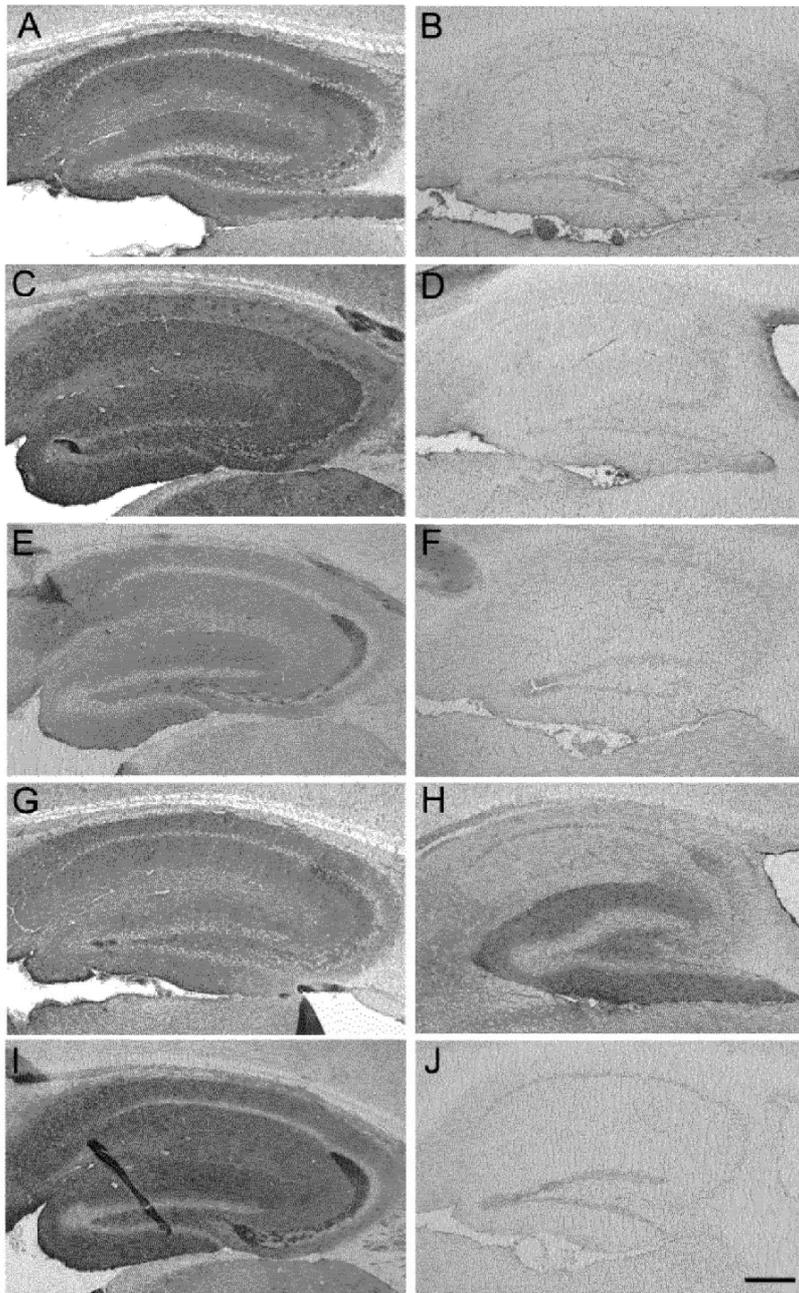


Figura 4

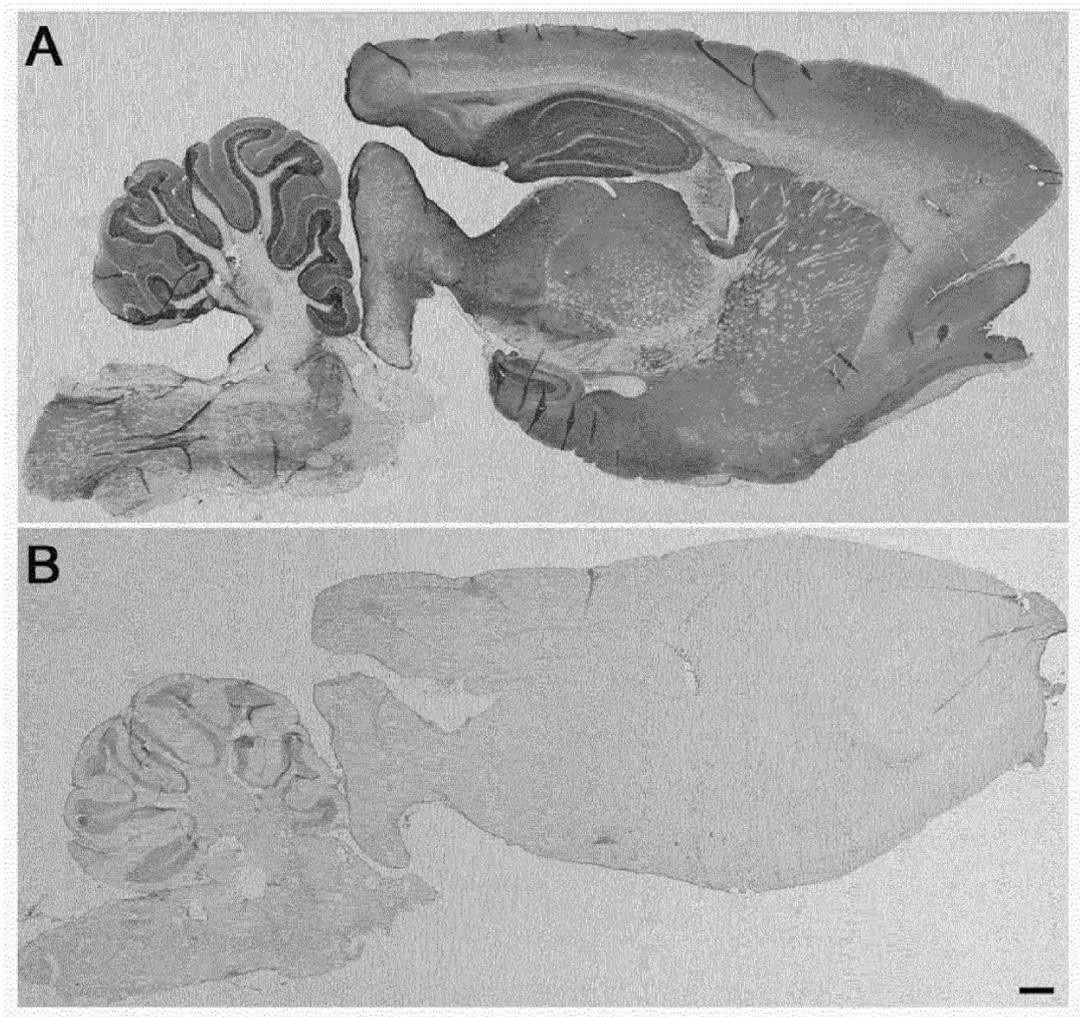


Figura 5

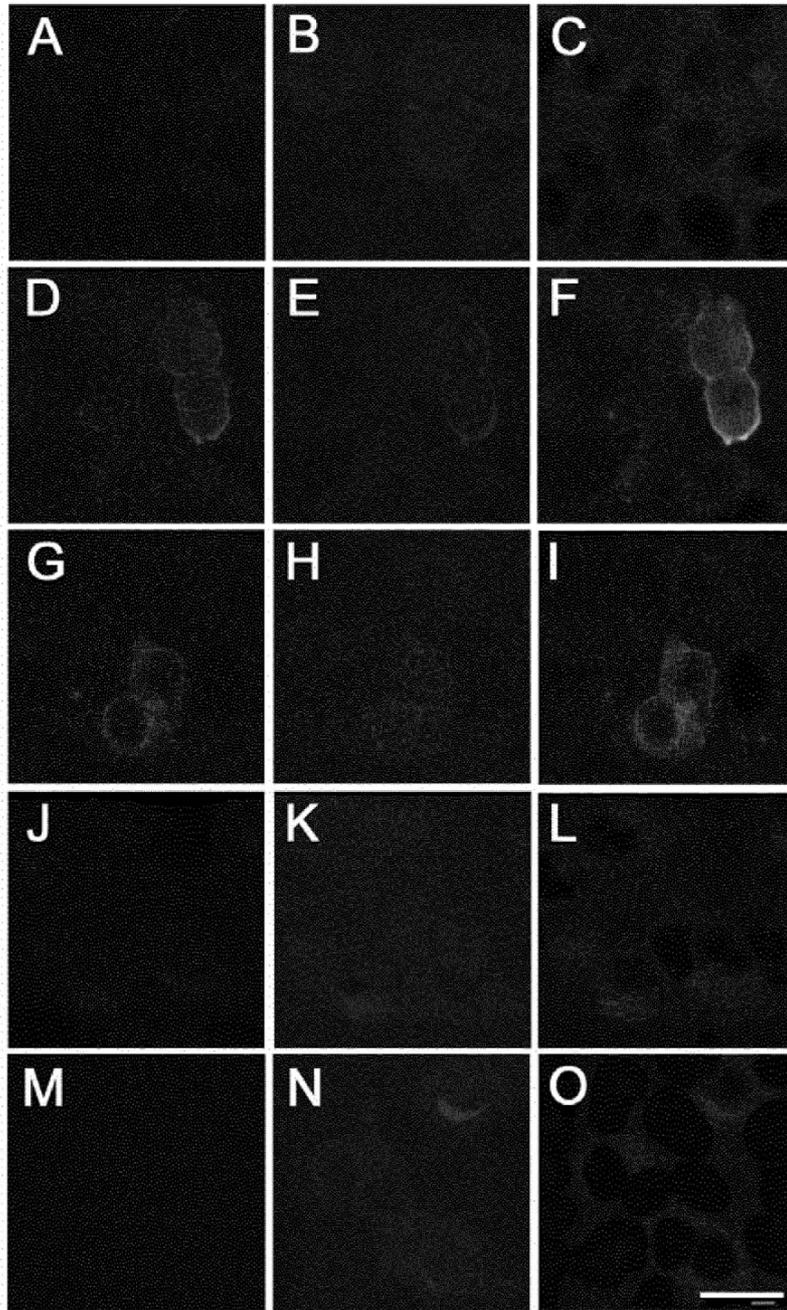


Figura 6

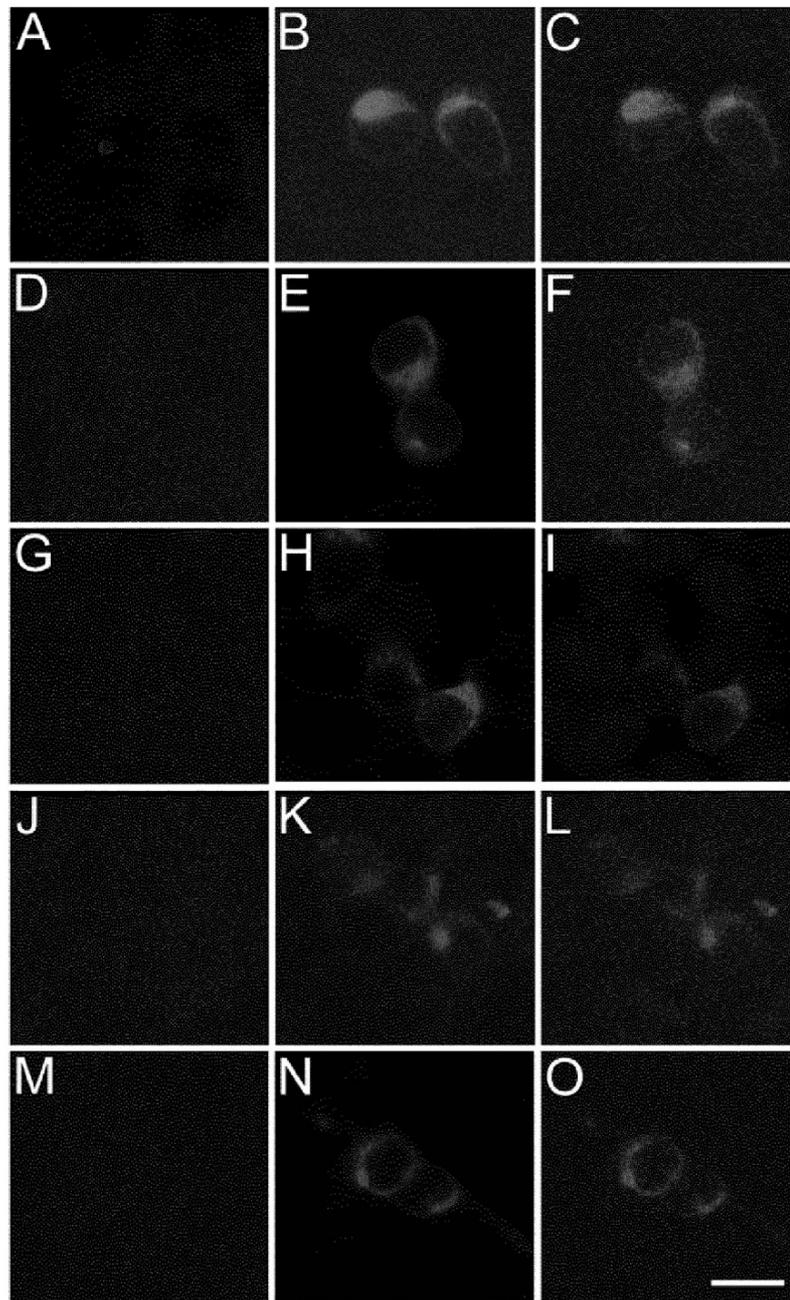


Figura 7