

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 117**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2015** **E 15001186 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 3086120**

54 Título: **Diagnóstico de una nueva enfermedad autoinmune**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2020

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (100.0%)
Seekamp 31
23560 Lübeck, DE**

72 Inventor/es:

**SCHARF, MADELEINE;
DETMANN, INGA-MADELEINE;
KOMOROWSKI, LARS;
MISKE, RAMONA;
PROBST, CHRISTIAN;
DENNO, YVONNE;
STÖCKER, WINFRIED;
TEEGEN, BIANCA;
MELZER, NICO;
WIENDL, HEINZ y
MEUTH, SVEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 748 117 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

Diagnóstico de una nueva enfermedad autoinmune

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de ataxia, que comprende la etapa de detectar en una muestra de un paciente un autoanticuerpo que se une a la neurocondrina; a un uso de un polipéptido que comprende neurocondrina o una variante de la misma que se une específicamente a un autoanticuerpo anti SEC ID NO 1 para el diagnóstico *in vitro* de ataxia.

10 El desarrollo de sistemas de diagnóstico para enfermedades neurológicas es un desafío continuo en la ciencia biomédica, sobre todo porque muchos de los síntomas encontrados pueden ser debidos a una gran diversidad de causas, que incluyen enfermedades heredadas genéticamente, abuso de drogas, malnutrición, infección, lesiones, enfermedades psiquiátricas, defectos inmunológicos y cáncer.

Debido a que una enfermedad neurológica rara vez se asocia con un patrón característico único de síntomas clínicos, frecuentemente es difícil proporcionar un diagnóstico fiable únicamente en base a la observación y al examen de los pacientes afectados o su historial médico.

15 La importancia de un diagnóstico precoz no puede exagerarse. Muchos trastornos neurológicos, sobre todo las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, no pueden curarse, pero hay disponibles medicamentos que pueden usarse para ralentizar su progresión. Cuanto más precoz sea el diagnóstico, mejores serán las posibilidades de aprovechar el espectro de medicamentos disponibles para el beneficio total del paciente.

20 Esto se cumple todavía más en el caso de enfermedades neurológicas asociadas con autoanticuerpos. En algunos casos, el vínculo entre un autoanticuerpo detectable específico y una afección es lo suficientemente fuerte como para permitir un diagnóstico inmediato.

25 Pero incluso si no es así, la detección de autoanticuerpos puede indicar al médico encargado los medios terapéuticos que pueden usarse para mejorar la afección del paciente. Hay una diversidad de inmunosupresores ampliamente usados que pueden usarse independientemente de la naturaleza del objetivo del autoanticuerpo. De manera alternativa, la aféresis puede ser usada para eliminar autoanticuerpos de la sangre del paciente. En muchos casos, los pacientes llevaron una vida normal después de un diagnóstico precoz y el tratamiento de una enfermedad neurológica autoinmune.

Los ensayos de diagnóstico basados en la detección de autoanticuerpos pueden corroborar también el diagnóstico de enfermedades distintas de las asociadas con autoanticuerpos. Si resulta que una muestra de sangre carece de autoanticuerpos específicos, es probable que esto ayude al médico encargado a excluir una gama de posibilidades y reducir de esta manera el espectro de afecciones plausibles.

30 Los ejemplos de afecciones neurológicas que coinciden con la aparición de autoanticuerpos incluyen la neuromielitis óptica, una enfermedad caracterizada por la pérdida de la visión y de la función de la médula espinal, y la encefalitis por anticuerpos contra el receptor de NMDA, que se asocia con disfunción autónoma, hipoventilación, ataxia cerebelosa, hemiparesia, pérdida del conocimiento o catatonía. Aunque la implicación de los autoanticuerpos y la naturaleza de estas afecciones como tales no se comprendían bien, muchas de estas enfermedades pueden diagnosticarse y tratarse ahora de manera eficiente debido a la disponibilidad de ensayos basados en la detección de autoanticuerpos.

Por lo tanto, es primordial el desarrollo de nuevos enfoques para distinguir las condiciones neurológicas asociadas con autoanticuerpos de las no asociadas con los mismos.

40 El problema subyacente a la presente invención es proporcionar reactivos, dispositivos y procedimientos novedosos que puedan ser usados para apoyar el diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad neurológica, en particular, una enfermedad neurológica asociada con uno o más síntomas del grupo que comprende trastornos cerebrales oculomotores, disartria, ataxia, astenia, asinergia, retraso en el tiempo de reacción, discronometría, inestabilidad de la marcha, dificultad con los movimientos oculares, disfagia, hipotonía, cambios inflamatorios del líquido cefalorraquídeo, dismetría y adiadococinesia.

45 Otro problema subyacente a la presente invención es proporcionar reactivos, dispositivos y procedimientos novedosos que puedan ser usados para distinguir enfermedades autoinmunes, en particular enfermedades autoinmunes neurológicas, de otras enfermedades distintas de las enfermedades autoinmunes, en particular para determinar el régimen de tratamiento más prometedor para el paciente afectado, más específicamente, si un tratamiento inmunosupresor es adecuado o no.

50 El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el tema de las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas.

En un primer aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un procedimiento de

diagnóstico de ataxia, que comprende la etapa de detectar en una muestra de un paciente un autoanticuerpo que se une a la neurocondrina, en el que la muestra es un fluido corporal que comprende anticuerpos.

En una realización preferente del primer aspecto, la muestra se selecciona de entre el grupo que comprende sangre completa, suero, líquido cefalorraquídeo y saliva.

5 En un segundo aspecto, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el uso de un polipéptido que comprende Neurocondrina o una variante de la misma que se une específicamente a un autoanticuerpo anti Neurocondrina para el diagnóstico de ataxia, que comprende la etapa de detección de autoanticuerpos que se unen a Neurocondrina.

10 En una realización preferente de cualquier aspecto o realización de la invención, el paciente tiene, o la enfermedad está asociada con, uno o más síntomas de entre el grupo que comprende alteraciones oculomotoras cerebrales, disartria, ataxia, astenia, asinergia, retraso en el tiempo de reacción, discronometría, inestabilidad de marcha, dificultad con los movimientos oculares, disfagia, hipotonía, cambios inflamatorios del líquido cefalorraquídeo, dismetría y adiadococinesia, que comprende además opcionalmente alteraciones de las señales cerebelosas, alteraciones de las señales del tronco encefálico, atrofia en imagen de resonancia magnética y un cáncer.

15 En una realización preferente de cualquier aspecto o realización de la invención, el polipéptido se proporciona en forma de una célula que comprende un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido o en forma de un tejido que comprende dicho polipéptido.

En una realización preferente de cualquier aspecto o realización de la invención, el polipéptido es un polipéptido recombinante y/o aislado.

20 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los presentes inventores de que existe una enfermedad neurológica autoinmune asociada con autoanticuerpos contra NCDN y ataxia.

Además, la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los presentes inventores de que existen autoanticuerpos contra NCDN y pueden detectarse en muestras de una serie de pacientes que sufren de ataxia, pero no en muestras obtenidas de sujetos sanos. Sin desear limitarse a ninguna teoría, la presencia de dichos autoanticuerpos sugiere que la actividad y la función NCDN y/o los efectores posteriores se ve afectada en los pacientes que tienen autoanticuerpos NCDN hasta el punto de que se producen síntomas neurológicos.

25

La NCDN es una proteína de 75k Da que se conserva evolutivamente de invertebrados a vertebrados. Las proteínas ortólogas de rata, murina y humana tienen una identidad de aminoácidos del 98%.

30 La NCDN es rica en hélices α (65%) que están organizadas como repeticiones en tándem. Se descubrió que la proteína interactúa con diversas proteínas de membrana del cerebro, incluidas Sema4C, MCHR1 y GRM5. Estas interacciones implican la parte C-terminal de la NCDN y la región proximal a la membrana de las proteínas de membrana respectivas ((Francke F., Ward R. J., Jenkins L., Kellett E., Richter D., Milligan G. y Bachner D., 2006, Interaction of neurochondrin with the melaninconcentrating hormone receptor 1 interferes with G protein-coupled signal transduction but not agonist-mediated internalization, *The Journal of biological chemistry*, 281, 43, 32496-32507; Wang H., Westin L., Nong Y., Birnbaum S., Bendor J., Brismar H., Nestler E., Aperia A., Flajolet M. y Greengard P., 2009, Norbin is an endogenous regulator of metabotropic glutamate receptor 5 signaling, *Science (New York, NY)*, 326, 5959, 1554-1557).

35

Se descubrió que la NCDN induce el crecimiento de neuritas cuando se sobreexpresa ectópicamente en células N2a de neuroblastoma cultivadas. Se demostró que NCDN recluta Dia, un factor de nucleación de actina que estimula el alargamiento del filamento de actina en el extremo positivo de polimerización para una localización subcelular específica. Este reclutamiento contribuye a la función de crecimiento neurítico de NCDN (Schwaibold E. M. y Brandt D. T., 2008, Identification of Neurochondrin as a new interaction partner of the FH3 domain of the Diaphanous-related formin Dia1, *Biochem Biophys Res Commun*, 373, 3, 366-372).

40

La NCDN modula la vía de señalización de GRM5 (Wang H., Westin L., Nong Y., Birnbaum S., Bendor J., Brismar H., Nestler E., Aperia A., Flajolet M. y Greengard P., 2009, Norbin is an endogenous regulator of metabotropic glutamate receptor 5 signaling, *Science (New York, NY)*, 326, 5959, 1554-1557). GRM5 responde principalmente al neurotransmisor de aminoácidos excitadores glutamato, se localiza en sitios perisinápticos y desempeña un papel importante en la función cerebral normal, así como en varios trastornos patológicos, incluida la esquizofrenia (Abe T., Sugihara H., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S., 1992, Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction, *The Journal of biological chemistry*, 267, 19, 13361-13368, Romano C., Sesma M. A., McDonald C. T., O'Malley K., Van den Pol A. N. y Olney J. W., 1995, Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain, *The Journal of comparative neurology*, 355, 3, 455-469, Nakanishi S., Nakajima Y., Masu M., Ueda Y., Nakahara K., Watanabe D., Yamaguchi S., Kawabata S. y Okada M., 1998, Glutamate receptors: brain function and signal transduction, *Brain research Brain research reviews*, 26, 2-3,

50

230-235, Conn P. J., Christopoulos A. y Lindsley C. W., 2009, Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders, *Nature reviews Drug discovery*, 8, 1, 41-54.) La expresión de NCDN mejora la señalización GRM5 en un sistema de expresión *in vitro*, mientras que la supresión génica condicional de NCDN en ratones transgénicos reduce la función GRM5. En línea con la función reducida de GRM5, los ratones con exclusión génica NCND muestran defectos en la inhibición previa al pulso y la actividad locomotora inducida por psicoestimulantes, dos fenotipos conductuales observados típicamente en modelos de esquizofrenia en roedores (Wang H., Westin L., Nong Y., Birnbaum S., Bendor J., Brismar H., Nestler E., Aperia A., Flajole M. y Greengard P., 2009, Norbin is an endogenous regulator of metabotropic glutamate receptor 5 signaling *Science* (New York, NY), 326, 5959, 1554-1557).

Se ha demostrado que la NCDN inhibe la activación de la proteína G inducida por MCHR y la entrada de calcio aguas abajo. MCHR1 es el receptor de la hormona concentradora de melanina implicado en la regulación del comportamiento de alimentación y los equilibrios energéticos (Lembo P. M., Grazzini E., Cao J., Hubatsch D. A., Pelletier M., Hoffert C., St-Onge S., Pou C., Labrecque J., Groblewski T., O'Donnell D., Payza K., Ahmad S. y Walker P., 1999, The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor, *Nature Cell biology*, 1, 5, 267-271). La NCDN es un regulador negativo de Ca^{2+} /fosforilación de la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) (Thr286) y es esencial para el proceso de aprendizaje espacial pero no para la diferenciación o crecimiento neurítico de la neurona. Además, la alteración del gen homocigoto específico del sistema nervioso resultó en una crisis epiléptica (Dateki M., Horii T., Kasuya Y., Mochizuki R., Nagao Y., Ishida J., Sugiyama F., Tanimoto K., Yagami K., Imai H. y Fukamizu A., 2005, Neurochondrin negatively regulates CaMKII phosphorylation, and nervous system-specific gene disruption results in epileptic seizure, *The Journal of biological chemistry*, 280, 21, 20503-20508).

La presente invención puede llevarse a cabo usando un polipéptido que comprende una NCDN de mamífero, preferentemente humana o variantes de la misma, que se une específicamente a un autoanticuerpo anti NCDN. En una realización más preferente, el polipéptido comprende NCDN codificada según el código de base de datos Q9UBB6 o una variante del mismo. A lo largo de la presente solicitud, cualquier código de base de datos citado se refiere a la base de datos Uniprot, más específicamente a la versión accesible en línea el 17 de Abril de 2015. La SEC ID NO1 representa una secuencia de nucleótidos que codifica para NCDN. En una realización preferente, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende SEC ID NO2, SEC ID NO3, SEC ID NO4, SEC ID NO5, SEC ID NO6, SEC ID NO7, SEC ID NO8, SEC ID NO2 y SEC ID NO9.

Las enseñanzas de la presente invención pueden llevarse a cabo no solo usando polipéptidos, en particular un polipéptido que comprende la secuencia nativa de NCDN, o ácidos nucleicos que tienen las secuencias exactas a las que se hace referencia explícitamente en la presente solicitud, por ejemplo, por función, nombre, secuencia o número de acceso, o implícitamente, sino también usando variantes de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos.

En una realización preferente, el término "variante", tal como se usa en la presente memoria, puede hacer referencia a al menos un fragmento de la secuencia de longitud completa a la que se hace referencia, más específicamente a una o más secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos que, con relación a la secuencia de longitud completa, está truncada en uno o ambos extremos por uno o más aminoácidos. Dicho fragmento comprende o codifica para un péptido que tiene al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150 o 200 aminoácidos sucesivos de la secuencia original o de una variante de la misma. La longitud total de la variante puede ser al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.

En otra realización preferente, el término "variante" se refiere no solo a al menos un fragmento, sino también a un polipéptido o un fragmento del mismo que comprende secuencias de aminoácidos que son al menos un 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idénticos a la secuencia de aminoácidos de referencia a la que se hace referencia o al fragmento de la misma, en el que los aminoácidos distintos de los esenciales para la actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de un antígeno para unirse a un (auto) anticuerpo, o el pliegue o la estructura del polipéptido se eliminan o sustituyen y/o uno o más de dichos aminoácidos esenciales se reemplazan de manera conservadora y/o se añaden aminoácidos de manera que la actividad biológica del polipéptido se conserve. El estado de la técnica comprende diversos procedimientos que pueden usarse para alinear dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos determinadas y para calcular el grado de identidad, véase, por ejemplo, Arthur Lesk (2008), *Introduction to bioinformatics*, Oxford University Press, 2008, 3ª edición. En una realización preferente, se usa el software ClustalW (Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007). *Clustal W y Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948) con la configuración predeterminada.

En una realización preferente, las variantes pueden comprender además modificaciones químicas, por ejemplo, marcadores isotópicos o modificaciones covalentes tales como glicosilación, fosforilación, acetilación, descarboxilación, citrulinación, hidroxilación y similares. La persona experta en la materia está familiarizada con los procedimientos para modificar polipéptidos. Cualquier modificación está diseñada de manera que no elimine la actividad biológica de la variante.

Además, las variantes pueden generarse también por fusión con otros polipéptidos conocidos o variantes de los mismos y comprenden partes o dominios activos, preferentemente que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% cuando se alinean con la parte activa de la secuencia de referencia, en el que la expresión "parte activa", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos, que es menor que la secuencia de aminoácidos de longitud completa o, en el caso de una secuencia de ácidos nucleicos, codifica para menos que la secuencia de aminoácidos de longitud completa, respectivamente, y/o es una variante de la secuencia natural, pero retiene al menos parte de la actividad biológica.

En una realización preferente, el término "variante" de un ácido nucleico comprende ácidos nucleicos cuya cadena complementaria híbrida, preferentemente bajo condiciones rigurosas, al ácido nucleico de referencia o de tipo salvaje. La rigurosidad de las reacciones de hibridación puede ser determinada fácilmente por una persona experta en la materia y, en general, es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para una hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas no tanto. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para hibridarse con cadenas complementarias presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión: Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, las temperaturas relativas más altas tenderían a hacer que las condiciones de reacción sean más estrictas, mientras que las temperaturas más bajas no las restringirán tanto. Para detalles y explicaciones adicionales de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel, F. M. (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Además, la persona experta en la materia puede seguir las instrucciones proporcionadas en el manual Boehringer Mannheim GmbH (1993) *La guía del usuario del sistema DIG para la hibridación sobre filtro*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania y en Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1991) *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:255-260 acerca de cómo identificar secuencias de ADN mediante hibridación. En una realización preferente, se aplican condiciones rigurosas para cualquier hibridación, es decir, la hibridación ocurre solo si la identidad de la sonda con la secuencia objetivo es del 70% o superior. Las sondas que tienen un menor grado de identidad con respecto a la secuencia objetivo pueden hibridarse, pero dichos híbridos son inestables y se eliminarán en una etapa de lavado bajo condiciones estrictas, por ejemplo, reduciendo la concentración de sal a 2 x SSC u, opcional y posteriormente, a 0,5 x SSC, mientras que la temperatura es, en orden creciente de preferencia, de aproximadamente 50°C - 68°C, aproximadamente 52°C - 68°C, aproximadamente 54°C - 68°C, aproximadamente 56°C - 68°C, aproximadamente 58°C - 68°C, aproximadamente 60°C - 68°C, aproximadamente 62°C - 68°C, aproximadamente 64°C - 68°C, aproximadamente 66°C - 68°C. En una realización particularmente preferente, la temperatura es de aproximadamente 64°C - 68°C o de aproximadamente 66°C - 68°C. Es posible ajustar la concentración de sal a 0,2 x SSC o incluso 0,1 x SSC. Pueden aislarse secuencias de ácidos nucleicos que tienen un grado de identidad con respecto a la secuencia de referencia o de tipo salvaje de al menos el 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%. En una realización preferente, el término variante de una secuencia de ácidos nucleicos, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma secuencia de aminoácidos y variantes de la misma que la secuencia de ácidos nucleicos de referencia, en línea con la degeneración del código genético.

La variante del polipéptido tiene la capacidad de unirse específicamente a los autoanticuerpos anti NCDN encontrados en pacientes que padecen la enfermedad identificada por los presentes inventores.

El polipéptido, que comprende NCDN o una variante del mismo, cuando se usa para llevar a cabo las enseñanzas de la presente invención, puede proporcionarse en cualquier forma y en cualquier grado de purificación, a partir de tejidos o células que comprenden dicho polipéptido en una forma endógena, más preferentemente células que sobreexpresan el polipéptido, lisados crudos o enriquecidos de dichas células, a polipéptido purificado y/o aislado que es esencialmente puro. En una realización preferente, el polipéptido es un polipéptido nativo, en el que la expresión "polipéptido nativo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido plegado, más preferentemente a un polipéptido plegado purificado a partir de tejidos o células, más preferentemente a partir de células o tejidos de mamíferos, opcionalmente a partir de tejidos o células no recombinantes. En otra realización preferente, el polipéptido es una proteína recombinante, en el que el término "recombinante", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido producido usando enfoques de ingeniería genética en cualquier etapa del proceso de producción, por ejemplo, fusionando un ácido nucleico que codifica el polipéptido a un promotor fuerte para la sobreexpresión en células o tejidos o mediante ingeniería de la secuencia del propio polipéptido. La persona experta en la materia está familiarizada con los procedimientos de diseño de ácidos nucleicos y polipéptidos codificados (por ejemplo, descritos en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning*, CSH or in Brown T. A. (1986), *Gene Cloning - an introduction*, Chapman & Hall) y para producir y purificar polipéptidos nativos o recombinantes (por ejemplo, los manuales "Strategies for Protein Purification", "Antibody Purification", "Purifying Challenging Proteins", "Recombinant Protein Purification", "Affinity Chromatography", "Ion Exchange Chromatography", "Gel Filtration (Size Exclusion Chromatography)", "Hydrophobic Interaction Chromatography", "Multimodal Chromatography" (2009/2010), publicado por GE Healthcare Life Sciences, y en Burgess, R. R., Deutscher, M. P. (2009), *Guide to Protein Purification*). En una realización preferente, un polipéptido es puro si al menos el 60, 70, 80, 90, 95 o 99 por ciento del polipéptido en la muestra respectiva consiste en dicho polipéptido según se determinada mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) SDS seguido de tinción con azul de Coomassie e inspección

visual.

Si el polipéptido que comprende NCDN o una variante del mismo se proporciona en forma de tejido, es preferente que el tejido sea tejido de mamífero, por ejemplo, de ser humano, rata, primate, burro, ratón, cabra, caballo, oveja, cerdo o vaca, más preferentemente tejido cerebral. Si se usa un lisado celular, es preferente que el lisado celular comprenda las membranas asociadas con la superficie de la célula. Si dicho polipéptido se proporciona en forma de una célula recombinante, es preferente que la célula recombinante sea una célula eucariota tal como una célula de levadura, más preferentemente una célula de un eucariota multicelular, tal como una planta, mamífero, rana o insecto, más preferentemente de un mamífero, por ejemplo, rata, humano, primate, burro, ratón, cabra, caballo, oveja, cerdo o vaca. Por ejemplo, la célula puede ser una célula HEK293 transfectada con un ácido nucleico que codifica funcionalmente el polipéptido de la invención. La persona experta en la materia está familiarizada con los procedimientos de preparación, transfección y cultivo de dichas células, por ejemplo, las descritas en Phelan, M. C. (2001), *Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture*, John Wiley.

El polipéptido usado para llevar a cabo las enseñanzas de la invención, incluyendo cualquier variante, se diseña preferentemente de manera que comprenda epítopos reconocidos y/o se unan específicamente a autoanticuerpos que se unen a NCDN. En una realización, dicho polipéptido comprende un tramo de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más, preferentemente al menos 9 pero no más de 16 aminoácidos consecutivos de NCDN. La persona experta en la materia está familiarizada con las directrices usadas para diseñar péptidos que tengan inmunogenicidad suficiente, por ejemplo, los descritos en Jackson, D. C., Fitzmaurice, C. J., Brown, L. E., Zeng, W. (1999), *Preparation and properties of totally synthetic immunogenes*, *Vaccine* Volume 18, Issues 3-4, September 1999, Pages 355-361; y Black, M., Trent, A., Tirrell, M. y Olive, C. (2010), *Advances in the design and delivery of peptide subunit vaccines with a focus on Toll-like receptor agonists*, *Expert Rev Vaccines*, 2010 Febrero; 9(2):157-173. Brevemente, es deseable que el péptido cumpla la mayor cantidad posible de los siguientes requisitos: (a) tiene un alto grado de hidrofiliidad, (b) comprende uno o más residuos seleccionados de entre el grupo que comprende aspartato, prolina, tirosina y fenilalanina, (c) tiene, para mayor especificidad, poca o ninguna homología con otros péptidos o polipéptidos conocidos, (d) necesita ser suficientemente soluble y (e) no comprende sitios de glicosilación o fosforilación a menos que se requiera por razones específicas. De manera alternativa, pueden seguirse enfoques bioinformáticos, por ejemplo, los descritos por Moreau, V., Fleury, C., Piquer, D., Nguyen, C., Novali, N., Villard, S., Laune, D., Granier, C. y Molina, F. (2008), *PEPOP: Computational design of immunogenic peptides*, *BMC Bioinformatics* 2008, 9:71.

El polipéptido, que comprende NCDN o una variante del mismo, cuando se usa según la presente invención, puede proporcionarse en cualquier tipo de conformación. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido esencialmente desplegado, parcialmente plegado o completamente plegado. En una realización preferente, el polipéptido se pliega en el sentido de que los epítopos esenciales para la unión al autoanticuerpo de la invención, o la proteína o variante del mismo en su totalidad, adoptan el pliegue adoptado por la proteína nativa en su entorno natural. La persona experta en la materia está familiarizada con los procedimientos adecuados para determinar si un polipéptido está plegado o no y, si lo está, qué estructura tiene, por ejemplo, proteólisis limitada, espectroscopía de RMN, espectroscopía de CD o cristalografía de rayos X (véase, por ejemplo, Banaszak L. J. (2008), *Foundations of Structural Biology*, Academic Press, or Teng Q. (2013), *Structural Biology: Practical Applications*, Springer), preferentemente se usa espectroscopía de RMN multidimensional.

El polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende secuencias de aminoácidos distintas de las tomadas a partir de la NCDN, en particular un marcador C-terminal o N-terminal, preferentemente un marcador C-terminal, que es, en una realización preferente, tal como se usa en la presente memoria, un motivo o polipéptido de secuencia adicional que tiene una función que tiene cierta función biológica o física y puede usarse, por ejemplo, para purificar, inmovilizar, precipitar o identificar el polipéptido de la invención. En una realización más preferente, el marcador es una secuencia o dominio capaz de unirse específicamente a un ligando, por ejemplo, un marcador seleccionado de entre el grupo que comprende marcadores His, tiorredoxina, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, un marcador fluorescente, por ejemplo, del grupo que comprende proteína verde fluorescente.

El polipéptido puede ser un polipéptido inmovilizado. En una realización preferente, el término "inmovilizado", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula unida a un vehículo sólido insoluble en una solución acuosa, más preferentemente mediante un enlace covalente, interacciones electrostáticas, encapsulación o atrapamiento, por ejemplo, desnaturalizando un polipéptido globular en un gel, o mediante interacciones hidrófobas, más preferentemente mediante uno o más enlaces covalentes. Se han descrito diversos vehículos adecuados, por ejemplo, superficies de papel, poliestireno, metal, silicio o vidrio, canales microfluidicos, membranas, perlas tales como perlas magnéticas, medios para cromatografía en columna, biochips, geles de poliacrilamida y similares en la literatura, por ejemplo, en Kim, D., y Herr, A. E. (2013), *Protein immobilisation techniques for microfluidic assays*, *Biomicrofluidics* 7(4), 041501. De esta manera, la molécula inmovilizada, junto con el vehículo insoluble, puede separarse de una solución acuosa de una manera directa, por ejemplo, mediante filtración, centrifugación o decantación. Una molécula inmovilizada puede ser inmovilizada de manera reversible o irreversible. Por ejemplo, la inmovilización es reversible si la molécula interactúa con el vehículo a través de interacciones iónicas que pueden enmascararse mediante la adición de una alta concentración de sal o si la molécula se une mediante un enlace covalente escindible, tal como un puente disulfuro que puede ser escindido por

adición de reactivos que contienen tiol. Por el contrario, la inmovilización es irreversible si la molécula está unida al vehículo mediante un enlace covalente que no puede escindirse en solución acuosa, por ejemplo, un enlace formado mediante la reacción de un grupo epóxido y un grupo amina, tal como se usa frecuentemente para acoplar las cadenas laterales de lisina a columnas de afinidad. La proteína puede inmovilizarse indirectamente, por ejemplo, inmovilizando un anticuerpo u otra entidad que tenga afinidad con la molécula, seguido de la formación de un complejo para que el complejo molécula-anticuerpo sea inmovilizado. Se describen diversas formas de inmovilizar moléculas en la literatura, por ejemplo, en Kim, Kim, D., Herr, y A. E. (2013), Protein immobilization techniques for microfluidic assays, *Biomicrofluidics* 7(4), 041501. Además, diversos reactivos y kits para reacciones de inmovilización están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pierce Biotechnology.

5

Es esencial que la muestra usada para el diagnóstico en línea con la presente invención comprenda anticuerpos, a los que se hace referencia también como inmunoglobulinas. Típicamente, la muestra de un fluido corporal comprende un conjunto representativo de la totalidad de las inmunoglobulinas del sujeto. Sin embargo, la muestra, una vez proporcionada, puede someterse a un procesamiento adicional que puede incluir fraccionamiento, centrifugación, enriquecimiento o aislamiento de la totalidad de las inmunoglobulinas o cualquier clase de inmunoglobulina del sujeto, lo que puede afectar a la distribución relativa de las inmunoglobulinas de las diversas clases.

15

Los procedimientos y los usos descritos a lo largo de la presente solicitud pueden usarse para el diagnóstico de ataxia.

En otra realización preferente, la enfermedad es preferentemente un síndrome neurológico paraneoplásico, que se asocia con ataxia.

20

En una realización preferente, el término "diagnóstico", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de procedimiento destinado a obtener información instrumental en la evaluación de si un paciente sufre o es probable o más probable que el sujeto promedio o comparativo, preferentemente teniendo este último síntomas similares, haya sufrido cierta enfermedad o trastorno en el pasado, la esté sufriendo en el momento del diagnóstico o la sufra en el futuro, para descubrir cómo progresa o cómo es probable que progrese la enfermedad en el futuro o para evaluar la capacidad de respuesta de un paciente con respecto a cierto tratamiento, por ejemplo, la administración de fármacos inmunosupresores. En otras palabras, el término "diagnóstico" comprende no solo diagnosticar, sino también pronosticar y/o controlar el curso de una enfermedad o trastorno.

25

En muchos casos, la mera detección, en otras palabras, la determinación si hay presentes o no niveles detectables del anticuerpo en la muestra, es suficiente para el diagnóstico. Si puede detectarse el autoanticuerpo, esta será información instrumental para el diagnóstico del médico clínico e indica una mayor probabilidad de que el paciente padezca una enfermedad. En una realización preferente, puede determinarse la concentración relativa del anticuerpo en el suero, en comparación con el nivel que puede encontrarse en el sujeto sano promedio. Aunque en muchos casos puede ser suficiente determinar si los autoanticuerpos están presentes o no en la muestra, el procedimiento llevado a cabo para obtener información instrumental para el diagnóstico puede implicar determinar si la concentración es al menos 0,1, preferentemente 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 500, 1.000, 10.000 o 100.000 veces superior a la concentración encontrada en el sujeto sano promedio.

30

35

La persona experta en la materia apreciará que un médico normalmente no llega a la conclusión de si el paciente padece o no una enfermedad, una afección o trastornos únicamente en base a un único parámetro de diagnóstico, sino que debe tener en cuenta otros aspectos, por ejemplo, la presencia de otros autoanticuerpos, marcadores, parámetros sanguíneos, evaluación clínica de los síntomas del paciente o los resultados de imágenes médicas u otros procedimientos no invasivos tales como la polisomnografía, para llegar a un diagnóstico concluyente. Véase Baenkler H. W. (2012), General aspects of autoimmune diagnostics, in Renz, H., Autoimmune diagnostics, 2012, de Gruyter, página 3. El valor de un agente o procedimiento de diagnóstico puede residir también en la posibilidad de descartar una enfermedad, permitiendo de esta manera el diagnóstico indirecto de otra. En una realización preferente, el significado de cualquier síntoma o enfermedad a los que se hace referencia a lo largo de la presente solicitud está en línea con la comprensión de la persona experta en la técnica a partir del 17 de Abril de 2015, tal como lo demuestran los libros de texto y las publicaciones científicas.

40

45

Por lo tanto, el término "diagnóstico" no implica preferentemente que los procedimientos o agentes de diagnóstico según la presente invención sean definitivos y suficientes para finalizar el diagnóstico en base a un único ensayo, y mucho menos un parámetro, sino que puede referirse a una contribución a lo que se conoce como un "diagnóstico diferencial", es decir, un procedimiento de diagnóstico sistemático que considera la probabilidad de una gama de afecciones posibles en base a una gama de parámetros de diagnóstico. En consecuencia, el procedimiento, el polipéptido o el uso de la invención, opcionalmente para determinar si un paciente padece una enfermedad, puede comprender obtener una muestra de un paciente, preferentemente un paciente humano, determinar si hay presente en dicha muestra un autoanticuerpo que se une a NCDN, en el que dicha determinación se realiza poniendo en contacto la muestra con el polipéptido de la invención y detectando si se produce la unión entre dicho polipéptido y dicho autoanticuerpo, preferentemente usando un anticuerpo secundario marcado, más preferentemente usando un procedimiento de entre el

50

55

grupo que comprende radioinmunoensayo, transferencia Western, transferencia de línea, ELISA, indirecto e inmunofluorescente, en el que dicho autoanticuerpo se une a dicho polipéptido si está presente en la muestra, y diagnostica que el paciente padece o tiene más probabilidades de padecer dicho trastorno neurológico o cáncer si se determina que el autoanticuerpo está presente en la muestra.

5 El término "diagnóstico" puede hacer referencia también a un procedimiento o agente usado para distinguir entre dos o más afecciones asociadas con síntomas similares o idénticos.

El término "diagnóstico" puede hacer referencia también a un procedimiento o agente usado para elegir el régimen de tratamiento más prometedor para un paciente. En otras palabras, el procedimiento o agente puede estar relacionado con la selección de un régimen de tratamiento para un sujeto. Por ejemplo, la detección de autoanticuerpos puede indicar que
10 debe seleccionarse una terapia inmunosupresora, lo que puede incluir administrar al paciente uno o más fármacos inmunosupresores.

Como parte de la presente invención, un complejo que comprende un anticuerpo, preferentemente un autoanticuerpo, que se une al polipéptido de la invención, puede usarse o detectarse como parte de un procedimiento para diagnosticar una enfermedad. Puede usarse una muestra líquida que comprende anticuerpos de un sujeto para llevar a la práctica el
15 procedimiento. Dicha muestra líquida puede ser cualquier fluido corporal que comprenda un conjunto representativo de anticuerpos del sujeto, preferentemente una muestra que comprenda anticuerpos de la clase inmunoglobulina IgG del sujeto. Por ejemplo, una muestra puede ser líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre o suero sanguíneo, linfa, líquido intersticial y es preferentemente suero o LCR, más preferentemente suero.

La etapa de poner en contacto una muestra líquida que comprende anticuerpos con el polipéptido de la invención puede llevarse a cabo incubando una forma inmovilizada de dicho polipéptido en presencia de la muestra que comprende anticuerpos bajo condiciones que son compatibles con la formación del complejo que comprende dicho polipéptido y un anticuerpo. preferentemente un autoanticuerpo, que se une al polipéptido de la invención. La muestra líquida, entonces agotada de anticuerpos que se unen al polipéptido de la invención, puede eliminarse posteriormente, seguido de una o más etapas de lavado. Finalmente, puede detectarse el complejo que comprende el anticuerpo y el polipéptido. En una
20 realización preferente, la expresión "condiciones compatibles con la formación del complejo" son condiciones que permiten que las interacciones antígeno-anticuerpo específicas formen el complejo que comprende el polipéptido y el anticuerpo. En una realización preferente, dichas condiciones pueden comprender incubar el polipéptido en una muestra diluida 1:100 en tampón PBS durante 30 minutos a 25°C. En una realización preferente, el término "autoanticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a una molécula endógena del animal, preferentemente mamífero, que produce dicho autoanticuerpo, en el que el nivel de dicho anticuerpo es más preferentemente elevado en comparación con el promedio de cualquier otro anticuerpo que se une específicamente a dicha molécula endógena. En una realización más preferente, el autoanticuerpo es un autoanticuerpo que se une a NCDN. Dicho autoanticuerpo puede aislarse a partir de muestras tomadas de pacientes que padecen el trastorno neurológico caracterizado por dos o más, preferentemente todos, los síntomas seleccionados de entre el grupo que
25 comprende trastorno de movimiento mixto, disminución aguda del rendimiento visual, disartria y disgrafía.

En una realización preferente, la detección del complejo para el pronóstico, el diagnóstico o los procedimientos según la presente invención comprende el uso de un procedimiento seleccionado de entre el grupo que comprende técnicas de inmunodifusión, técnicas inmunolectroforéticas, inmunoensayos de dispersión de luz, inmunoensayos de dispersión de luz, técnicas de aglutinación, inmunoensayos marcados tales como los del grupo que comprende inmunoensayos radiomarcados, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de quimioluminiscencia y técnicas de inmunofluorescencia. La persona experta en la materia está familiarizada con estos procedimientos, que se describen también en el estado de la técnica, por ejemplo, en Zane, H. D. (2001), Immunology - Theoretical & Practical Concepts in Laboratory Medicine, W. B. Saunders Company, en particular en el Capítulo 14.

De manera alternativa, puede usarse una muestra que comprende tejido que comprende el polipéptido de la invención, en lugar de una muestra líquida. La muestra de tejido procede preferentemente de un tejido que expresa NCDN endógeno. Dicha muestra, que puede estar en la forma de una sección de tejido fijada a un soporte, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio para análisis microscópico, puede ponerse en contacto a continuación con el anticuerpo de la invención, preferentemente un autoanticuerpo, que se une al polipéptido de la invención. Preferentemente, el anticuerpo se marca para permitir la distinción de los anticuerpos endógenos que se unen al polipéptido de la invención, de manera que los complejos recién formados puedan detectarse y, opcionalmente, cuantificarse. Si la cantidad de complejos formados es menor que la cantidad encontrada en una muestra tomada de un sujeto sano, es probable que el sujeto desde el que se tomó la muestra examinada padezca una enfermedad.

Cualquier dato que demuestre la presencia o ausencia del complejo que comprende el anticuerpo y el polipéptido de la invención puede correlacionarse con los datos de referencia. Por ejemplo, la detección de dicho complejo indica que el paciente que proporcionó la muestra analizada ha padecido, está padeciendo o es probable que padezca en el futuro una enfermedad. Si un paciente ha sido diagnosticado previamente y se ejecuta nuevamente el procedimiento para obtener
55

información relevante para el diagnóstico, la cantidad de complejo detectado en ambas ejecuciones puede correlacionarse para conocer la progresión de la enfermedad y/o el éxito de un tratamiento. Por ejemplo, si se encuentra que la cantidad de complejo aumenta, esto sugiere que el trastorno está progresando, siendo probable que se manifieste en el futuro y/o que cualquier intento de tratamiento no tenga éxito.

5 En una realización preferente, se usa una microplaca, ELISA en membrana, transferencia en mancha ("dot-blot") o transferencia en línea ("line-blot") para llevar a cabo el procedimiento de diagnóstico según la invención. La persona experta en la materia está familiarizada con la configuración experimental, que se describe en el estado de la técnica (Raoult, D., y Dasch, G. A. (1989), The line blot: an immunoassay for monoclonal and other antibodies. Its application to the serotyping of gram-negative bacteria. *J. Immunol. Methods*, 125 (1- 2), 57-65; WO2013041540). Brevemente, Los uno o más antígenos de interés, en el caso de la presente invención, el polipéptido de la invención, pueden unirse a un vehículo, por ejemplo, membrana de nitrocelulosa, frecuentemente en combinación con antígenos y controles adicionales. El vehículo de nitrocelulosa se expone posteriormente a una muestra que comprende anticuerpos, tal como suero diluido. Si la muestra comprende un anticuerpo que se une al antígeno, se forma un complejo que puede detectarse, preferentemente mediante incubación con un anticuerpo secundario que se une a la región constante del primer anticuerpo, cuyo anticuerpo secundario comprende un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, un tinte fluorescente o, en una realización preferente, una enzima activa fusionada o unida al anticuerpo secundario, tal como fosfatasa alcalina, que puede analizarse fácilmente usando sustratos cromogénicos seguido de un simple examen visual.

20 En otra realización preferente, el pronóstico, el diagnóstico o los procedimientos en línea con las enseñanzas de la invención contemplan el uso de inmunofluorescencia indirecta. La persona experta en la materia está familiarizada con dichas técnicas y con la preparación de muestras adecuadas, que se describen en el estado de la técnica (US4647543; Voigt, J., Krause, C., Rohwäder, E., Saschenbrecker, S., Hahn, M., Danckwardt, M., Feirer, C., Ens, K., Fechner, K., Barth, E., Martinetz, T., y Stocker, W. (2012), Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, doi:10.1155/2012/65105; Bonilla, E., Francis, L., Allam, F., et al., Immuno-fluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients, *Clinical Immunology*, vol. 124, no. 1, pp. 18-21, 2007). Brevemente, un vehículo, tal como un cubreobjetos de vidrio para uso en microscopía, es revestido con células o secciones de tejido que comprenden el antígeno, en el caso de la presente invención, el polipéptido comprende una o más secuencias de NCDN o una variante de la misma. El vehículo que comprende el antígeno se expone a una muestra del paciente que comprende anticuerpos, tal como suero diluido. Si la muestra comprende un anticuerpo que se une al antígeno, el complejo resultante puede detectarse, preferentemente mediante incubación con un anticuerpo secundario que comprende un tinte fluorescente, tal como fluoresceína, seguido de un examen visual usando microscopía de fluorescencia. Los reactivos, dispositivos y paquetes de software adecuados están disponibles comercialmente, por ejemplo, en EUROIMMUN, Lübeck, Alemania.

35 Una muestra puede someterse a un ensayo que determina solo si un autoanticuerpo que se une a NCDN está presente o no, pero es preferente que los procedimientos de diagnóstico, los ensayos, los dispositivos y similares contemplan determinar la presencia de autoanticuerpos contra una diversidad de antígenos relacionados con una enfermedad neurológica autoinmune o sus variantes, seleccionada preferentemente de entre el grupo que comprende Hu, Yo, Ri, CV2, PNMA1, PNMA2, DNER/Tr, ARHGAP26, ITPR1, ATP1A3, NBC1, CARPVIII, Zic4, Sox1, Ma, MAG, MPO, MBP, GAD65, anfifisina, recoverina, receptor GABA A, receptor GABA B, receptor de glicina, gefirina, IgLON5, DPPX, aquaporin-4, MOG, receptor de NMDA, receptores AMPA, GRM1, GRM5, LGI1, VGCC y mGluR1 y CASPR2, cuyos antígenos están preferentemente inmovilizados, por ejemplo, en un dispositivo médico, tal como una transferencia en línea. Los marcadores diagnósticos relevantes ITPR1 (EP14003703.7), NBC1 (EP14003958.7) y ATP1A3, al que se hace referencia también como subunidad alfa 3 de la Na(+)/K(+) ATPasa neuronal humana (EP14171561.5) se han descritos en el estado de la técnica.

45 Según las enseñanzas de la presente invención, se proporciona un anticuerpo, preferentemente un autoanticuerpo que se une al polipéptido de la invención usado para el diagnóstico de una enfermedad. La persona experta en la materia está familiarizada con los procedimientos para purificar anticuerpos, por ejemplo, los descritos en Hermanson, G. T., Mallia, A. K., y Smith, P. K. (1992), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, San Diego: Academic Press. Brevemente, un antígeno que se une específicamente al anticuerpo de interés, cuyo antígeno es el polipéptido de la invención, se inmoviliza y se usa para purificar, mediante cromatografía de afinidad, el anticuerpo de interés a partir de una fuente adecuada. Una muestra líquida que comprende anticuerpos de un paciente que padece el trastorno neurológico identificado por los presentes inventores puede usarse como la fuente.

55 Según la invención, se detecta un autoanticuerpo que es capaz de unirse específicamente al polipéptido de la invención. En una realización preferente, el término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier resto de unión basado en inmunoglobulina, más preferentemente, uno que comprende al menos una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluye, pero que no se limita a, anticuerpos monoclonales y policlonales, así como variantes de un anticuerpo, en particular fragmentos, cuyos restos de unión son capaces de unirse al antígeno respectivo, más preferentemente, de unirse específicamente al mismo. En una realización preferente, la

expresión "unión específica", tal como se usa en la presente memoria, significa que la unión es más fuerte que una reacción de unión caracterizada por una constante de disociación de 1×10^{-5} M, más preferentemente 1×10^{-7} M, más preferentemente 1×10^{-8} M, más preferentemente 1×10^{-9} M, más preferentemente 1×10^{-10} M, más preferentemente 1×10^{-11} M, más preferentemente 1×10^{-12} M, según se determina mediante resonancia plasmónica superficial usando un equipo Biacore a 25°C en tampón PBS a pH 7. El anticuerpo puede estar aislado o en una mezcla que comprende más anticuerpos, polipéptidos, metabolitos, células y similares. En el caso en el que el anticuerpo es un autoanticuerpo, puede ser parte de una preparación de autoanticuerpo que es heterogénea o puede ser un autoanticuerpo homogéneo, en el que una preparación heterogénea comprende múltiples especies de autoanticuerpos diferentes que pueden obtenerse mediante preparación a partir de sueros de donantes humanos, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad usando el antígeno inmovilizado para purificar cualquier autoanticuerpo capaz de unirse a dicho antígeno. El anticuerpo puede estar glicosilado o no glicosilado. La persona experta en la materia está familiarizada con los procedimientos que pueden usarse para la identificación, la producción y la purificación de anticuerpos y variantes de los mismos, por ejemplo, los descritos en el documento EP 2 423 226 A2 y las referencias en el mismo. El anticuerpo puede usarse como un agente de diagnóstico, individualmente o en combinación, por ejemplo, en complejo con el polipéptido de la invención.

Dentro del ámbito de la presente invención, un dispositivo médico o de diagnóstico que comprende, preferentemente revestido con, el (auto) anticuerpo de la invención y/o el polipéptido de la invención puede usarse para el procedimiento y uso de la invención. Preferentemente, dicho dispositivo médico o de diagnóstico comprende el polipéptido de la invención en una forma que permite ponerlo en contacto con una solución acuosa, más preferentemente, la muestra humana líquida, de una manera directa. En particular, el polipéptido de la invención puede inmovilizarse en la superficie de un vehículo, cuyo vehículo comprende, pero no se limita a, placas o portaobjetos de vidrio, biochips, placas de microtitulación, perlas, por ejemplo, perlas magnéticas, columnas de cromatografía, membranas o similares. Los dispositivos médicos ejemplares incluyen transferencias en línea, microplacas y biochips. Además del polipéptido de la invención, el dispositivo médico o de diagnóstico puede comprender polipéptidos adicionales, por ejemplo, controles positivos o negativos u otros antígenos conocidos que se unen a autoanticuerpos de valor diagnóstico, particularmente aquellos relacionados con otras enfermedades asociadas con uno o más síntomas idénticos o similares.

Las enseñanzas de la invención proporcionan el uso del polipéptido en forma de un kit, preferentemente para el diagnóstico de ataxia. Dicho kit puede comprender instrucciones que detallan cómo usar el kit y unos medios para poner en contacto el polipéptido de la invención con una muestra de fluido corporal de un sujeto, preferentemente un sujeto humano, por ejemplo, una transferencia en línea, en la que el polipéptido de la invención se inmoviliza en la transferencia en línea. Además, el kit puede comprender un control positivo, por ejemplo, un lote de autoanticuerpos o anticuerpos recombinantes que se sabe que se unen al polipéptido de la invención, y un control negativo, por ejemplo, una proteína que no tiene afinidad detectable al polipéptido de la invención, tal como la albúmina de suero bovino. Finalmente, dicho kit puede comprender una solución estándar del anticuerpo o antígeno para preparar una curva de calibración.

En una realización preferente, el kit comprende unos medios para detectar un anticuerpo, más preferentemente un autoanticuerpo, que se une al polipéptido de la invención, preferentemente mediante la detección de un complejo que comprende el polipéptido de la invención y un anticuerpo que se une al polipéptido de la invención. Dichos medios son preferentemente un agente que se une a dicho complejo y que modifica el complejo o que presenta un marcador, de manera que convierta el complejo en detectable. Por ejemplo, dichos medios pueden ser un anticuerpo marcado que se une a dicho polipéptido, en un sitio de unión distinto del sitio de unión reconocido por el anticuerpo primario o en una región constante del anticuerpo primario. De manera alternativa, dichos medios pueden ser un anticuerpo secundario que se une a la región constante del autoanticuerpo, preferentemente un anticuerpo secundario específico para anticuerpos de mamíferos de clase IgG. De manera alternativa, dichos medios pueden ser un reactivo de reticulación que une químicamente el anticuerpo y el polipéptido de la invención, de manera que el complejo pueda identificarse debido a su mayor peso molecular, por ejemplo, mediante SDS PAGE seguido de tinción de Coomassie o cromatografía de exclusión por tamaño. Se han descrito multitud de procedimientos y medios para detectar dicho complejo en el estado de la técnica, por ejemplo, en Philips, Terry, M., Analytical techniques in immunochemistry, 1992, Marcel Dekker, Inc.

El polipéptido usado para llevar a cabo la invención puede proporcionarse en la forma de una célula que comprende y/o expresa un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido. Si se usa un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para el polipéptido de la invención o una variante del mismo, dicho ácido nucleico puede ser un ácido nucleico no modificado. En una realización preferente, el ácido nucleico es un ácido nucleico que, como tal, no ocurre en la naturaleza y comprende, en comparación con el ácido nucleico natural, al menos una modificación, por ejemplo, un contenido isotópico o modificaciones químicas, por ejemplo, una metilación, modificación de secuencia, marcador o similar indicativo del origen sintético. En una realización preferente, el ácido nucleico es un ácido nucleico recombinante o parte o un ácido nucleico y, en una realización más preferente, es parte de un vector, en el que puede estar funcionalmente unido con un promotor que permite la expresión, preferentemente la sobreexpresión, del ácido nucleico.

En una realización preferente, dicho ácido nucleico se encuentra en el interior de una célula capaz de expresarlo en el sentido de que el polipéptido de la invención o una variante del mismo se fabrique y, más preferentemente, sea dirigido a la superficie de la célula. Dicha célula que comprende el ácido nucleico que codifica para el polipéptido de la invención

5 puede usarse según la presente invención. La célula puede ser cualquier tipo de célula capaz de expresar el ácido nucleico, por ejemplo, una célula procariota o eucariota. En una realización preferente, la célula es una célula eucariota tal como una célula de levadura, una célula eucariota procedente de un organismo multicelular, por ejemplo, una célula de insecto, más preferentemente una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de ratón, y más preferentemente una célula humana.

10 La persona experta en la materia está familiarizada con los procedimientos usados para sintetizar, modificar y amplificar dicho ácido nucleico y para transfectar células usando dicho ácido nucleico, preferentemente en un vector que permita el mantenimiento o la expresión transitoria o permanente del ácido nucleico en la célula. La persona experta en la materia está familiarizada también con una diversidad de vectores adecuados, que están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Origene. Por ejemplo, puede usarse un vector que codifica para construcciones de fusión con una GFP C-terminal. La célula puede ser de origen eucariota o procariota y es preferentemente una célula de mamífero, por ejemplo, una célula HEK293, CHO o COS-7. La célula que comprende el ácido nucleico que codifica para el polipéptido de la invención puede ser una célula recombinante o una célula aislada, en la que el término "aislado" significa que la célula está enriquecida de manera que, en comparación con el entorno del tipo salvaje de dicha célula, haya presentes menos células de otra diferenciación o especie o, de hecho, no haya otras células presentes.

Listado de secuencias

<110> EUROIMMUN

20 <120> Diagnóstico de una nueva enfermedad autoinmune

<130> p00043

<160> 9

25 <170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 2190

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Secuencia de codificación de neurocondrina (Q9UBB6)

35 <400> 1

ES 2 748 117 T3

atgtcgtggt gtgaccggc tggggcggga cagttggga aggcgagcat catggcctcg 60
gattgogagc cagctctgae ccaggcagag ggccgaaacc ccacctgga gcctacctg 120
ggagccctcc gtgaggcca gaatgacagc gagcagttg cagccctgct gctagtgacc 180
aagcagtca aagcaggtga catagatgcc aaaacggc ggccgatctt cgatgctgc 240
ggcttcacct tccccaatcg tctcctgacc accaaggagg cgcggatgg ctgccctgac 300
catgttctgc gggctttggg tgtggcctg ctggcctgct tctgcagtga cctgaactg 360
gccgcccacc cccaagtct gaacaagatt ccattctta gcacctctt cacagccgg 420
ggggaccggc acgatgctgc ccgcctcc atgattgatg acacctacca gtgctgacg 480
gctgtagcag gcacaccag agggcctgg cacctcattg ctggtggcac cgtgtctgcc 540
ctatgccagg catacctggg gcacggctat ggctttgacc agccctggc actcctggtg 600
gggctgctgg ctgctgccga gacacagtgc tgyaaggagg cggagcccga cctgctgcc 660
gtgttgccgg gctcagtga ggatttcag aaagctgagg atgccagcaa gttgagctc 720
tgccagctgc tgccccctt ttgccccg acaaccgtgc cccctgaatg ctaccgggat 780
ctgcaggccg ggctggcac catcctggga agcaagctga gctcctggca gcgcaacct 840

ES 2 748 117 T3

gcactgaagc tggcagcccg cctggcacac gcctgcggct ccgactggat cccggcgggc 900
 agctccggga gcaagttcct ggccttgcct gtgaatcttg cgtgcgtgga agtggggctg 960
 qcactcaaac acacgggac ggaagtaaaa gaggatgagg tgacggctg ctatgcctc 1020
 atggagttag ggatccagga atgcactcgc tgtgagcagt cactgcttaa ggagccacag 1080
 aaggtgcagc tcgtgagcgt catgaaggag gccatagggg ctgttatcca ctacctgctg 1140
 caggtggggg cagagaagca gaaggagccc tttgtgtttg cctcgggtgcg gatcctgggt 1200
 gcctggctgg ccgaggagac ctcatccttg cgttaaggagg tggccagct gctgccctc 1260
 ctgctccgtt atgccaagac cctctacgag gaggccgagg aggccaatga cctttcccag 1320
 caggtggcca acctggccat ctccccacc accccagggc ccacctggcc aggagacgct 1380
 ctccggctcc tcctgcctgg ctgggtgccac ctgaccgttg aagatggggc ccgggagatc 1440
 ctgatcaagg aaggggcccc ctgcctctg tgcaagtatt tcctgcagca gtgggaactc 1500
 acatccctg gccacgacac ctgggtgctg cctgacagcg tggagattgg cctgcagacc 1560
 tgctgccaca ttctctcaa cctcgtggtc accgcaccgg ggtgatcaa gcgtgacgc 1620
 tgcttcacat ctctaataa caccctcatg agtgcctac cagcaactagt gcagcaacag 1680
 ggaaggctgc ttctggctgc taatgtggcc accctggggc tcctcatgga ccggctcctt 1740
 agcaactctc cagctcttca gggaacacca gcatcccag ggttcttcgc agctgccatc 1800
 ctcttctat cacagtcca cgtggcgcgg gccaccccgg gctcagacca ggcagtgcta 1860
 gcctgtccc ctgagtatga gggcatctgg gccgacctgc aggagctctg gttcctgggc 1920
 atgcaggcct tcaccggctg tgtgctctg ctgcctggc tggccccgc tgcctgcgc 1980
 tcccgtggc cgcaggagct gctccagctg ctaggcagtg tcagcccaa ctctgtcaag 2040
 cccgagatgg tggccgcta tcagggtgct ctggtggagc tggcggggc caaccggctg 2100
 tgccgggagg ccatsaggct gcaggcgggc gaggagacgg ccagccacta ccgcatggct 2160
 gccttgagc agtgcctgct agagccctga 2190

ES 2 748 117 T3

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<220>

<223> Neurocondrina 377-390

<400> 2

10

```
His Tyr Leu Leu Gln Val Gly Ser Glu Lys Gln Lys Glu Pro
1           5           10
```

<210> 3

<211> 50

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Neurocondrina 1-50

20

<400> 3

```
Met Ser Cys Cys Asp Leu Ala Ala Ala Gly Gln Leu Gly Lys Ala Ser
1           5           10           15
Ile Met Ala Ser Asp Cys Glu Pro Ala Leu Asn Gln Ala Glu Gly Arg
20           25           30
Asn Pro Thr Leu Glu Arg Tyr Leu Gly Ala Leu Arg Glu Ala Lys Asn
35           40           45
Asp Ser
50
```

25

<210> 4

30

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

35

<223> Neurocondrina 711-729

ES 2 748 117 T3

<220>

<223> Neurocondrina 151-300

<400> 6

5 Met Ile Asp Asp Thr Tyr Gln Cys Leu Thr Ala Val Ala Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Pro Arg His Leu Ile Ala Gly Gly Thr Val Ser Ala Leu Cys
 20 25 30
 Gln Ala Tyr Leu Gly His Gly Tyr Gly Phe Asp Gln Ala Leu Ala Leu
 35 40 45
 10 Leu Val Gly Leu Leu Ala Ala Ala Glu Thr Gln Cys Trp Lys Glu Ala
 50 55 60
 Glu Pro Asp Leu Leu Ala Val Leu Arg Gly Leu Ser Glu Asp Phe Gln
 65 70 75 80
 Lys Ala Glu Asp Ala Ser Lys Phe Glu Leu Cys Gln Leu Leu Pro Leu
 85 90 95
 Phe Leu Pro Pro Thr Thr Val Pro Pro Glu Cys Tyr Arg Asp Leu Gln
 100 105 110
 15 Ala Gly Leu Ala Arg Ile Leu Gly Ser Lys Leu Ser Ser Trp Gln Arg
 115 120 125
 Asn Pro Ala Leu Lys Leu Ala Ala Arg Leu Ala His Ala Cys Gly Ser
 130 135 140
 Asp Trp Ile Pro Ala Gly

20 <210> 7

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <220>

<223> Neurocondrina 301-450

<400> 7

30

35

```

Ser Ser Gly Ser Lys Phe Leu Ala Leu Leu Val Asn Leu Ala Cys Val
1           5           10           15
Glu Val Arg Leu Ala Leu Glu Glu Thr Gly Thr Glu Val Lys Glu Asp
           20           25           30
Val Val Thr Ala Cys Tyr Ala Leu Met Glu Leu Gly Ile Gln Glu Cys
           35           40           45
5 Thr Arg Cys Glu Gln Ser Leu Leu Lys Glu Pro Gln Lys Val Gln Leu
           50           55           60
Val Ser Val Met Lys Glu Ala Ile Gly Ala Val Ile His Tyr Leu Leu
65           70           75           80
Gln Val Gly Ser Glu Lys Gln Lys Glu Pro Phe Val Phe Ala Ser Val
           85           90           95
10 Arg Ile Leu Gly Ala Trp Leu Ala Glu Glu Thr Ser Ser Leu Arg Lys
           100          105          110
Glu Val Cys Gln Leu Leu Pro Phe Leu Val Arg Tyr Ala Lys Thr Leu
           115          120          125
Tyr Glu Glu Ala Glu Glu Ala Asn Asp Leu Ser Gln Gln Val Ala Asn
           130          135          140
Leu Ala Ile Ser Pro Thr
145           150

```

<210> 8

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Neurocondrina 451-600

<400> 8

```

Thr Pro Gly Pro Thr Trp Pro Gly Asp Ala Leu Arg Leu Leu Leu Pro
1           5           10           15
Gly Trp Cys His Leu Thr Val Glu Asp Gly Pro Arg Glu Ile Leu Ile
           20           25           30
Lys Glu Gly Ala Pro Ser Leu Leu Cys Lys Tyr Phe Leu Gln Gln Trp
           35           40           45
30 Glu Leu Thr Ser Pro Gly His Asp Thr Ser Val Leu Pro Asp Ser Val
           50           55           60
Glu Ile Gly Leu Gln Thr Cys Cys His Ile Phe Leu Asn Leu Val Val

```

ES 2 748 117 T3

```

65          70          75          80
Thr Ala Pro Gly Leu Ile Lvs Arg Asp Ala Cys Phe Thr Ser Leu Met
85          90          95
Asn Thr Leu Met Thr Ser Leu Pro Ala Leu Val Gln Gln Gln Gly Arg
100        105        110
Leu Leu Leu Ala Ala Asn Val Ala Thr Leu Gly Leu Leu Met Ala Arg
115        120        125
Leu Leu Ser Thr Ser Pro Ala Leu Gln Gly Thr Pro Ala Ser Arg Gly
130        135        140
Phe Phe Ala Ala Ala Ile
145        150

```

5

10 <210> 9

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <220>

<223> Neurocondrina 601-729

<400> 9

```

Leu Phe Leu Ser Gln Ser His Val Ala Arg Ala Thr Pro Gly Ser Asp
1          5          10          15
Gln Ala Val Leu Ala Leu Ser Pro Glu Tyr Glu Gly Ile Trp Ala Asp
20        25        30
Leu Gln Glu Leu Trp Phe Leu Gly Met Gln Ala Phe Thr Gly Cys Val
35        40        45
Pro Leu Leu Pro Trp Leu Ala Pro Ala Ala Leu Arg Ser Arg Trp Pro
50        55        60
Gln Glu Leu Leu Gln Leu Leu Gly Ser Val Ser Pro Asn Ser Val Lys
25        70        75        80
Pro Glu Met Val Ala Ala Tyr Gln Gly Val Leu Val Glu Leu Ala Arg
85        90        95
Ala Asn Arg Leu Cys Arg Glu Ala Met Arg Leu Gln Ala Gly Glu Glu
100       105       110
Thr Ala Ser His Tyr Arg Met Ala Ala Leu Glu Gln Cys Leu Ser Glu
30        115       120       125
Pro

```

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico de ataxia que comprende la etapa de detectar en una muestra de un paciente un autoanticuerpo que se une a la neurocondrina, en el que la muestra es un fluido corporal que comprende anticuerpos, en el que la muestra se selecciona de entre el grupo que comprende sangre completa, suero y líquido cefalorraquídeo.
- 5 2. Un uso de un polipéptido que comprende neurocondrina o una variante del mismo que se une específicamente a un autoanticuerpo anti neurocondrina para el diagnóstico *in vitro* de ataxia, que comprende la etapa de detectar autoanticuerpos que se unen a la neurocondrina.
- 10 3. El uso según la reivindicación 2, en el que el polipéptido se inmoviliza en un vehículo sólido seleccionado de entre el grupo que comprende placas de vidrio, portaobjetos, biochips, placas de microtitulación, perlas magnéticas, columnas y membranas de cromatografía.
4. El uso según la reivindicación 2, en el que se usa un dispositivo médico o de diagnóstico que comprende un polipéptido que comprende neurocondrina o una variante del mismo que se une específicamente a un autoanticuerpo anti SEC ID NO 1 seleccionado de entre el grupo que comprende una transferencia en línea y una placa de microtitulación.
- 15 5. El uso según la reivindicación 3, en el que el polipéptido está en un kit de ensayo para el diagnóstico de ataxia, y en el que el kit de ensayo comprende además un anticuerpo secundario marcado para detectar el complejo que comprende un autoanticuerpo que se une a la neurocondrina.
6. El procedimiento o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido se proporciona en forma de una célula que comprende un ácido nucleico que codifica para dicho polipéptido.
- 20 7. El procedimiento o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido se proporciona en forma de un tejido que comprende dicho polipéptido.
8. El procedimiento o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polipéptido es un polipéptido recombinante.
9. El procedimiento o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el polipéptido es un polipéptido aislado.