

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 648**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2015 PCT/EP2015/059531**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15166057**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2015 E 15720952 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3137910**

54 Título: **Diagnóstico de esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

30.04.2014 EP 14166705

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

26.03.2020

73 Titular/es:

**KLINIKUM RECHTS DER ISAR DER
TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(100.0%)
Ismaninger Strasse 22
81675 München, DE**

72 Inventor/es:

**HEMMER, BERNHARD;
SRIVASTAVA, RAJNEESH y
SCHIRMER, LUCAS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 750 648 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 esclerosis múltiple

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar la esclerosis múltiple (EM), síndrome clínicamente aislado (SCI) y/o síndrome radiológicamente aislado (SRI) o una predisposición a cualquiera de las afecciones en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de un anticuerpo anti-KIR4.1 en una muestra obtenida de dicho sujeto mediante (a) contacto de dicha muestra con un péptido; y (b) detección de la formación de un complejo de péptido-anticuerpo anti-KIR4.1; en el que dicho péptido (i) consiste en una subsecuencia del dominio extracelular grande de KIR4.1 humano, cuyo dominio extracelular consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; 10 (ii) cuya subsecuencia es de al menos 5 restos aminoacídicos consecutivos de longitud, (iii) cuya subsecuencia comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o 2 y (iv) en el que el resto N de la SEQ ID NO: 1 o 2 está glucosilado como el correspondiente resto N del dominio extracelular grande de KIR4.1 de oligodendrocitos humanos; en el que KIR4.1 que está glucosilado como en oligodendrocitos humanos se caracteriza por un peso molecular de aproximadamente 15 38 a aproximadamente 42 kDa en un gel desnaturalizante, y en el que la formación de dicho complejo es indicativa de EM, SCI, SRI o una predisposición a las mismas.

La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad inflamatoria crónica más común del sistema nervioso central (SNC) que da lugar a incapacidad en la mayoría de los pacientes afectados (Noseworthy et al., N. Engl. J. Med. 343, 938-952 (2000)). La etiología de EM es desconocida, pero las evidencias epidemiológicas sugieren una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales (Ascherio et al., Ann. Neurol. 61, 504-513 (2007); Ascherio et al., Ann. Neurol. 61, 288-299 (2007); Hafler et al., N. Engl. J. Med. 357, 851-862 (2007)). Un mecanismo patógeno incierto, la heterogeneidad clínica y la imprevisibilidad del resultado de pacientes individuales aumenta la complejidad de la enfermedad (McFarland et al., Nat. Immunol. 8, 913-919 (2007)).

25 En el documento WO 2012/163765, los autores de la presente invención divulgaron que KIR4.1, un canal de potasio de rectificación interior específico está implicado en la etiología de esclerosis múltiple. Más específicamente, un subconjunto de pacientes con esclerosis múltiple tiene autoanticuerpos anti-KIR4.1 en su suero.

30 En la presente solicitud, los autores de la presente invención investigaron además las posibilidades de detectar de forma sensible dichos autoanticuerpos. Al hacerlo, los autores de la invención tuvieron como objetivo proporcionar un medio mejorado y métodos para el diagnóstico de esclerosis múltiple. En particular, resultó que la presencia frente a la ausencia y, en particular, la naturaleza de la glucosilación de KIR4.1 influye en la unión del anticuerpo.

35 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar esclerosis múltiple (EM), síndrome clínicamente aislado (SCI) y/o síndrome radiológicamente aislado (SRI) o una predisposición a cualquiera de las afecciones en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de un anticuerpo anti-KIR4.1 en una muestra obtenida de dicho sujeto mediante (a) contacto de dicha muestra con un péptido; y (b) detección de la formación de un complejo de péptido-anticuerpo anti-KIR4.1; en el que dicho péptido (i) consiste en una subsecuencia del dominio extracelular grande de KIR4.1 humano, cuyo dominio extracelular consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; 40 (ii) cuya subsecuencia es de al menos 5 restos aminoacídicos consecutivos de longitud, (iii) cuya subsecuencia comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o 2 y (iv) en el que el resto N de la SEQ ID NO: 1 o 2 está glucosilado como el correspondiente resto N del dominio extracelular grande de KIR4.1 de oligodendrocitos humanos; en el que KIR4.1 que está glucosilado como en oligodendrocitos humanos se caracteriza por un peso molecular de aproximadamente 45 38 a aproximadamente 42 kDa en un gel desnaturalizante, y en el que la formación de dicho complejo es indicativa de EM, SCI, SRI o una predisposición a las mismas.

50 El término "péptido" se refiere a un policondensado de aminoácidos. Preferiblemente, dichos aminoácidos se seleccionan de los 20 aminoácidos de origen natural. El límite de longitud superior del péptido de la presente invención se da por la limitación de que el péptido es una subsecuencia del dominio extracelular grande de KIR4.1, en el que, en una realización preferida, la longitud de dicho dominio extracelular se define por la longitud de la SEQ ID NO: 4.

Dicha subsecuencia que es de al menos 5 restos aminoacídicos consecutivos de longitud es preferiblemente de al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al 55 menos 15 restos aminoacídicos consecutivos de longitud. Una subsecuencia preferida que es exactamente de 15 restos aminoacídicos consecutivos de longitud es la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En realizaciones preferidas adicionales, dicha subsecuencia tiene una longitud de al menos 20, al menos 25, al menos 30 o al menos 35 restos aminoacídicos consecutivos. Dicha subsecuencia también puede consistir en o comprender una cualquiera de las SEQ ID NO: 7 a 14. Las subsecuencias que comprenden una cualquiera de las SEQ ID NO: 7 a 14 incluyen subsecuencias que consisten en una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7 a 14, en las que se añade His o His-Thr al extremo C. 60

Una subsecuencia preferida adicional es la del resto 10 al resto 15 de la SEQ ID NO: 2, incluida en la presente como la SEQ ID NO: 16 (PPANHT).

65

Se describe que, en cualquiera de los péptidos definidos anteriormente, 1 o más, preferiblemente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos pueden remplazarse por otros aminoácidos, con la condición de que la secuencia de la SEQ ID NO: 1, que está comprendida en cualquiera de los péptidos definidos anteriormente, permanezca inalterada. En la medida en que cualquiera de los péptidos definidos anteriormente comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en su totalidad, se prefiere que la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en su totalidad permanezca inalterada.

El término "proteína" tiene su significado establecido en la técnica. En particular, una proteína puede comprender uno o más polipéptidos. Un polipéptido es un policondensado de aminoácidos, en el que no se aplica ningún límite de longitud particular. Una proteína preferida de acuerdo con la presente invención es un homotetrámero. Las proteínas, incluso si son monoméricas, pueden diferir de los simples condensados de aminoácidos en que están presentes uno o más modificaciones postraduccionales. Una característica clave de la presente invención es la modificación postraducciona que es la glucosilación. Aunque las necesidades específicas de la presente invención en términos de glucosilación se definen en este documento anteriormente y a continuación, se aprecia que pueden estar presentes o ausentes modificaciones postraduccionales adicionales. Teniendo en cuenta que la proteína de la presente invención es KIR4.1, se prefiere que, en el dominio extracelular grande de la misma, haya exactamente un sitio que es una diana de modificación postraducciona. Dicha modificación postraducciona es N-glucosilación, y se refiere a un resto de Asn específico como se define anteriormente.

Se aprecia que tanto la proteína descrita como el péptido de acuerdo con la presente invención se caracterizan por que pueden unirse al anticuerpo anti-KIR4.1 que está presente en el suero de un subgrupo de pacientes con esclerosis múltiple. Este anticuerpo también se denomina "autoanticuerpo" en este documento. Este autoanticuerpo preferiblemente reconoce un epítipo que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 17 (PPAN) que está comprendida dentro de la SEQ ID NO: 2.

Se proporciona con el contenido de la presente invención y el de la solicitud previa WO 2012/163765 de los autores de la presente invención, que dicho autoanticuerpo puede extraerse del suero de pacientes que tienen EM y purificarse. Medios adecuados para precipitar el anticuerpo incluyen el receptor y el péptido como se define en el documento WO 2012/163765, así como las proteínas y péptidos de acuerdo con la presente invención.

La expresión "esclerosis múltiple" se refiere a una enfermedad inflamatoria que afecta al sistema nervioso; véase también la bibliografía citada en la sección de antecedentes anterior. Que un sujeto o paciente tenga esclerosis múltiple o no puede determinarse con el método de diagnóstico de acuerdo con la invención. Como alternativa o adicionalmente, un diagnóstico de esclerosis múltiple puede establecerse basándose en los síntomas clínicos establecidos, siendo conocidos dichos síntomas clínicos para los expertos en la materia. Los síntomas clínicos de esclerosis múltiple incluyen problemas de visión, mareos, vértigo, disfunción sensitiva, debilidad, problemas con la coordinación, pérdida de equilibrio, fatiga, dolor, deficiencias neurocognitivas, deficiencias mentales, disfunción vesical, disfunción intestinal, disfunción sexual, sensibilidad al calor. El diagnóstico basándose en dichos síntomas clínicos, sin embargo, en general será menos sensible en comparación con los métodos de la presente invención. Además, en muchos casos, se caracterizará una predisposición por ausencia de cualquier síntoma clínico en cuyo caso el diagnóstico de predisposición puede lograrse únicamente usando el método de la presente invención o, como alternativa, el de la invención previa de los autores de la presente invención descrita en el documento WO 2012/163765.

El SCI en general se percibe en la técnica como una EM en fase temprana, en la que los parámetros clínicos característicos de la última no están aun completamente desarrollados. Para un análisis de SCI, véase, por ejemplo, Thrower, Neurology 68, S12-S15 (2007).

De forma análoga, también el síndrome radiológicamente aislado (SRI) se considera una EM en fase temprana. Los pacientes con SRI son pacientes que recibieron RM del cerebro por razones no relacionadas con EM. El paciente tiene lesiones de tipo EM aunque el paciente todavía no tiene síntomas clásicos de EM. Estos pacientes se diagnostican con SRI. Tienen una posibilidad de aproximadamente un 30 % de desarrollar EM en los siguientes años.

Los autores de la presente invención detectaron en estudios previos que altos títulos de autoanticuerpos anti-KIR4.1 se encuentran en el suero de un 50,8 % de los pacientes. Por consiguiente, la presencia de autoanticuerpos anti-KIR4.1 define un subgrupo de pacientes con EM. Se espera que este subgrupo responda o responda particularmente bien al tratamiento con péptidos de acuerdo con la presente invención. Determinar si un individuo dado pertenece a este subgrupo puede determinarse con los medios de diagnóstico y métodos divulgados en este documento, así en el documento WO 2012/163765.

El método del primer aspecto permite diagnosticar esclerosis múltiple o, en la medida en que la esclerosis múltiple no es evidente en dicho sujeto, para diagnosticar una predisposición a la misma. El término "predisposición" tiene el significado establecido en la técnica y prefiere una probabilidad de desarrollar una enfermedad. En particular, dicha probabilidad es mayor que en un sujeto de control normal. Dicha probabilidad en un sujeto de control normal puede estar representada como la probabilidad promedio de desarrollar EM en una muestra aleatoria de la población.

Un grupo preferido de individuos a ensayar para dicha predisposición son individuos con un historial de EM en la familia.

Dado que los autores de la presente invención detectaron altos títulos de anticuerpos anti-KIR4.1 en sueros de una fracción significativa de pacientes con EM, los medios y métodos descritos en este documento permiten el diagnóstico de EM o una predisposición a la misma en aproximadamente la mitad de los casos de EM o sujetos que están en riesgo de desarrollar la enfermedad, respectivamente. En particular, los métodos de la invención permiten el diagnóstico temprano de EM o una predisposición a la misma o una confirmación de un diagnóstico incierto. El ensayo de anticuerpos puede permitir el diagnóstico de SCI o EM sin procedimientos invasivos (tal como análisis de líquido cefalorraquídeo) y diagnosticar EM, SCI o predisposición a EM antes de lo que sería posible mediante procedimientos de diagnóstico conocidas en la técnica. Es bien sabido que el tratamiento de EM funciona mejor cuando se empieza lo más pronto posible durante el transcurso de la enfermedad. Por lo tanto, el diagnóstico temprano puede permitir la implementación de un tratamiento temprano de pacientes con SCI, EM o en riesgo de desarrollar estas enfermedades. En algunos individuos en riesgo, el tratamiento incluso puede prevenir el desarrollo (adicional) de la enfermedad.

Dicho contacto tiene que lograrse en condiciones que permitan la formación del complejo definido en el punto (b) del primer aspecto. Se describen condiciones ejemplares o preferidas en los ejemplos incluidos en la presente; véase la sección "ELISA de KIR4.1", así como adicionalmente a continuación.

La detección de la formación de dicho complejo puede hacerse con métodos establecidos en la técnica. Básicamente, los métodos para detectar la formación de un complejo que comprende un antígeno y un anticuerpo son aplicables para ese propósito. Los métodos preferidos se detallan adicionalmente a continuación.

Los autores de la presente invención descubrieron que, en la secuencia del dominio superficial grande de KIR4.1, el epítipo reconocido por el autoanticuerpo anti-KIR4.1 como presente en el suero de pacientes con EM incluye un sitio para N-glucosilación. Además, resulta que la presencia frente a la ausencia y en particular la naturaleza de la glucosilación del sitio mencionado influye en la unión del anticuerpo. En particular, altos grados de glucosilación causaban detección menos sensible o pueden anular la unión del anticuerpo conjuntamente. Un "alto grado de glucosilación" se refiere a un resto de oligosacárido grande que se une. Una forma altamente glucosilada ejemplar tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 49 a aproximadamente 55 kDa en un gel desnaturizante. Por lo tanto, para que el ensayo para autoanticuerpos anti-KIR4.1 sea sensible, la sonda, es decir, la proteína o péptido de la presente invención, puede no estar glucosilada. La forma no glucosilada de KIR4.1 para seres humanos tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 34 kDa en un gel desnaturizante. Si tienen obtenerse formas no glucosiladas a partir de formas glucosiladas, se hace preferiblemente por tratamiento con la enzima péptido N-glucosidasa (PNGasa).

De acuerdo con la invención, KIR4.1 y la proteína descrita se glucosilan como en oligodendrocitos humanos. La expresión "glucosilado como en oligodendrocitos humanos" se refiere a la presencia de un resto de oligosacárido que es idéntico o sustancialmente idéntico al resto de oligosacárido que está presente en KIR4.1 humano como sucede en oligodendrocitos humanos. El sitio de glucosilación de KIR4.1 humano se define por la SEQ ID NO: 1 o 2, más específicamente por el resto N del mismo, apreciando que la SEQ ID NO: 1 o 2 es una subsecuencia del dominio extracelular grande de KIR4.1 humano. El resto N está comprendido en un motivo NXT para N-glucosilación, siendo el resto X H en el caso de KIR4.1. La secuencia NHT forma los tres últimos restos de la SEQ ID NO: 16. En un gel desnaturizante, KIR4.1, cuando se glucosila como en oligodendrocitos humanos, tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 38 a aproximadamente 42 kDa, más preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 42 kDa. Es especialmente preferido un peso molecular aparente de aproximadamente 42 kDa. La expresión "peso molecular aparente" se refiere, como es habitual, al peso molecular en un gel desnaturizante.

Aunque los péptidos cortos, cuando se fabrican sintéticamente, no se glucosilarán, esto no se aplica a KIR4.1, así como a fragmentos del mismo que se obtienen de fuentes naturales incluyendo líneas celulares. En la medida en que tienen que usarse péptidos y proteínas de fuentes naturales, por lo tanto, es de máxima importancia poner atención al grado de glucosilación.

Se prefiere que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % y al menos un 99 % de dicha proteína o péptido se glucosile como en oligodendrocitos humanos. Más específicamente, el dominio extracelular grande de dicha proteína se glucosila como en oligodendrocitos humanos, y el resto N definido anteriormente se glucosila como en oligodendrocitos humanos. De forma análoga, y en la medida en que tiene que hacerse uso de formas no glucosiladas de dicha proteína o dicho péptido, se prefiere que al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % y al menos un 99 % no esté glucosilado, más específicamente no glucosilado en el dominio extracelular grande en caso de que tenga que usarse dicha proteína, y no glucosilado en el resto N definido anteriormente en caso de que tenga que hacerse uso de dicho péptido. Habiendo dicho esto, también se prevé el uso de mezcla que consisten en comprenden formas glucosiladas y no glucosiladas, estando glucosiladas las formas glucosiladas como en oligodendrocitos humanos. En la medida en que tiene que usarse dicha mezcla, se entiende que preferiblemente al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al

menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % y al menos un 99 % de dicha mezcla consista exclusivamente en las formas glucosiladas y no glucosiladas mencionadas.

5 En condiciones fisiológicas, KIR4.1 se produce como un homotetrámero. En la medida en que el ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención haga uso de dicha proteína, dicha proteína preferiblemente está en forma tetramérica. Preferiblemente, dicho péptido está en forma tetramérica. Se da preferencia a aquellas formas tetraméricas de dicho péptido que imitan la disposición tetramérica de epítomos como se proporcionan por el homotetrámero de KIR4.1 de origen natural. Los epítomos preferidos son aquellos definidos por péptidos que
10 comprenden o consisten en la SEQ ID NO: 1 o 2. También se prevé el uso de la forma monomérica, así como de otras formas oligoméricas tales como dímeros, trímeros, pentámeros, hexámeros, etc., apreciando que el uso de agregados de mayor orden es menos preferido.

15 En una realización preferida, dicho anticuerpo anti-KIR4.1 está presente en dicha muestra, (a) la presencia de al menos un síntoma clínico de EM, SCI o SRI en dicho sujeto es indicativa de EM, SCI o SRI, respectivamente; y (b) la ausencia de cualquier síntoma clínico de EM, SCI y SRI es indicativa de dicha predisposición a EM, SCI y SRI.

20 Como se ha descrito anteriormente, los métodos de acuerdo con la invención proporcionan el diagnóstico de esclerosis múltiple, así como el diagnóstico de una predisposición a la misma. La presente realización preferida proporciona información adicional a adquirir para dicho sujeto, ayudando dicha información adicional a distinguir entre el diagnóstico de la enfermedad y el diagnóstico de una predisposición a la misma. En particular, dicha información adicional consiste en o comprende al menos un síntoma clínico de esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple es una enfermedad bien conocida con síntomas clínicos establecidos. Los expertos en la materia son muy conscientes de los
25 síntomas clínicos que son característicos o indicativos de esclerosis múltiple (véase también anteriormente y a continuación) y pueden determinar la presencia o la ausencia de la misma sin más preámbulos.

30 De acuerdo con la presente realización preferida, la ausencia de cualquier síntoma clínico de esclerosis múltiple, cuando se produce simultáneamente junto con la presencia de anticuerpos anti-KIR4.1, es indicativa de predisposición a esclerosis múltiple. En otras palabras, cuando fallan los métodos establecidos de diagnóstico o pronóstico, la presente invención permite identificar a aquellos sujetos que muestran un elevado riesgo de desarrollar esclerosis múltiple en algún punto en el futuro.

35 Por otro lado, en sujetos donde está presente al menos un síntoma clínico de esclerosis múltiple, la determinación de anticuerpos anti-KIR4.1 corrobora adicionalmente el diagnóstico de esclerosis múltiple. En aquellos casos donde los parámetros clínicos en solitario no permiten un diagnóstico claro, la presente invención ayuda a realizar y fundamentar dicho diagnóstico. Esto se aplica, en particular, a formas tempranas de esclerosis múltiple. Como es bien sabido en la técnica, un diagnóstico temprano de esclerosis múltiple es muy deseable, dado que las fases tempranas en general son más susceptibles a tratamiento.

40 Dicho síntoma clínico puede ser al menos uno seleccionado de problemas de visión, mareos, vértigo, disfunción sensitiva, debilidad, problemas con la coordinación, pérdida de equilibrio, fatiga, dolor, deficiencias neurocognitivas, deficiencias mentales, disfunción vesical, disfunción intestinal, disfunción sexual, sensibilidad al calor, la presencia de uno o más marcadores de inflamación en líquido cefalorraquídeo (LCR), la presencia de lesiones en el cerebro y/o la médula espinal. Las lesiones mencionadas pueden detectarse en una imagen de RMN. Típicamente, dichas lesiones
45 se producen en la región periventricular, yuxtacortical y/o infratentorial del cerebro. Los marcadores de inflamación indicativos de EM son bien conocidas en la técnica, y tienen que seleccionarse preferiblemente de pleocitosis (número aumentado de forma anómala de células en el LCR, en el que valores típicos de números celulares aumentados son entre 5 y 50 células/ μ l o por encima), síntesis de IgG intratecal y la aparición de bandas de IgG oligoclonal en el LCR.

50 La detección del anticuerpo anti-KIR4.1 o dicho complejo, respectivamente, en dicha muestra puede lograrse por un método seleccionado del grupo que consiste en ELISA, inmunoprecipitación, transferencia de Western, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, citometría de flujo, metaloinmunoensayo (tal como GLORIA), ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y espectroscopia de masas. Estos métodos están bien establecidos y a disposición del experto en la materia. El ELISA es particularmente preferido. En un ensayo de
55 ELISA, puede usarse un anticuerpo que se une a dicho anticuerpo anti-KIR4.1. Se aplican consideraciones similares a inmunoprecipitación, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Como se aprecia anteriormente, los expertos en la materia, cuando están provistos del contenido de la presente invención, pueden aislar y caracterizar el anticuerpo anti-KIR4.1 sin más preámbulos. Dicha caracterización usa preferiblemente espectrometría de masas. Una vez caracterizado, puede usarse espectrometría de masas para determinar la presencia o la ausencia de anticuerpos anti-KIR4.1 en cualquier muestra dada. Pueden usarse ensayos de FRET, por ejemplo, en el contexto de un ensayo de
60 unión, haciendo uso de dicho ensayo de unión preferiblemente de un receptor, definiéndose dicho receptor adicionalmente a continuación. Dicho ensayo de FRET puede diseñarse de modo que se produzca una transferencia detectable entre el donador y el aceptor de la pareja de FRET únicamente en caso de que el receptor y el anticuerpo anti-KIR4.1 estén en cercana proximidad especial, siendo indicativa dicha cercana proximidad especial de la presencia
65 del anticuerpo anti-KIR4.1.

Dicha muestra puede seleccionarse de sangre, suero, plasma, ganglios linfáticos, LCR, líquido lagrimal, orina, esputo y biopsia cerebral.

En una realización preferida adicional, dicha proteína o péptido está comprendido en una célula *in vitro*, preferiblemente en la membrana celular de dicha célula. En otras palabras, se prefiere que el ensayo de diagnóstico de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención se implemente como un ensayo basado en células. Es especialmente preferido que dichas células tengan la proteína o péptido de acuerdo con la presente invención incorporado en su membrana celular. Esto proporciona que el epítipo presente en dicha proteína o péptido se reconozca y se una por los autoanticuerpos que están presentes en los sueros de pacientes con EM. Se prefiere que dicha célula también se use para expresar la proteína o péptido de acuerdo con la presente invención.

El método de acuerdo con el primer aspecto como se divulga en este documento anteriormente proporciona el uso de una proteína o péptido, respectivamente, en el que tanto la proteína como el péptido pueden estar no glucosilados, en particular no glucosilados en el resto de Asn comprendido en la SEQ ID NO: 1 o 2, o puede estar glucosilado, en particular en dicha Asn de una manera que se idéntica o sustancialmente idéntica a la glucosilación observada en KIR4.1 humano en oligodendrocitos humanos. Se prefiere la proteína, y particularmente se prefiere la proteína que tiene un estado de glucosilación como en oligodendrocitos humanos. Se aprecia que el estado de glucosilación en oligodendrocitos humanos, en particular en dicho resto de Asn, es único. Los datos experimentales comprendidos en los ejemplos proporcionan caracterización adicional del estado de glucosilación de KIR4.1 como se encuentra en oligodendrocitos humanos, en particular en términos del peso molecular aparente en un gel desnaturalizante.

Se pueden aplicar uno o más de los siguientes: (a) KIR4.1 es KIR4.1 humano; (b) dicha proteína es un homotetrámero de KIR4.1; (c) KIR4.1 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; (d) dicho dominio extracelular consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y (e) la glucosilación de la proteína completa es como en oligodendrocitos humanos.

KIR4.1 humano se produce en su entorno natural, incluyendo oligodendrocitos humanos, en una forma homotetramérica. La secuencia de KIR4.1 humano se da en la SEQ ID NO: 3. La secuencia del dominio extracelular grande del mismo se da en la SEQ ID NO: 4.

La presente invención también proporciona un péptido (i) que consiste en una subsecuencia del dominio extracelular grande de KIR4.1 humano, cuyo dominio extracelular consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, (ii) cuya subsecuencia es de al menos 5 restos aminoácidos consecutivos de longitud, (iii) cuya subsecuencia comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o 2 y (iv) en el que el resto N de la SEQ ID NO: 1 o 2 está glucosilado como el correspondiente resto N del dominio extracelular grande de KIR4.1 de oligodendrocitos humanos, en el que KIR4.1 que está glucosilado como en oligodendrocitos humanos se caracteriza por un peso molecular de aproximadamente 38 a aproximadamente 42 kDa en un gel desnaturalizante.

Como se aprecia anteriormente, dicho péptido es una alternativa a dicha proteína. En particular, se prevé que dicho péptido imite dicha proteína. Los ejemplos incluidos en la presente proporcionan una demostración de que las características principales de dicha proteína que son clave para el método de diagnóstico de la invención de hecho se reproducen por dicho péptido.

Se describe que, en cualquiera de los péptidos definidos anteriormente, 1 o más, preferiblemente, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos pueden remplazarse por otros aminoácidos, con la condición de que la secuencia de la SEQ ID NO: 1, que está comprendida en cualquiera de los péptidos definidos anteriormente, permanezca inalterada. En la medida en que cualquiera de los péptidos definidos anteriormente comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en su totalidad, se prefiere que la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en su totalidad permanezca inalterada.

Se aprecia que la solicitud anterior WO 2012/163765 de los autores de la presente invención también describe péptidos, incluyendo péptidos relacionados con el dominio extracelular grande de KIR4.1 humano. La contribución específica de la presente invención, sin embargo, es el reconocimiento de las necesidades específicas del ensayo en términos de glucosilación del péptido para realizar el ensayo óptimamente. Esto se refleja por el tercer aspecto de la presente invención.

Los oligodendrocitos, también conocidos como oligodendroglía, son células del sistema nervioso central de determinados vertebrados incluyendo los seres humanos. Sus funciones incluyen proporcionar soporte y aislamiento a los axones.

Como una alternativa a los oligodendrocitos, pueden usarse células o líneas celulares de origen oligodendrocítico como fuente de la proteína o péptido de acuerdo con la presente invención. Una línea celular particularmente preferida, siendo dicha línea celular de origen oligodendrocítico, son las células are Oli-neu (Jung et al., *European Journal of Neuroscience*, Vol. 7, pág. 1245-1265, 1995). Las células Oli-neu, así como otras células de origen oligodendrocítico, se sabe que, o se espera que, respectivamente, proporcionen el mismo tipo de glucosilación ligada a N a KIR4.1, así como péptidos derivados del mismo, es decir, proteínas y péptidos de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida, proteínas o péptidos de acuerdo con la presente invención que se expresan a partir de células o

líneas celulares de origen oligodendrocítico (i) se aíslan como un único pico, preferiblemente mediante filtración en gel, cuyo pico único corresponde a la forma tetramérica y/o (ii) se analizan en un gel desnaturalizante para confirmar que tienen un peso molecular aparente de aproximadamente 38 a aproximadamente 42 kDa. Pesos moleculares inferiores también pueden ser aceptables.

5 Se describe un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que compete con el anticuerpo anti-KIR4.1 en una muestra obtenida de un paciente que tiene EM.

10 Los autores de la presente invención usaron el péptido de la SEQ ID NO: 2 con el fin de generar un anticuerpo. La secuencia más antigénica dentro de la SEQ ID NO: 2 es la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Esta es un primer elemento que caracteriza dicho anticuerpo. Un segundo elemento que caracteriza dicho anticuerpo es su capacidad de competir con el autoanticuerpo. Además, y similar a los autoanticuerpos de los pacientes con EM, dicho anticuerpo preferiblemente se une con una afinidad de unión a KIR4.1 de oligodendrocitos humanos cuya afinidad de unión es mayor que la afinidad de unión por formas más o menos glucosiladas. Dicho anticuerpo es un constituyente útil del kit divulgado adicionalmente a continuación.

15 Dicho anticuerpo puede unirse a un péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 o 2, en el que dicho péptido no está glucosilado está glucosilado como el resto N correspondiente del dominio extracelular grande de KIR4.1 de oligodendrocitos humanos.

20 Los anticuerpos que se divulga en este documento pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos monocatenarios o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a su diana respectiva, así como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab, F(ab₂), Fv y scFv y similares, así como derivados modificados químicamente de los mismos.

25 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, por las técnicas que se describen originalmente en Kohler y Milstein, Nature 256 (1975), 495, y Galfre, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con esplenocitos derivados de mamíferos inmunizados con modificaciones desarrolladas por la técnica. Además, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos contra los péptidos mencionados anteriormente pueden obtenerse usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos por la técnica de presentación en fagos, puede usarse resonancia de plasmones superficiales como se emplea en el sistema BIAcore para aumentar la eficacia de anticuerpos en fagos que se unen a un epítipo del péptido o polipéptido de la invención (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO 89/09622. Una fuente adicional de anticuerpos a utilizar de acuerdo con la presente invención son los llamados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe en, por ejemplo, los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. Los anticuerpos a emplear de acuerdo con la invención o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando una o más eliminaciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones de aminoácidos y/o cualquier otra modificación conocida en la técnica en solitario o en combinación. Los métodos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para los expertos en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

30 La expresión "anticuerpo monoclonal" o "policlonal" (véase Harlow y Lane, (1988), loc. cit.) también se refiere a derivados de dichos anticuerpos que retienen o retienen esencialmente su especificidad de unión. Mientras que realizaciones particularmente preferidas de dichos derivados se especifican adicionalmente en este documento a continuación, otros derivados preferidos de dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que comprenden, por ejemplo, una región variable de ratón o de rata y una región constante humana.

35 La expresión "fragmento scFv" (fragmento Fv monocatenario) es bien comprendida en la técnica y se prefiere debido a su pequeño tamaño y la posibilidad de producir de forma recombinante dichos fragmentos. En una realización particularmente preferida del método de la invención, dicho anticuerpo o parte de unión de anticuerpo es o se obtiene de un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo humanizado" significa, de acuerdo con la presente invención, un anticuerpo de origen no humano, donde al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) en las regiones variables, tal como la CDR3 y preferiblemente las 6 CDR, se han reemplazado por CDR de un anticuerpo de origen humano que tiene una especificidad deseada. Opcionalmente, la una o más regiones constantes no humanas del anticuerpo se han reemplazado por (a) una o más regiones constantes de un anticuerpo humano. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describen en, por ejemplo, el documento EP-A1 0 239 400 y el documento WO 90/07861.

40 Se describe un kit que comprende la proteína definida anteriormente y/o el péptido definido anteriormente.

65

Se describe el uso de la proteína descrita o del péptido de la invención para eliminar anticuerpos anti-KIR4.1 de la sangre o del suero de un paciente con EM, SCI o SRI o de un sujeto que porta una predisposición a desarrollar EM, SCI o SRI, o reducir la cantidad de dichos anticuerpos, en el que dicho uso tiene que lograrse *ex vivo*.

5 Con relación a ello, también se describe un método *ex vivo* de eliminación de anticuerpos anti-KIR4.1 de un líquido corporal tal como sangre o suero de un paciente con EM, SCI o SRI o de un sujeto que porta una predisposición a desarrollar EM, SCI o SRI, o reducir la cantidad de dichos anticuerpos, en el que dicho uso tiene que lograrse *ex vivo*, comprendiendo dicho método poner la sangre retirada de un sujeto en contacto con una proteína o péptido como se describe anteriormente.

10 Estos aspectos se refieren a aplicaciones *ex vivo*, estando dirigidas dichas aplicaciones *ex vivo* a una reducción del número de autoanticuerpos o una eliminación completa de los mismos. Preferiblemente, la sangre o el suero de un paciente con EM o de un sujeto que porta una predisposición a desarrollar EM se somete al tratamiento *ex vivo*. Se entiende que dicha puesta en contacto se logra en condiciones que permiten la unión de los autoanticuerpos, si están presentes, a dicha proteína o péptido. Dichas condiciones pueden establecerse poniendo en contacto sangre o suero con un vehículo o dispositivo de acuerdo con la invención, definiéndose adicionalmente dicho vehículo o dispositivo a continuación.

20 La sangre o el suero, después de dicha puesta en contacto, puede devolverse al mismo sujeto.

En casos adicionales del uso *ex vivo* o el método *ex vivo* de la invención, dicha proteína o péptido se une a un vehículo. Se prevé cualquier vehículo, incluyendo un vehículo sólido. Los materiales de soporte o vehículo habitualmente usados en la técnica y que comprenden vidrio, plástico, oro o silicio se prevén para los fines de la presente invención. Recubrimientos adecuados del vehículo o del soporte, si está presente, incluyen recubrimientos de poli-L-lisina y amino-silano, así como superficies activadas con epoxi y aldehído. Dicho vehículo puede ser la matriz de una columna. Se conocen matrices adecuadas en la técnica y pueden derivatizarse por la adhesión de dicho péptido.

25 También se describe un vehículo con una proteína o péptido como se define anteriormente que se inmoviliza en el mismo.

30 Con relación a ello, también se describe un dispositivo para eliminar anticuerpos anti-KIR4.1 de la sangre, comprendiendo dicho dispositivo el vehículo como se define anteriormente.

35 Dicho dispositivo puede comprender además una entrada y/o una salida que permiten que la sangre o el suero del sujeto fluya a través del filtro y/o que la sangre o el suero retorne al mismo sujeto.

Las figuras muestran:

40 Figura 1: KIR4.1 difiere en la materia blanca y gris en su peso molecular. KIR4.1 se aisló de cerebro humano y se trató con PNGasa. Obsérvese que las diferencias en el peso molecular de KIR4.1 surgen de la glucosilación.

Figura 2: Unión de anticuerpos específicos de KIR4.1.

45 Figura 3: mAb de ratón de Sigma (A) dirigido al dominio del extremo C captura una amplia gama de proteínas KIR4.1, incluyendo KIR4.1 altamente glucosilado. Por el contrario, el mAb de rata (B) dirigido al dominio extracelular de KIR4.1 y sueros de EM (C) extraen predominantemente la isoforma de 38-42 kDa de KIR4.1.

50 Figura 4: (A-C) Cotinción del clon de anticuerpo monoclonal de rata 20F9 con un anticuerpo policlonal de conejo comercial anti-KIR4.1 (Alomone, APC-035). De forma notable, el clon 20F9 se une a un dominio extracelular de KIR4.1 (secuencia peptídica AHGDLELDPPANHT (SEQ ID NO: 2)), mientras que el anticuerpo policlonal comercial se une a un dominio del extremo C intracelular de KIR4.1 (secuencia peptídica KLEESLREQAEKEGSALSVR (SEQ ID NO: 15)). El clon 20F9 se une a un epítipo similar que se une por IgG aislada anti-KIR4.1 de suero obtenido de pacientes con EM. Obsérvese que la inmunohistoquímica (IHC) de 20F9 en tejido de control de materia blanca subcortical presenta un patrón de tinción predominantemente perinuclear y de membrana celular. La mayoría de la tinción parece estar restringida a cuerpos celulares de oligodendrocitos (puntas de flechas grises) confirmados por cotinción con el anticuerpo comercial anti-KIR4.1. Cabe observar que, algunos astrocitos (flechas blancas) muestran una tinción perinuclear con 20F9, sin embargo, no tienen la mayoría de cuerpos celulares astrocíticos y fibras como se observa con el anticuerpo comercial anti-KIR4.1. (D-F) La cotinción de 20F9 con un anticuerpo policlonal de conejo comercial anti-Olig2 (IBL) confirma que IHC de 20F9 tiene predominantemente un patrón de tinción perinuclear y de membrana celular en oligodendrocitos (puntas de flecha). Olig2 es un factor de transcripción de oligodendrocitos. El anticuerpo anti-Olig2 se une específicamente a núcleos de oligodendrocitos y células precursoras de oligodendrocitos. (G-I) La cotinción de 20F9 con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-NogoA (clon 11C7, obsequio de M. Schwab, Zúrich) confirma que el clon 20F9 se une a citoplasmas y membranas celulares de oligodendrocitos maduros (puntas de flecha). El anticuerpo anti-NogoA se une específicamente a cuerpos celulares de oligodendrocitos maduros. (J-L) La cotinción de 20F9 con un anticuerpo monoclonal de ratón comercial anti-GFAP (Dako, 6F2) confirma que la tinción de 20F9 está restringida

a oligodendrocitos (GFAP negativos, puntas de flecha) y zonas perinucleares de un subconjunto de astrocitos (flechas blancas, GFAP positivos). Obsérvese que el astrocito en el centro no está teñido con 20F9.

Figura 5: ELISA con diferentes fracciones de KIR4.1 aisladas de células HEK transfectadas con KIR4.1-marca de his (HEK-KIR4.1-his). Obsérvese que se observó reactividad significativa únicamente en el eluido, que contenía predominantemente la variante de 38-42 kDa de KIR4.1. Obsérvese que los sueros humanos mostraron una reactividad similar a la del anticuerpo monoclonal de rata dirigido al dominio extracelular de KIR4.1. EM, sueros de pacientes con EM; Control, sueros de pacientes con otras enfermedades neurológicas. Los valores P se presentan para la comparación entre EM y Control.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Para la visualización del peso molecular de la proteína durante la electroforesis y la transferencia de Western, se han usado patrones preteñidos Blue® Plus2.

Preparación de lisado de materia blanca y materia gris

Se diseccionó tejido de materia blanca o de materia gris de cerebro humano congelado y se pesó para una cantidad igual (2,4 g). El tejido se homogeneizó usando un homogeneizador tisular de vidrio en tampón de homogeneización enfriado en hielo (sacarosa 0,32 M, HEPES 10 mM, pH 7,4, EDTA 2 mM) y cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich). La suspensión se centrifugó a 1000 g para sedimentar la fracción nuclear. Se usó centrifugación a alta velocidad y método de gradiente de sacarosa para el enriquecimiento de la fracción de membrana. El sedimento de membrana enriquecido se resuspendió en tampón de solubilización HEPES (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, n-dodecil β-D-maltósido al 1,0 % y cóctel de inhibidor de proteasa). Se investigó el extracto de proteína de membrana solubilizado con inmunotransferencia directa o inmunotransferencia de fracciones proteínicas inmunoprecipitadas. En el caso de KIR4.1, se prepararon células HEK293 transfectadas de forma transitoria (método inverso) o lisado total de células de tipo silvestre con tampón de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, n-dodecil β-D-maltósido al 1,0 % y cóctel de inhibidor de proteasa).

Inmunotransferencia

Todos los experimentos de transferencia de Western desnaturizantes se realizaron en geles de SDS al 4-12 % (Invitrogen) con mezcla de anticuerpos policlonales de conejo anti-KIR4.1 humano (Millipore y Alomne lab) usando un sistema de pico o femto detección de ECL (Thermo Scientific). Las muestras inmunoprecipitadas o purificadas por afinidad se transfirieron después de N-desglucosilación o sin desglucosilación. En el caso de transferencia de Western de gel nativo el lisado proteínico se procesó en geles de bis-tris al 4-16 % (Invitrogen) en condiciones no desnaturizantes de acuerdo con el protocolo del fabricante.

"Entrecruzamiento" de IgG en microesferas de proteína G

Anticuerpo monoclonal anti-Kir4.1 de rata dirigido al primer dominio extracelular (mAb Kir4.1-ED), anticuerpo monoclonal de ratón antiextremo C de Kir4.1, anticuerpos de control o IgG purificada de suero reactivo a KIR4.1 se entrecruzaron en microesferas de proteína G de la siguiente manera. Se lavaron 500 µl de microesferas de proteína G (GE biosciences) 3 veces con PBS. Las microesferas de proteína G lavadas se incubaron durante una noche a 4 °C con mezcla invertida (25-30 rpm) en 15 ml (30 µg/ml) de solución de anticuerpo-PBS de cualquiera de los anticuerpos. Las microesferas de proteína G unidas a IgG se lavaron con PBS 4 veces y se incubaron con 5 ml de tampón borato 50 mM durante 2 min. y el proceso se repitió dos veces. Además, se incubaron microesferas de proteína G unidas a IgG con solución de entrecruzamiento (25 mg de DMP en 4,5 ml de tampón borato 50 mM) a 25 grados durante 30 minutos. Las microesferas de proteína G entrecruzadas con IgG se lavaron con 5 ml de etanolamina y después se incubaron adicionalmente con 5 ml de etanolamina durante 1 hora a temperatura ambiente. Las microesferas se lavaron con 5 ml de PBS y se almacenaron como una suspensión al 50 %. Estas microesferas entrecruzadas se usaron en cantidades de 20-30 µl en todos los experimentos de inmunoprecipitación.

Inmunoprecipitación

El lisado proteínico se preaclará con microesferas de proteína G no unidas a IgG para la unión no específica. Se incubaron 30 µl de microesferas de proteína G "entrecruzadas" con anticuerpo con 300 µg de lisado proteínico total en 300 µl de tampón IP (tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) a 4 °C durante 3 horas. Las microesferas se lavaron con tampón de lavado (tampón IP complementado con n-dodecil β-D-maltósido al 0,1 %) dos veces y adicionalmente con tampón IP sin EDTA dos veces. La proteína capturada se eluyó dos veces con 100 µl de tampón de elución suave (SDS al 0,2, Tween 20 al 0,1 %, Tris 50 mM pH 8,0) y adicionalmente con 100 µl de tampón de elución fuerte (SDS al 0,2, Tris 50 mM pH 8,0) con un tiempo de incubación de 7 minutos cada vez a 25 °C. Cada fracción eluida se precipitó

con el método de cloroformo-metanol. La proteína precipitada se transfirió directamente o después de N-desglucosilación.

N-desglucosilación

5 La proteína KIR4.1 inmunoprecipitada o purificada por afinidad se trató con PNGasa (New England Biolab) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para determinar el tipo de glucosilación ligada a N se usó PNGasa en combinación con Endo-H de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 *Inmunofluorescencia*

Para la tinción de inmunofluorescencia, se descongeló rápidamente tejido del SNC recién diseccionado de origen humano y se incluyó en tissue-tek O.C.T (VWR Int., LLC, Radnor, PA, EE. UU.) y se realizó crioseccionamiento a -20 °C para obtener secciones de 10 µm o se usaron células HEK293 transfectadas con KIR4.1 o de tipo silvestre cultivadas en portaobjetos de cámara prerrecubiertos Nunc. Después de la fijación con metanol enfriado en hielo al 100 % durante 10 min. (en el caso de tejido) o 4 min. (en el caso de células), se realizaron etapas de bloqueo con reactivos de bloqueo de peroxidasa, avidina y biotina (Vector Laboratories Inc.) durante 15 min. cada uno y con suero de cabra, ratón o rata al 10 % en PBS-T (tween-20 al 0,05 % en solución salina tamponada con fosfato pH 7,0) durante 30 min. Las secciones entonces se incubaron con anticuerpo monoclonal diluido anti-KIR4.1 de rata para el bucle extracelular o anticuerpo policlonal de conejo para el extremo C (10 µg/ml en PBS-T) durante una noche a 4 °C. Después de múltiples etapas de lavado, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con biotina durante 1 hora a temperatura ambiente. La sección se incubó adicionalmente con complejo de avidina-biotina (Vector) durante 1 hora, con 1 µl de tiramida biotinilada en PBS con 8,8 mM de H₂O₂. Todas las etapas de lavado se realizaron con PBS-T. La unión del anticuerpo se detectó con avidina marcada con AlexaFluor 488 o AlexaFluor 555. La tinción nuclear se realizó usando antidisipador Gold con DAPI (Invitrogen). En el caso de doble tinción, se usó un segundo anticuerpo primario directamente sin complejo de avidina-biotina o anticuerpos secundarios biotinilados y se sondearon con anticuerpos anticabra, antirrata o anticonejo marcados con alexa-488 o 555. Se tomaron imágenes usando un microscopio Zeiss Cell Observer con una cámara AxioCamMRm (Carl Zeiss MicroImaging, Ltd., Göttingen, Alemania).

30 *Clonación, expresión y purificación de KIR4.1*

Para la expresión de KIR4.1 recombinante en células HEK293 u Oli-Neu, se sintetizó un ADNc de longitud completa que codificaba KIR4.1 humano con marca de hexahistidina en el extremo C (marca de his) a partir del ARNm cerebral humano total (BD Biosciences, San Jose, California) usando 5'-GCG GCC GCA CCA TGA CGT CAG TTG CCA AGG TGT ATT ACA GTC AG-3' (SEQ ID NO: 5) y 5'-CTC GAG TCA GTG GTGGTGGTGGTG GAC ATT GCT GAT GCG CAC-3' (SEQ ID NO: 6) como cebadores directo e inverso (la secuencia que codifica la marca de his está subrayada), respectivamente. La clonación en pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen) se realizó usando los sitios de restricción NotI y XhoI insertados mediante los cebadores directo e inverso respectivamente para obtener la construcción de expresión pcDNA 3.1(+)/KIR4.1. Se transfectaron de forma transitoria células HEK 293 (método inverso) con pcDNA 3.1(+)/KIR4.1 usando el reactivo de transfección lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 6 horas después de la transfección, el medio se complementó con FCS al 10 % cloruro de bario 300 mM. A las 36 horas después de la transfección, las células se recogieron y se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Después del recuento, dos mil millones de células se sometieron a lisis en 40 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 que contenía cloruro de sodio 150 mM, n-dodecil β-D-maltósido al 1,0 %, 500 unidades de nucleasa Benzonase® (Sigma) y cóctel de inhibidor de proteasa sin EDTA 1 X (Sigma). El lisado celular se centrifugó a 20 000 rpm, usando el rotor SS34 en una centrifugadora aSorvall RC6 plus durante 30 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación, el sobrenadante (lisado aclarado) se recogió y se cargó un total de 120-160 mg de proteína en una columna de purificación que contenía 3 ml de resina de cobalto HisPure™ (Pierce) preequilibrada con 15 ml de tampón de unión (tampón de lisis con maltósido al 0,1 %). El lavado se realizó con 20 ml de tampón de lavado (tampón de lisis con maltósido al 0,1 %). La elución de la fracción proteínica marcada con his se realizó con 16 ml de tampón de elución (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, imidazol 150 mM; pH 6,0). La proteína eluida se fraccionó adicionalmente en columna de filtración en gel Hiloaid de 200 µg (GE healthcare) y se usó el oligómero de KIR4.1 fraccionado de forma diferencial con baja glucosilación para ELISA.

55 *ELISA de KIR4.1*

La proteína KIR4.1 se aísla por purificación por afinidad basada en microesferas de cobalto (Thermo Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones en la sección de método para la clonación, expresión y purificación de KIR4.1. La proteína KIR4.1 oligomérica purificada por afinidad se fracciona adicionalmente y se purifica con columna de filtración en gel Hi-load de 200 µg (GEBiosciences, Pittsburgh, PA). La calidad de la proteína oligomérica refleja el estado de glucosilación de la expresión de proteína KIR4.1 en materia blanca (oligodendrocitos) y que puede determinarse procesando la proteína en un gel de bis-tris del 4 % al 12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) con condiciones reductoras y no reductoras junto con gel Blue Native de un 4 % a un 16 % (Invitrogen). La proteína recién purificada se usa preferiblemente en todos los ensayos porque la proteína KIR4.1 es propensa a formar agregados solubles a 4 °C o en ciclos de congelación/descongelación. El recubrimiento de placa se hace a 4 °C durante una noche con

100 µl de 7 µg/ml de KIR4.1 oligomérico no agregado en PBS. Es aconsejable ejecutar la valoración de la concentración de recubrimiento proteínico para conocer el punto de saturación exacto usando anticuerpo monoclonal 20F9 (generado contra el primer dominio extracelular de KIR4.1; competición con autoanticuerpos de los sueros de pacientes con EM) como indicador. La proteína en exceso usada por encima del punto de saturación es propensa a agregación en placa y crea variabilidad en el ensayo. Después de recubrimiento durante una noche la placa se lava 3 veces con PBST (solución salina tamponada con fosfato, Tween 20 al 0,5 %) y se bloquea con 200 µl de tampón de ultra bloqueo BUF033 (Biorad) durante 1 hora a 25 °C. Debe evitarse leche desnatada como bloqueante porque las diferencias en la calidad de la leche podrían tener efectos impredecibles en la accesibilidad del epítipo. Después del bloqueo, las placas se lavan 3 veces con PBST y deben incubarse a 25 °C con 100 µl de solución de suero o plasma diluido (1:100) en tampón de dilución de ensayo BUF037B (Biorad) durante 2-3 horas en un agitador orbital (90 rpm). Después de la incubación de los sueros, las placas se lavan 5 veces con PBST antes de sondear con anticuerpo secundario anti-IgG humana (Sigma) diluido (1:10000) en tampón de dilución de ensayo BUF037B. Las placas se incuban a 25 °C durante 1 hora en un agitador orbital (90 rpm). Finalmente, las placas se lavan 5 veces con PBST y el ensayo debe revelarse con 25 °C equilibrado con 100 µl de solución de TMB durante 22-25 minutos. La reacción se detiene con 50 µl de H₂SO₄ 2 N. Las muestras se procesan preferiblemente por triplicado para determinar la variación dentro del ensayo. Todos los sueros y los sueros para determinar el valor de corte deben medirse en el mismo ensayo. Ninguna de las muestras usadas en el ensayo debe haberse descongelado o haberse vuelto a congelar. Para un mejor rendimiento, la densidad óptica (DO) del fondo de suero de control promedio debe ser de aproximadamente 0,5 con un límite máximo de 0,8. La variación entre ensayos máxima aceptable para la mejor calidad del ensayo es un CV de menos de un 8 % y la variación dentro del ensayo de menos de un 5 %. El valor de corte debe determinarse para cada ensayo mediante la DO obtenida del mismo conjunto de donadores de control sanos (HC). El ensayo es sensible a la calidad del suero. La DO promedio, así como la variación dentro del ensayo y entre ensayos obtenida con sueros de EM negativos de anticuerpo KIR4.1 debe reflejar la de sueros de pacientes con otras enfermedades neurológicas (OND). El ensayo es preferiblemente con al menos 3 preparaciones proteínicas diferentes para determinar la variabilidad entre ensayos.

Ejemplo 2

Resultados

Glucosilación diferencial de KIR4.1

KIR4.1 tiene un sitio de N-glucosilación, que está ubicado en el dominio extracelular más grande y puede experimentar glucosilación diferencial (véase la figura 1). El análisis de la proteína KIR.1 de materia blanca subcortical y materia gris cortical reveló diferencias en el peso molecular de la proteína. En materia blanca, una proteína de 38-42 kDa, en materia gris, una proteína KIR4.1 de 49-55 kDa, es dominante. De forma interesante, KIR4.1 de 49-55 kDa también es dominante en tejido de glioma. La desglucosilación con PNGasa, que elimina específicamente la N-glucosilación, reveló en ambos casos una proteína de 34 kDa correspondiente al peso molecular de KIR4.1 desglucosilado. Esto sugiere que KIR4.1 se N-glucosila de forma diferencial en el SNC (véase la figura 1).

Anticuerpo que compete con el autoanticuerpo de pacientes con EM

Para abordar adicionalmente este punto, se generó un anticuerpo monoclonal de rata (20F9) contra el primer dominio extracelular de KIR4.1 (figura 2). El anticuerpo 20F9 es un ejemplo del anticuerpo de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención.

El anticuerpo 20F9 precipita predominantemente el KIR4.1 de 38-42 kDa poco glucosilado. En contraste con los anticuerpos monoclonales dirigidos al extremo C de KIR4.1, este anticuerpo no extrae la proteína KIR4.1 de 49-55 kDa muy glucosilada. De forma interesante, se observa el mismo patrón de unión con anticuerpos específicos de KIR4.1 de sueros de EM (véase la figura 3). Estos hallazgos sugieren que una mayor glucosilación del epítipo antigénico podría tener un efecto estérico en la interacción de antígeno-anticuerpo y posiblemente inhibiría la unión del anticuerpo.

Glucosilación de KIR4.1 específica de oligodendrocitos

Se realizaron tinciones de tejido cerebral humano con el anticuerpo 20F9 (figura 4). Este anticuerpo tiñe predominantemente oligodendrocitos y en un menor grado astrocitos. De forma interesante, el patrón de tinción de este anticuerpo es significativamente diferente del patrón de tinción de anticuerpos monoclonales dirigidos al extremo C de KIR4.1. Aunque los últimos anticuerpos tiñen astrocitos y oligodendrocitos en un grado similar, 20F9 tiñe preferentemente oligodendrocitos y no logra teñir fibras astrocíticas que sugieran que el estado de glucosilación de KIR4.1 difiere entre astrocitos y oligodendrocitos.

Para demostrar el impacto de la diferente glucosilación para la unión del anticuerpo, se fraccionó la proteína KIR4.1 recombinante aislada de células HEK y sueros de EM ensayados para la reactividad con las diferentes fracciones. Los anticuerpos contra KIR4.1 comprendidos en el suero de pacientes con EM reaccionaron con la fracción 1 en que la proteína de 38-42 kDa estaba enriquecida, pero no lograron reaccionar con la fracción 2 que contenía predominantemente KIR4.1 altamente glucosilado (figura 5). Asimismo, el anticuerpo 20F9 reaccionó fuertemente con

la fracción 1, pero mucho menos con la fracción 2, aunque se usó la misma concentración de proteína. En línea con este hallazgo, los sueros de EM capturaron la proteína KIR4.1 de 38-42 kDa, pero no lograron capturar KIR4.1 altamente glucosilado de células HEK WT y transfectadas con KIR4.1 (figura 4).

5 *Conclusión*

KIR4.1 se produce en varios estados de glucosilación que varían desde ausencia de glucosilación hasta fuerte glucosilación. Los oligodendrocitos expresan KIR4.1 poco glucosilado.

10 El epítipo antigénico en el bucle extracelular de KIR4.1 contiene un motivo de N-glucosilación, que es propenso a glucosilación compleja. El grado de glucosilación depende del tipo y fase celular.

15 Generando un anticuerpo monoclonal dirigido al mismo dominio extracelular de KIR4.1 humano (clon 20F9), que es reactivo a IgG de suero humano, se observó que el nivel de glucosilación del dominio extracelular tiene un impacto importante en la unión del anticuerpo. El anticuerpo 20F9 se une a KIR4.1 únicamente cuando la proteína está débilmente glucosilada o no glucosilada. La fuerte glucosilación anula la unión.

20 La IgG de sueros de EM se comporta de forma similar al anticuerpo 20F9. Los anticuerpos se unen a KIR4.1 débilmente glucosilado o no glucosilado (correspondiente a variantes de 38-42 kDa expresadas en oligodendrocitos) pero no a la proteína KIR4.1 fuertemente glucosilada. Los ensayos que no presentan la variante de KIR4.1 de 38-42 no pueden detectar el anticuerpo en sueros de EM y, por lo tanto, pueden proporcionar resultados negativos falsos.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

<120> Diagnóstico de esclerosis múltiple

30 <130> X1580 PCT

<150> EP14 16 6705.5

<151> 30-04-2014

35 <160> 17

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 5

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de KIR4.1

45 <400> 1

Asp Pro Pro Ala Asn
1 5

50 <210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> fragmento de KIR4.1

<400> 2

Ala His Gly Asp Leu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn His Thr
1 5 10 15

60

ES 2 750 648 T3

<210> 3
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

```

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

130         135         140
Val Leu Leu Ile Ala Gln Leu Val Leu Thr Thr Ile Leu Glu Ile Phe
145         150         155         160
Ile Thr Gly Thr Phe Leu Ala Lys Ile Ala Arg Pro Lys Lys Arg Ala
165         170         175
Glu Thr Ile Arg Phe Ser Gln His Ala Val Val Ala Ser His Asn Gly
180         185         190
Lys Pro Cys Leu Met Ile Arg Val Ala Asn Met Arg Lys Ser Leu Leu
195         200         205
Ile Gly Cys Gln Val Thr Gly Lys Leu Leu Gln Thr His Gln Thr Lys
210         215         220
Glu Gly Glu Asn Ile Arg Leu Asn Gln Val Asn Val Thr Phe Gln Val
225         230         235         240
Asp Thr Ala Ser Asp Ser Pro Phe Leu Ile Leu Pro Leu Thr Phe Tyr
245         250         255
His Val Val Asp Glu Thr Ser Pro Leu Lys Asp Leu Pro Leu Arg Ser
260         265         270
Gly Glu Gly Asp Phe Glu Leu Val Leu Ile Leu Ser Gly Thr Val Glu
275         280         285
Ser Thr Ser Ala Thr Cys Gln Val Arg Thr Ser Tyr Leu Pro Glu Glu
290         295         300
Ile Leu Trp Gly Tyr Glu Phe Thr Pro Ala Ile Ser Leu Ser Ala Ser
305         310         315         320
Gly Lys Tyr Ile Ala Asp Phe Ser Leu Phe Asp Gln Val Val Lys Val
325         330         335
Ala Ser Pro Ser Gly Leu Arg Asp Ser Thr Val Arg Tyr Gly Asp Pro
340         345         350
Glu Lys Leu Lys Leu Glu Glu Ser Leu Arg Glu Gln Ala Glu Lys Glu
355         360         365
Gly Ser Ala Leu Ser Val Arg Ile Ser Asn Val
370         375
    
```

10

<210> 4
 <211> 38
 <212> PRT

ES 2 750 648 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

      Gly Val Val Trp Tyr Leu Val Ala Val Ala His Gly Asp Leu Leu Glu
      1      5      10      15
      Leu Asp Pro Pro Ala Asn His Thr Pro Cys Val Val Gln Val His Thr
      20      25      30
      Leu Thr Gly Ala Phe Leu
      35
  
```

5

<210> 5

<211> 44

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..44

15 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar"/nota="Cebador"/organismo="Secuencia artificial"

<400> 5

gcggccgcac catgacgtca gttgccaagg tgtattacag tcag 44

20

<210> 6

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<222> 1..45

<223> /mol_tipo="ADN sin asignar"/nota="Cebador"/organismo="Secuencia artificial"

30

<400> 6

ctcgagtcag tgggtgtgt ggtggtggac attgctgatg cgcac 45

35

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> fragmento de KIR4.1

<400> 7

```

      Leu Asp Pro Pro Ala Asn
      1      5
  
```

45

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> fragmento de KIR4.1

<400> 8

```

      Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn
      1      5
  
```

55

ES 2 750 648 T3

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 <400> 9
 10
 Leu Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 20
 <400> 10
 Leu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn
 1 5
 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 30
 <400> 11
 Asp Leu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn
 1 5 10
 35
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 <400> 12
 45
 Gly Asp Leu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 55
 <400> 13

ES 2 750 648 T3

His Gly Asp Leu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn
 1 5 10

5 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 <400> 14

Ala His Gly Asp Leu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Ala Asn
 1 5 10

15 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 <400> 15

25 Lys Leu Glu Glu Ser Leu Arg Glu Gln Ala Glu Lys Glu Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Ser Val Arg
 20

30 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 <400> 16

Pro Pro Ala Asn His Thr
 1 5

40 <210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> fragmento de KIR4.1
 <400> 17

Pro Pro Ala Asn
 1

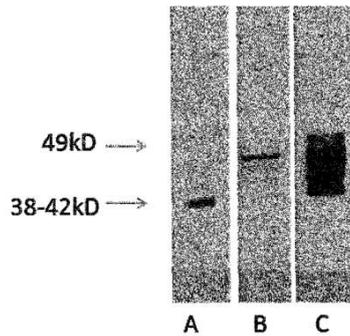
50

REIVINDICACIONES

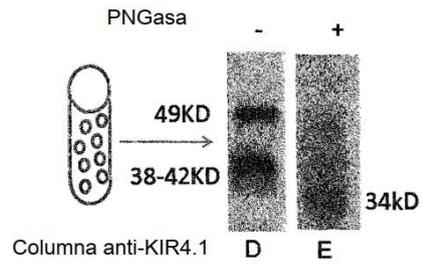
- 5 1. Un método para diagnosticar esclerosis múltiple (EM), síndrome clínicamente aislado (SCI) y/o síndrome radiológicamente aislado (SRI) o una predisposición a cualquiera de las afecciones en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de un anticuerpo anti-KIR4.1 en una muestra obtenida de dicho sujeto mediante
- (a) poner en contacto dicha muestra con un péptido; y
(b) detección de la formación de un complejo de péptido-anticuerpo anti-KIR4.1;
- 10 en el que dicho péptido
- (i) consiste en una subsecuencia del dominio extracelular grande de KIR4.1 humano, cuyo dominio extracelular consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- 15 (ii) cuya subsecuencia es de al menos 5 restos aminoácidos consecutivos de longitud,
(iii) cuya subsecuencia comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o 2, y
(iv) en el que el resto N de la SEQ ID NO: 1 o 2 está glucosilado como el resto N correspondiente del dominio extracelular grande de KIR4.1 de oligodendrocitos humanos;
- 20 en el que KIR4.1 que está glucosilado como en oligodendrocitos humanos se caracteriza por un peso molecular de aproximadamente 38 a aproximadamente 42 kDa en un gel desnaturalizante,
y en el que la formación de dicho complejo es indicativa de EM, SCI, SRI o una predisposición a las mismas.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que, en el caso de que dicho anticuerpo anti-KIR4.1 esté presente en dicha muestra,
- (a) la presencia de al menos un síntoma clínico de EM, SCI o SRI en dicho sujeto es indicativa de EM, SCI o SRI, respectivamente; y
(b) la ausencia de cualquier síntoma clínico de EM, SCI y SRI es indicativa de dicha predisposición a EM, SCI y SRI.
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho péptido está comprendido en una célula *in vitro*, preferiblemente en la membrana celular de dicha célula.
- 35 4. Un péptido
- (i) que consiste en una subsecuencia del dominio extracelular grande de KIR4.1 humano, cuyo dominio extracelular consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,
- 40 (ii) cuya subsecuencia es de al menos 5 restos aminoácidos consecutivos de longitud,
(iii) cuya subsecuencia comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1 o 2, y
(iv) en el que el resto N de la SEQ ID NO: 1 o 2 está glucosilado como el resto N correspondiente del dominio extracelular grande de KIR4.1 de oligodendrocitos humanos, en el que KIR4.1 que está glucosilado como en oligodendrocitos humanos se caracteriza por un peso molecular de aproximadamente 38 a aproximadamente 42 kDa en un gel desnaturalizante.
- 45 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el péptido de la reivindicación 4, en el que dicho péptido se obtiene de oligodendrocitos humanos o de una línea celular de origen oligodendrocítico.

Figura 1

Transferencia de Western directa con mezcla de anticuerpos policlonales de conejo
(Millipore y Alomone Lab)



A- Materia blanca
B- Materia gris
C- Biopsia de glioma



D- KIR4.1 aislado de cerebro sin PNGasa
E- KIR4.1 aislado de cerebro con tratamiento con PNGasa

Figura 2

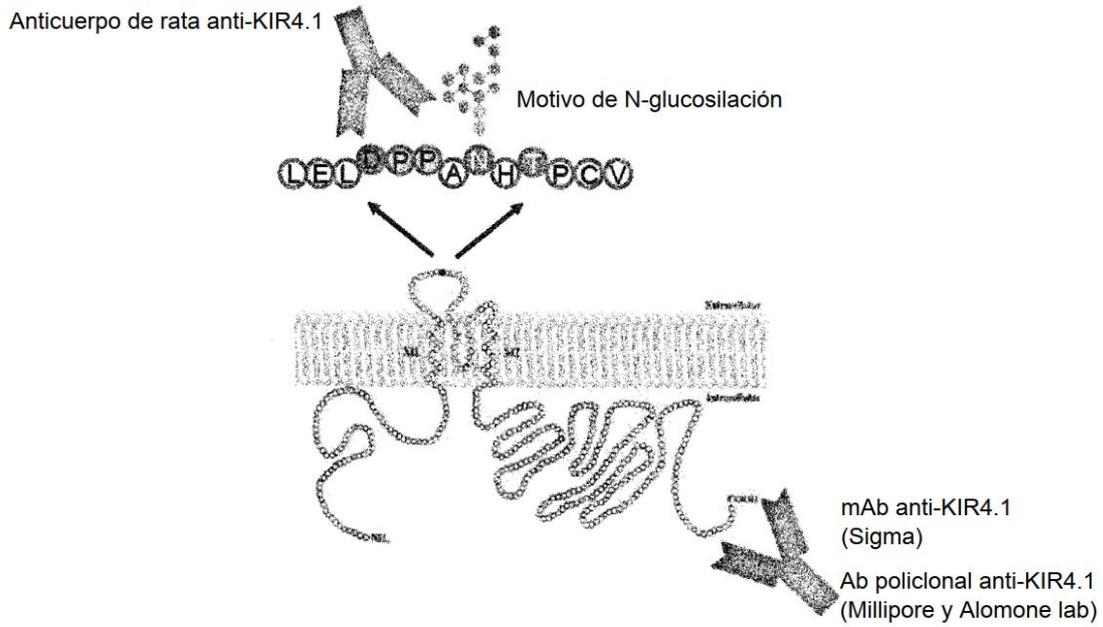
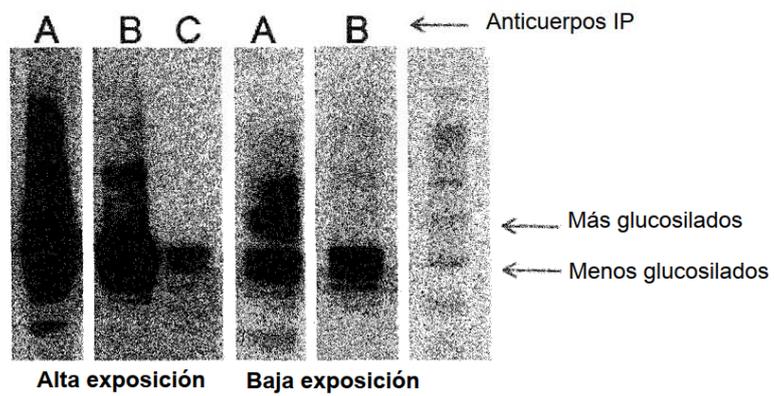


Figura 3

Inmunoprecipitación nativa de células HEK293-KIR4.1. La transferencia de Western se realizó con mezcla de anticuerpos policlonales de conejo (Millipore y Alomone Lab)



A = anticuerpo monoclonal de Sigma para el dominio del extremo C
 B = anticuerpo monoclonal de rata para el bucle extracelular
 C = suero de EM con alto título de anticuerpo contra KIR4.1 por ELISA

Figura 4

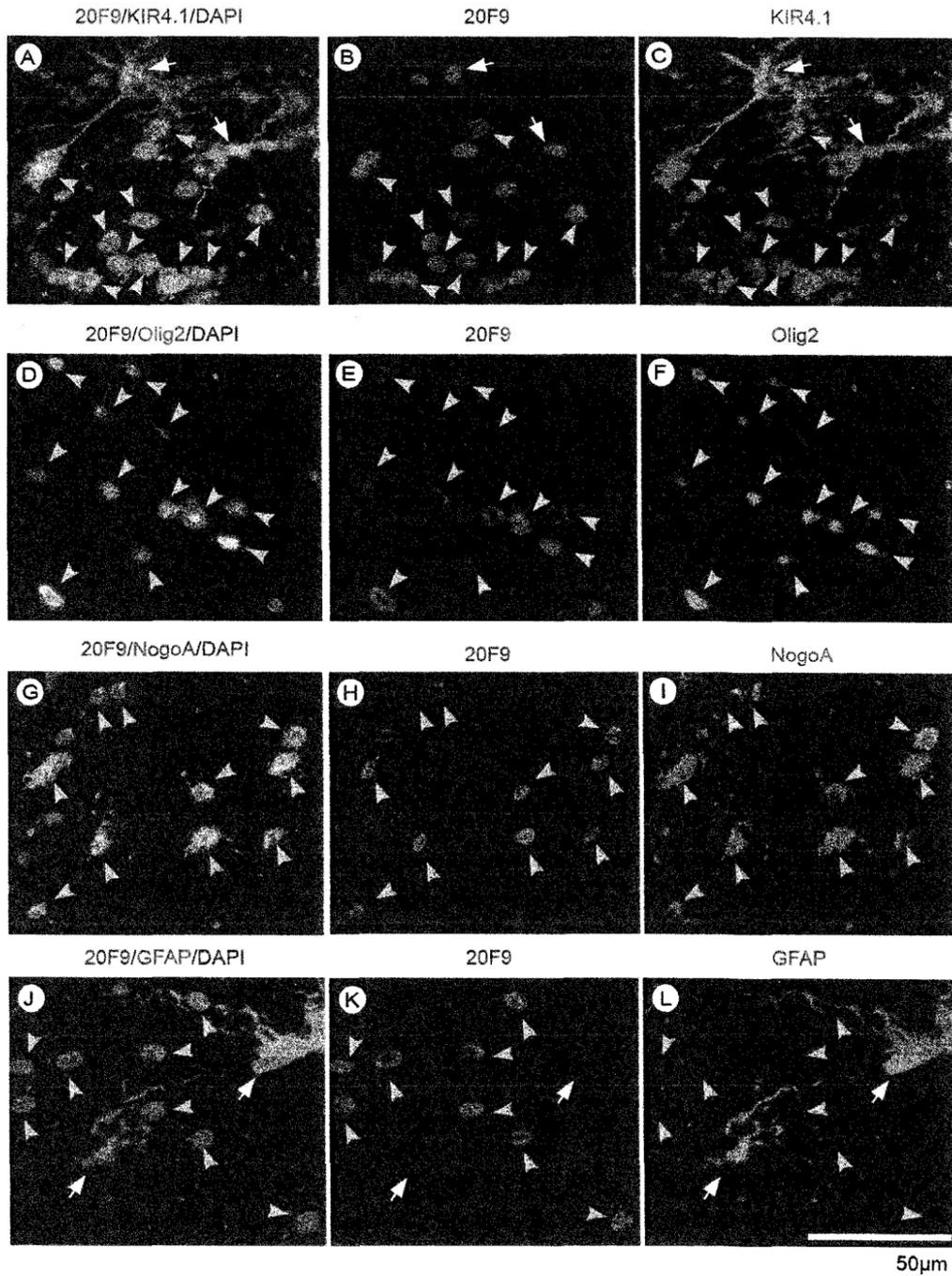


Figura 5

