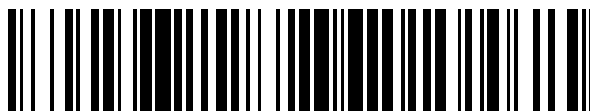


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 609**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2014** **PCT/EP2014/072252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015** **WO15055776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2014** **E 14786173 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 3058376**

54 Título: **Procedimiento diagnóstico para detectar una enfermedad autoinmunitaria relacionada con gaba(a) y materia objeto relacionada**

30 Prioridad:

17.10.2013 EP 13189172

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (50.0%)
C / Rosselló 149- 153
08036 Barcelona, ES y
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (50.0%)**

72 Inventor/es:

DALMAU, JOSEP

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 768 609 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

Procedimiento diagnóstico para detectar una enfermedad autoinmunitaria relacionada con gaba(a) y materia objeto relacionada

Campo de la invención

- 5 la presente invención se refiere al pronóstico, diagnóstico y tratamiento de un trastorno autoinmunitario identificado recientemente, proporcionando un novedoso autoantígeno de la superficie celular y los medios y procedimientos asociados para la detección y el tratamiento de dicho trastorno autoinmunitario.

Antecedentes de la invención

- Existen evidencias de que los ataques y estados epilépticos pueden ser el resultado de respuestas inmunitarias a receptores sinápticos excitadores o inhibidores o las proteínas que se asocian a estos receptores.⁶ Estos incluyen el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDAR), el receptor del ácido alfa-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoloalopropiónico (AMPA), el receptor del ácido-B gamma aminobutírico (GABA)(B)R, la proteína 1 inactivada por glioma rica en leucina (LGI1), la proteína análoga a 2 asociada a contactina (Caspr2), y DPPX, una subunidad reguladora de los canales de potasio Kv4.2.²¹ Los ataques epilépticos que acompañan cualquiera de estos trastornos son a menudo refractarios a la terapia antiepiléptica a menos que el mecanismo inmunitario se identifique y trate.^{2,15,22} En algunos pacientes, las convulsiones o el estado epiléptico puede ser la primera manifestación de la enfermedad, requiriendo una fuerte sedación o un prolongado coma farmacológico.^{3,17} Estos tratamientos pueden ocultar otros síntomas tales como discinesias o alteraciones psiquiátricas que producen un retraso en el reconocimiento de la enfermedad. Hasta hace poco, el principal receptor inhibidor relacionado con la epilepsia diana de la autoinmunidad era el GABA(B)R.²² La mayoría de pacientes con anticuerpos GABA(B)R desarrollan convulsiones tempranas y prominentes o un estado epiléptico como un componente de la encefalitis límbica. Aproximadamente 50 % de estos pacientes tienen un cáncer de pulmón microcítico subyacente (SCLC).^{11,16}

- Considerando que hasta hace poco estas enfermedades autoinmunitarias eran desconocidas, la alta frecuencia relativa de algunas ha sido sorprendente. Por ejemplo, en un centro enfocado hacia el diagnóstico y la epidemiología de la encefalitis (Proyecto der la Encefalitis de California) la frecuencia de la encefalitis anti NMDAR sobrepasa la de cualquier encefalitis vírica individual.³² Por estos motivos, mecanismos inmunitarios similares están considerándose de forma creciente en pacientes que desarrollan síntomas neuropsiquiátricos rápidamente progresivos en el contexto de la encefalitis de etiología desconocida, una situación que se produce frecuentemente. Hoy en día, aproximadamente un 70 % de la encefalitis de etiología incierta permanece sin diagnosticar tras la extensa evaluación de las etiologías infecciosas.³³ En este escenario, La identificación de auto anticuerpos contra antígenos de la superficie celular neuronal desplaza la gestión al uso de la inmunoterapia y puede extender el soporte de cuidados intensivos en casos que de otra manera pueden considerarse fútiles.

- En vista de lo anterior, el problema que subyace en la presente invención reside en proporcionar medios para el diagnóstico y tratamiento de una encefalitis autoinmunitaria no identificada anteriormente, o encefalitis de etiología desconocida, respectivamente.

Sumario de la invención

- La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. El problema anteriormente mencionado se resuelve mediante la materia objeto de la presente descripción y las reivindicaciones adjuntas, en particular proporcionando un receptor del ácido A gamma-aminobutírico (GABA(A)R), un novedoso autoantígeno implicado en enfermedades autoinmunitarias, que es para su uso en un procedimiento de pronóstico, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, en particular la encefalitis, en una célula que expresa dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, un anticuerpo que se une a dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, en un procedimiento para aislar dicho anticuerpo, en un procedimiento de pronóstico o diagnóstico *in vitro* y un kit de ensayo que implica dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o dicha célula o anticuerpo, en una composición farmacéutica que comprende dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o dicha célula, en un dispositivo médico revestido con dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, dicha célula, dicho anticuerpo o dicha composición farmacéutica y los procedimientos para tratar un trastorno autoinmunitario, en particular la encefalitis, en un sujeto.

- Aunque el GABA(B)R, citado en el presente documento anteriormente, pertenece a la categoría de los receptores metabotrópicos acoplados a la proteína G, el GABA(A)R es un canal de iones regulado por ligandos que no se ha reconocido anteriormente como diana de autoinmunidad. Los inventores notifican aquí la identificación del GABA(A)R como la diana de anticuerpos de 18 pacientes que comprende dos grupos inmunitarios: uno caracterizado por altos niveles de anticuerpos en suero y CSF que se producen en asociación con convulsiones prominentes o estado epiléptico, y el otro caracterizado por bajos niveles de anticuerpos en suero o anticuerpos ausentes en CSF que se producen en asociación con un espectro más amplio de síntomas en el que la frecuencia de convulsiones, opsoclonos, síndrome de persona rígida, y autoinmunidades solapantes es alto. Además, Los inventores demuestran que los

anticuerpos de los pacientes alteran específicamente los niveles de GABA(A)R sináptico en cultivos de neuronas del hipocampo de rata.

- 5 Una ventaja de la presente invención reside en el hecho de que el diagnóstico de la encefalitis de etiología desconocida permite la identificación de la enfermedad como encefalitis autoinmunitaria, la distinción de otras formas (no autoinmunitarias de encefalitis u otras enfermedades o síntomas relacionados, respectivamente, y proporciona por tanto un tratamiento específico de los pacientes con, por ejemplo, agentes inmunosupresores.

Otra ventaja de la presente invención se basa en abrir opciones terapéuticas alternativas o adicionales a la inmunosupresión, dirigidas, por ejemplo, a los autoanticuerpos específicos.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra IRM del cerebro del paciente 1;
La Figura 2 muestra IRM del cerebro del paciente 2;
La Figura 3 muestra registros EEG de los pacientes 1 y 2;
La Figura 4 muestra la reactividad del anticuerpo CSF con un cerebro de rata;
La Figura 5 muestra la reactividad del CSF del paciente con el hipocampo y el cerebelo de rata a un alto aumento;
15 La Figura 6 muestra la reactividad del anticuerpo CSF con células HEK que expresan GABA(A)R;
La Figura 7 muestra los resultados de la inmunoabsorción usando células HEK que expresan GABA(A)R;
La Figura 8 muestra los resultados de los estudios de inmunocompetición con anticuerpos del paciente; y
la Figura 9 muestra la selectividad y los efectos de la unión de los anticuerpos del paciente a GABA(A)R.

Descripción detallada de la invención

- 20 Un "polipéptido", de acuerdo con la presente invención, se entiende que es un polímero de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más o hasta miles de aminoácidos, que puede incluir aminoácidos convencionales así como aminoácidos no convencionales. Los términos polipéptido, péptido y proteína se usan de manera indistinta en el presente documento.

- 25 El término "fragmento", con respecto a los polipéptidos, péptidos y proteínas de la invención, se refiere a menos de la secuencia de longitud completa de dicho polipéptido, péptido o proteína, abarcando por ejemplo una secuencia de aminoácidos que está truncada en uno o ambos términos por uno o más aminoácidos. Como alternativa o además, dicha secuencia peptídica puede comprender delecciones internas de uno o más aminoácidos. Por tanto, la longitud residual del fragmento iguala o excede la longitud de uno o más epítopos continuos o conformacionales. Cuando se refiere a un complejo que comprende más de un polipéptido, péptido o proteína, el término "fragmento" se refiere a un
30 complejo con solo un subconjunto de sus constituyentes, lo que significa que el número de polipéptidos, péptidos o proteínas, es decir, las subunidades que constituyen el complejo, es reducido y/o que una o más de las subunidades en el complejo está terminalmente truncada y/o soporta delecciones internas como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos de acuerdo con la presente invención comprenden al menos 20 aminoácidos.

- 35 el término "homólogo", con respecto a los polipéptidos, péptidos y proteínas de la invención, se entiende que se refiere a un polipéptido, péptido y proteína, que presenta una o más desviaciones en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia original. Aquellas desviaciones pueden ser intercambios o inserciones de uno o más aminoácidos o motivos de proteínas o dominios de proteínas. Un homólogo puede tener al menos un 80, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % de identidad de la secuencia con la secuencia original respectiva. Alternativamente, el tramo de homología puede estar restringido a 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de
40 la secuencia original. También, en dicho caso, por ejemplo, en el caso de homología de un dominio o motivo de proteína único en el contexto de una proteína no homóloga más grande, el homólogo puede tener al menos un 80, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia original respectiva. Cuando se refiere a un complejo que comprende más de un polipéptido, péptido, proteína o fragmentos de los mismos, el término "homólogo" se refiere a un complejo con al menos una de sus subunidades que está sustituida por un homólogo como se ha descrito en el
45 presente documento anteriormente.

- La expresión "enfermedad autoinmunitaria", con respecto a la presente invención se refiere a enfermedades en asociación con anticuerpos contra GABA(A)R. Como se notifica en el presente documento a continuación, los pacientes que presentan dicha enfermedad autoinmunitaria padecen de síntomas que incluyen problemas de memoria, confusión, fatiga, apatía, ansiedad social, cambios conductuales, psicosis, depresión, mutismo, disfunción cognitiva,
50 náuseas, vértigo, escotomas centelleantes, cefalea, convulsiones, epilepsia parcial continua, estado epiléptico, opsoclon, opsoclon-mioclon, síndrome de persona rígida, movimientos distónicos de la lengua, corea que afecta las extremidades y el tronco, hemiparesis progresiva, ataxia, corea que afecta las extremidades y el tronco. Estos

síntomas afectan principalmente al sistema nervioso y, más específicamente, están al menos en parte asociados con defectos en el sistema nervioso central. Por lo tanto, la enfermedad autoinmunitaria de acuerdo con la invención puede ser una encefalitis autoinmunitaria.

Un "epítipo", comprendido en el ámbito de la presente invención, se entiende que es un fragmento de una o varias proteínas que ser reconocidas específicamente (es decir, unirse) por un anticuerpo. El epítipo puede ser un epítipo conformacional, compuesto de secciones discontinuas procedente de una secuencia de aminoácidos de una única proteína o secciones discontinuas de varias proteínas diferentes, o un epítipo lineal, compuesto de una sección continua de determinada longitud procedente de una secuencia de aminoácidos de una única proteína. Por ejemplo, los epítipos MHC lineales de clase I tienen aproximadamente de 8 a 11 aminoácidos de longitud. Además del anterior, el término "epítipo" abarca también los epítipos derivados de la secuencia original de la proteína o proteínas.

El término "derivado", con respecto a los epítipos, comprendidos en el ámbito de la presente invención se refiere a los epítipos formados a partir de secciones discontinuas o continuas de la secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido o proteína. Se sabe en la técnica, que uno o más aminoácidos en los epítipos pueden estar sustituidos por ejemplo por sustituciones de aminoácidos conservativas (por ejemplo, glutamato a aspartato E D, glutamina a asparaginas Q N, fenilalanina a tirosina F Y, leucina a isoleucina L I) sustancialmente sin cambiar la fuerza o especificidad de unión al anticuerpo. En consecuencia, el término "derivado" se refiere también a dichos epítipos que, aunque presentan diferencias en la secuencia de aminoácidos, presentan una fuerza de unión a anticuerpo o especificidad sin cambiar o sustancialmente sin cambiar o potenciada cuando se compara a epítipos con la secuencia de aminoácidos original.

"Ácido nucleico", de acuerdo con la presente invención, se refiere a un polímero de ADN o ARN que incluye también derivados químicos de los mismos o análogos sintéticos tales como ácidos nucleicos peptídicos o ácidos nucleicos de morfolino. Se sabe en la técnica que, debido a la degeneración del código genético, determinados cambios del código del ácido nucleico no dan como resultado cambios de la secuencia peptídica codificada en la anterior. En consecuencia, a expresión "ácido nucleico" abarca también secuencias de ácido nucleico que difieren en la secuencia de las secuencias de ácido nucleico originales siempre que codifiquen la misma secuencia peptídica, por ejemplo, secuencias con la utilización de un codón optimizada para la expresión en determinados sistemas de expresión.

se entiende que un "vector" de acuerdo con la presente invención puede ser una secuencia de ácido nucleico circular o lineal que incluye una inserción, por ejemplo, una secuencia de un gen o un ácido nucleico que codifica una proteína deseada, y otras características tales como las secuencias requeridas para la replicación del vector, la expresión de la inserción, la selección positiva del vector que soporta células hospedadoras o la expresión de proteínas marcadoras. Dichos vectores y secuencias se conocen de forma extensa de la técnica anterior.

Una "célula" comprendida en el ámbito de la presente invención es cualquier célula hospedadora procariota o eucariota capaz de transformarse con un vector. Por ejemplo, una célula puede ser una célula bacteriana tal como una célula *Escherichia coli* o una célula eucariota tal como una célula de un cultivo humano inmortalizada. Un ejemplo de una célula de un cultivo humano inmortalizada es una célula HEK293.

Un "sujeto" está comprendido en el ámbito de la presente invención, en particular, un ser humano.

Las expresiones "receptor de ácido- γ amino-butyrico", "receptor de GABA(A)", "GABA_AR" o "GABA(A)R" se refiere al receptor que incluye todas sus subunidades y combinaciones de subunidades conocidas. GABA(A)R, como se mencionó al principio, es un canal de iones regulado por ligando, que responde al neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutyrico. Como se describirá en el presente documento a continuación en mayor detalle, el receptor está comprendido por 5 subunidades que se originan de ocho familias de genes que codifican 19 tipos de subunidades conocidas diferentes. GABA(A)R se produce en el tejido neural, principalmente en el sistema nervioso central y en la médula espinal. Se puede encontrar también en el sistema nervioso periférico, por ejemplo, en las neuronas motoras. Las subunidades más abundantes son las subunidades de tipo alfa y de tipo beta, que son constituyentes obligatorios de cualquier GABA(A)R. GABA(A)R está muy conservado de tal manera que incluso el GABA(A)R de especies relacionadas únicamente de forma distante con el humano es adecuado para estimular la unión específica por anticuerpos humanos dirigidos contra GABA(A)R. Esto es válido para subunidades del GABA(A)R. Como se ha mencionado en el presente documento anteriormente, por ejemplo, los epítipos MHC lineales de clase I tienen aproximadamente de 8 a 11 aminoácidos de longitud. Por lo tanto, en regiones ya homólogas de GABA(A)R de entre 8 a 11 aminoácidos de longitud, conservadas entre las especies respectivas y el ser humano, son en principio suficientes para estimular la unión específica por anticuerpos humanos dirigidos contra GABA(A)R. A este respecto, las secuencias conformadas que forman un epítipo conformacional pueden ser incluso más cortas. En consecuencia, "GABA(A)R", "GABA_AR" o "GABA(A)R" con respecto a la presente invención se refiere a cualquier isoforma conocida de las subunidades de proteínas de GABA(A)R que se originan de vertebrados, preferentemente mamíferos o más preferentemente *Homo sapiens*.

Los presentes inventores han identificado GABA(A)R como antígeno diana de la encefalitis autoinmunitaria. Se describen 18 pacientes con anticuerpos contra GABA(A)R y se ha demostrado que los anticuerpos de los pacientes eliminan GABA(A)R de los sitios sinápticos. Estos hallazgos son importantes debido a que títulos elevados de anticuerpos está normalmente asociados con notables convulsiones y estado epiléptico refractario que requiere coma

inducido farmacológicamente, mientras que se pueden producir títulos bajos con convulsiones, opsoclonio-mioclono, o síndrome de persona rígida, que está acompañados frecuentemente por anticuerpos contra otras proteínas gabaérgicas (GAD), o TPO que sugieren propensión a la autoinmunidad.

Cinco conjuntos de experimentos, descritos con detalle en los ejemplos siguientes en el presente documento, establecen GABA(A)R como autoantígeno relevante en pacientes con altos niveles de anticuerpos en suero y CSF: 1 inmunoprecipitación directa del receptor por los anticuerpos del paciente, 2) inmunotinción específica de células HEK que expresan las subunidades alfa 1 y/o beta 3 del GABA(A)R con anticuerpos del paciente, 3) anulación de la actividad de los anticuerpos del paciente con neuropilo cerebral tras la inmunoabsorción con las subunidades alfa 1 / beta 3 del GABA(A)R, 4) competición de los anticuerpos del paciente por los mismos epítomos de GABA(A)R, y 5) demostración de que los anticuerpos del paciente producen la eliminación selectiva del GABA(A)R sináptico, sin afectar la gafirina (la proteína estructural que se ancla al receptor en los sitios postsinápticos).

La mayoría de la neurotransmisión inhibitoria rápida en el cerebro maduro está mediada por el GABA(A)R regulador del ligando.²⁹ Estos receptores son pentámeros cuyas cinco subunidades se originan de ocho familias de genes que contienen múltiples isoformas (alfa 1-6, beta 1-3, gamma 1-3, delta, épsilon, teta, pi y ro 1-3). La composición de la subunidad del receptor gobierna las propiedades intrínsecas del canal tal como la afinidad por GABA, la conductancia del receptor, la cinética y la modulación.¹⁰ Estas 19 subunidades pueden combinarse de muchas maneras diferentes para formar receptores funcionales, pero la mayoría de receptores en los sitios sinápticos contienen dos subunidades alfa (isoformas alfa 1-3), dos subunidades beta, y una subunidad gamma dispuesta en el orden gamma-beta-alfa-beta-alfa. Por el contrario, los receptores localizados en los sitios perisinápticos o extrasinápticos están compuestos principalmente de subunidades alfa 4 o alfa 6 combinadas con subunidades beta y delta.³¹ Los anticuerpos identificados en el suero y CSF de los 18 pacientes reaccionaron con células que expresaban simultáneamente las subunidades alfa 1 / beta 3, y cuando podría evaluarse la reactividad con las subunidades individuales, la alfa 1 fue siempre reconocida por CSF. Usando cultivos de neuronas de hipocampo de rata, los anticuerpos CSF del paciente produjeron una disminución de la densidad de GABA(A)R específicamente localizada en los sitios sinápticos. La densidad total de GABA(A)R, incluyendo los receptores sinápticos y extrasinápticos no se vio afectada, sugiriendo una relocalización de los receptores de los sitios sinápticos a los extrasinápticos. Esto está en contraste con los efectos de los anticuerpos asociados a otras encefalitis autoinmunitarias, tales como la encefalitis de los receptores anti-NMDAR o AMPA en la que la disminución de los receptores correspondientes se produce en los sitios sinápticos y extrasinápticos.

Cuatro mutaciones dominantes en la subunidad alfa 1 del GABA(A)R se asocian con epilepsia generalizada; los estudios *in vitro* han demostrado que cada una de estas mutaciones dan como resultado una pérdida sustancial de la función de la subunidad alfa 1 o de los niveles de expresión.³¹ Además, se han notificado también mutaciones de la subunidad beta 3 en niños con ausencia de epilepsia.²⁸ En línea con estos hallazgos, una característica frecuente de los pacientes con un título elevado de anticuerpos en suero y CSF contra las subunidades alfa 1 / beta 3 de GABA(A)R era el desarrollo frecuente de convulsiones, estado epiléptico, o epilepsia parcial continua. Otros síntomas, incluyendo el comportamiento y la cognición alterados, confusión, o déficits neurológicos focales, o la presencia de pleocitosis o bandas oligoclonales de CSF fueron similares en la mayoría de los aspectos que aquellos que se produce en otras formas de encefalitis tanto víricas como inmunomediadas.⁹

En el grupo de pacientes con títulos bajos de anticuerpos en suero o anticuerpos ausentes en CSF, convulsiones producidas en el 50 % de los casos. Todos los pacientes con un cuadro clínico de encefalitis no global desarrollaron convulsiones; el paciente más joven (un niño de 3 años de edad) requirió como inducido farmacológico para el estado epiléptico refractario. En este grupo, la frecuente presencia de otras autoinmunidades relevantes podría explicar el espectro más amplio de síntomas. A su vez, dos de los 4 pacientes con síndrome de persona rígida (un trastorno que se produce en asociación con autoanticuerpos contra otros receptores inhibidores o proteínas asociadas) tenía anticuerpos GAD65 coexistentes, y otro paciente tenía anticuerpos NMDAR que impulsaron el cuadro clínico (encefalitis típica dirigida contra NMDAR). De forma interesante, El CSF del paciente con encefalitis dirigida contra NMDAR mostró un título elevado de anticuerpos NMDAR, pero no desvela los anticuerpos GABA(A)R. En dicho paciente, los anticuerpos GABA(A)R se identificaron solo en suero, sugiriendo una compartimentalización diferente de las respuestas inmunitarias. Además, son notables dos hallazgos, 1) la identificación del opsoclonio-mioclono en 2/12 (17 %) pacientes del grupo de título bajo (3/18 [17 %] de la serie completa), que hace del GABA(A)R uno de los antígenos neuronales más comunes notificados en pacientes con opsoclonio-mioclono, y 2) el número inesperado de casos con anti-GAD asociado a encefalitis o convulsiones (3/5, 60 %, en el grupo de título bajo) en comparación con otras asociaciones anti-GAD (por ejemplo, síndrome de persona rígida) que se produjo en 2/4 (50 %) de casos. Estos hallazgos enfatizan que en pacientes con encefalitis o convulsiones atribuidas a anticuerpos GAD, debe considerarse la presencia de más anticuerpos relevantes contra la superficie celular o proteínas sinápticas, tales como los receptores GABA.^{4,24} Un número creciente de pacientes anteriormente caracterizados como encefalitis de Hashimoto debido a la detección de anticuerpos TPO en el contexto de la encefalitis de etiología poco clara se encuentra que tienen otros trastornos.^{8,22} En el estudio actual 4/18 pacientes (22 %) tenían anticuerpos TPO.

La mayoría de los pacientes con anticuerpos GABA(A)R y convulsiones tenía un EEG anómalo que mostraba frecuentemente actividad epiléptica multifocal, y en dos casos, descargas periódicas generalizadas. Estos hallazgos se asociaron con extensas anomalías en IRM cerebrales en 6/6 (100 %) pacientes con un elevado título de anticuerpos GABA(A)R en suero (todos con anticuerpos CSF) y en 3/12 (25 %) pacientes con títulos de anticuerpos bajos. Estas

anomalías de las IRM implicaron predominantemente regiones corticales y subcorticales; sin embargo, la implicación de los ganglios basales, el pedúnculo cerebral o el cerebelo en unos pocos pacientes sugiere que cualquier área del cerebro puede mostrar anomalías radiológicas. Por lo tanto, en comparación con pacientes con otros tipos de encefalitis asociadas a anticuerpos, aquellos con anticuerpos contra GABA(A)R y convulsiones muestran más a menudo extensas y diversas anomalías de las IRM cerebrales. Como ejemplo, solo un 30 % de los pacientes con encefalitis dirigida contra NMDAR tiene anomalías de IRM iniciales (normalmente transitorias y menos extensas),²⁸ y la mayoría de pacientes con anticuerpos AMPAR,¹⁹ GABA(B)R,^{11,16} o LGI1^{14,20} tienen hallazgos de IRM anómalos muy restringidos a los lóbulos temporales medios, consistentes con encefalitis límbica típica.

La comparación con otros tipos de encefalitis sinápticas autoinmunitarias muestra algunas diferencias adicionales. Treinta y nueve por ciento de pacientes con anticuerpos GABA(A)R son más jóvenes de 18 años, aunque la mayoría de los otros tipos de encefalitis (excepto la dirigida contra NMDAR) se produce en adultos e individuos mayores.²¹ Además, los pacientes con anticuerpos GABA(A)R tuvieron raramente un tumor subyacente, mientras que en algunas otras encefalitis (AMPA, GABA(B)R) aproximadamente un 50 % de los pacientes tuvieron un tumor,²³ o en el caso de la encefalitis dirigida contra NMDAR, la frecuencia de un tumor varía de acuerdo con la edad y el género del paciente.²⁸

Existen evidencias de que el estado epiléptico y otras formas de lesión cerebral pueden conducir a una epilepsia crónica. El desarrollo de epilepsia crónica está usualmente precedido por un periodo silencioso durante el cual existe una creciente hiperexcitabilidad en asociación con una disminución progresiva de los grupos de GABA(A)R sinápticos.¹⁰ Este efecto ha sido atribuido en parte a una perturbación del GABA(A)R-proteína de anclaje, gefirina.^{10,25} Estos datos y la disminución mediada por anticuerpos de los GABA(A)R sinápticos notificados aquí sugiere un modelo por el cual se eliminan los receptores de las sinapsis por los anticuerpos del paciente conduciendo a convulsiones y al estado epiléptico que a la vez conducirían a una disminución adicional de receptores resultantes en un refuerzo patológico. Esto explicaría la gravedad y la resistencia al tratamiento de las convulsiones asociadas con elevados niveles en suero y CSF de anticuerpos GABA(A)R. A pesar de esto, 9/12 pacientes evaluables tuvieron una respuesta parcial o completa a la inmunoterapia (7), la terapia sintomática (2) y un apoyo de cuidados intensivos prolongado.

Es importante una evaluación prospectiva de pacientes que caracterizan mejor los grupos con títulos altos frente a los grupos con títulos bajos, así como evaluar el CSF de todos los pacientes, incluyendo aquellos con opsoclon-mioclono y síndrome de persona rígida. Además, la inmunoterapia rápida y más agresiva conduce probablemente a mejores resultados.

En general, la presencia de anticuerpos GABA(A)R debe considerarse en pacientes con (1) convulsiones graves estado epiléptico de etiología incierta, asociados con hallazgos de IRM y CSF sugiriendo un proceso inflamatorio, (2) subgrupos con pacientes con opsoclon-mioclono o síndrome de persona rígida, (3) cualquiera de los anteriores con anticuerpos GAD o TPO, u otras características que sugieren una propensión a la autoinmunidad. Estudios futuros deberán determinar prospectivamente la incidencia de autoinmunidad de GABA(A)R entre pacientes con nuevos comienzos de convulsiones o estado epiléptico de etiología incierta, y opsoclon-mioclono. Además, es plausible que los pacientes con síndrome de persona rígida y anticuerpos GABA(A)R puedan responder mejor a la inmunoterapia que los pacientes con anticuerpos contra GAD65 (una proteína intracelular). El hallazgo de los inventores de que los anticuerpos del paciente eliminan específicamente GABA(A)R de las sinapsis, proporciona un reactivo útil (anticuerpos IgG purificados) para determinar como la perturbación selectiva de estos receptores conduce a hiperexcitabilidad neuronal, convulsiones, epilepsia crónica, u opsoclon.

Frente a estos antecedentes, la presente invención proporciona un GABA(A)R, un fragmento GABA(A)R, o un homólogo del mismo para su uso en un procedimiento de pronóstico, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Los homólogos de acuerdo con la presente invención incluyen homólogos del GABA(A)R así como homólogos de fragmentos o subunidades de GABA(A)R mencionados en el presente documento como se define en las reivindicaciones adjuntas. A este respecto, se entiende que GABA(A)R, un fragmento de GABA(A)R, o un homólogo del mismo puede comprender una mezcla de subunidades, los homólogos o los fragmentos de proteínas que se originan de diferentes organismos o, de manera más general, pueden comprender una mezcla de homólogos y no homólogos. Preferentemente, GABA(A)R, un fragmento de GABA(A)R, o el homólogo del mismo comprende al menos una subunidad de GABA(A)R humana, más preferentemente dos o más subunidades de GABA(A)R. A este respecto, dos subunidades que se producen en posiciones adyacentes en el interior de GABA(A)R en tejidos humanos pueden unirse mediante autoanticuerpos más fuertemente que las subunidades individuales debido a la formación de epítomos conformacionales que se extiende sobre las superficies de ambas subunidades.

Además, la presente invención proporciona una célula para su uso en un procedimiento de pronóstico, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto caracterizado porque la célula expresa un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. La célula de acuerdo con la invención puede constituir tanto una célula, que se ha aislado de un organismo pero que no se ha modificado genéticamente, como una célula que se ha modificado genéticamente. Preferentemente, la célula para su uso de acuerdo con la invención es una célula eucariota. Más preferentemente, la célula es una célula de origen neural o una célula que se ha inducido artificialmente para asumir su destino neural, tal como una célula somática o un citoblasto adulto. De acuerdo con otra realización de la invención, la célula se ha alterado genéticamente mediante transfección,

preferentemente, la célula se ha transfectado a fin de expresar o expresar en exceso un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con la invención. Dicha célula puede constituir un medio diagnóstico para la detección de la unión de un anticuerpo al GABA(A)R, al fragmento de GABA(A)R, o al homólogo del mismo, presentando, por ejemplo, el GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R, o el homólogo del mismo sobre su superficie.

- 5 La presente invención se dirige al GABA(A)R, al fragmento de GABA(A)R, o al homólogo del mismo para su uso o a la célula para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y caracterizadas por que el mencionado GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2.

- 10 La SEQ ID NO: 1 corresponde a la subunidad alfa 1 del GABA(A)R humano mientras que la SEQ ID NO: 2 corresponde a la subunidad beta 3 del GABA(A)R humano y la SEQ ID NO: 5 corresponde a la subunidad gamma 2 del GABA(A)R humano.

A este respecto, GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con la invención, comprende una o más subunidades alfa 1 y/o una o más subunidades beta 3 y/o una o más subunidades gamma 2.

- 15 El GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo comprende una secuencia que tiene al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99 % de identidad de la secuencia con las secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2.

- 20 Uno o más fragmentos del GABA(A)R comprenden al menos 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o más aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 o de las secuencias que tienen al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99 % de identidad de la secuencia con las secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo comprende los aminoácidos adicionales, que están unidos en el extremo N o en el extremo C y facilitan la purificación del receptor GABAA o el fragmento del mismo.

- 25 En el caso de que el GABA(A)R o un homólogo del mismo o en el caso de que el fragmento del GABA(A)R o un homólogo del mismo estén comprendidos por varios polipéptidos, péptidos o proteínas, se pueden añadir los aminoácidos adicionales a al menos uno o hasta todos los polipéptidos, péptidos o proteínas que constituyen el GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo. Si los aminoácidos adicionales se unen a solo un polipéptido, péptido o proteína en el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, se prefiere que dicho polipéptido, péptido o proteína sea una subunidad alfa 1 o un fragmento de la misma. Sin embargo, es también posible que se añadan los aminoácidos adicionales a un polipéptido, péptido o proteína diferente que se une a la subunidad alfa 1 o a un fragmento de la misma mediante interacción proteína-proteína directa o indirecta. A este respecto, por ejemplo, cuando los complejos de proteínas son para usarse en procedimientos que implican condiciones que afectan potencialmente a la interacción proteína-proteína directa o indirecta, puede ser preferible reticular los polipéptidos, péptidos o proteínas del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, incluyendo la subunidad alfa 1 o fragmento de la misma, entre sí. Se conocen en la técnica procedimientos para reticular proteínas.

Dichos aminoácidos adicionales pueden, por ejemplo, constituir determinadas secuencias o etiquetas que son reconocidas específicamente por otras moléculas, preferentemente proteínas, más preferentemente anticuerpos. dichas etiquetas se conocen extensamente en la técnica y comprenden, por ejemplo, etiquetas flag, etiquetas tags o etiquetas strep.

- 40 De acuerdo con otra realización preferida, GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o la célula de acuerdo con la invención está unido a una molécula indicadora o a una fase sólida.

- 45 De forma análoga a los aminoácidos adicionales descritos anteriormente en el presente documento, al menos uno o hasta todos los polipéptidos, péptidos o proteínas que constituyen el GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo puede unirse a la molécula indicadora o a la fase sólida. Si solo un polipéptido, péptido o proteína en el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo está unido a la molécula indicadora o a la fase sólida, se prefiere que dicho polipéptido, péptido o proteína sea una subunidad alfa 1 o un fragmento de la misma. Sin embargo, es también posible que un polipéptido, péptido o proteína diferente, que está unido a la subunidad alfa 1 o fragmento de la misma mediante interacción proteína-proteína directa o indirecta se una a la molécula indicadora o a la fase sólida. También a este respecto, por ejemplo, cuando los complejos de proteínas son para usarse en procedimientos que implican condiciones que afectan potencialmente a la interacción proteína-proteína directa o indirecta, puede ser preferible reticular los polipéptidos, péptidos o proteínas del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, incluyendo la subunidad alfa 1 o fragmento de la misma, entre sí.

- 55 Una célula de acuerdo con la invención se puede unir a una molécula indicadora o a la fase sólida de una manera dependiente del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo expresado en el anterior, por ejemplo, si el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo constituye una molécula de fusión que incluye una de las alteraciones descritas en el presente documento y/o actúa como una diana para un anticuerpo específico. Además, una célula de acuerdo con la invención puede estar unida, por ejemplo, a una molécula indicadora o fase sólida

independientemente del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo expresado en el anterior, por ejemplo, mediante la unión a anticuerpos o mediante reticulación química.

Una molécula indicadora, comprendida en el ámbito de la presente invención, se entiende que es una molécula que permite la detección directa o indirecta si está unida tanto en ausencia como en presencia de GABA(A)R, un fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo, o la ausencia o presencia de un anticuerpo unido al anterior. Se conocen en la técnica muchos tipos de moléculas indicadoras, incluyendo por ejemplo marcadores radioactivos, colorantes o proteínas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, tetrametilrodamina, proteína fluorescente verde (GFP)), haptenos (por ejemplo, biotina) o enzimas (por ejemplo, alfa-galactosidasa A, luciferasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, adecuadas para la detección usando colorantes convertibles en enzimas). Dichas moléculas indicadoras pueden añadirse a la proteína diana tanto durante la síntesis de proteínas (inclusión de aminoácidos marcados radioactivamente, generación de proteínas de fusión) o tras la síntesis de proteínas mediante acoplamiento químico.

Una fase sólida vinculada a la presente invención se refiere a cualquier sustrato sólido, al cual puede unirse un polipéptido, por ejemplo, mediante enlace covalente directo o indirecto o mediante unión por afinidad vía enlaces de hidrógeno y/o interacción lipófila. Por ejemplo, GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo de la presente invención puede unirse al material de una placa de microvaloración, la superficie de perlas magnéticas, una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o PVDF) a la fase sólida de una columna o lámina de cromatografía.

Además, La presente invención proporciona un anticuerpo que se une al GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con la invención, en el que el anticuerpo es un autoanticuerpo y/o es para su uso en un procedimiento de pronóstico o diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto. De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención está en forma aislada o inmovilizada.

Se describe además en el presente documento un ácido nucleico y un vector que codifican un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con la invención.

Dicho ácido nucleico o vector se caracteriza porque el mencionado comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 6 o un complemento de la misma.

La SEQ ID NO: 3 corresponde al ORF que codifica la subunidad alfa 1 del GABA(A)R humano mientras que la SEQ ID NO: 4 corresponde al ORF que codifica la subunidad beta 3 del GABA(A)R humano y la SEQ ID NO: 6 corresponde al ORF que codifica la subunidad gamma 2 del GABA(A)R humano.

El ácido nucleico o vector comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99 % de identidad de la secuencia con las secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 6 o los complementos de las mismas.

El ácido nucleico o vector comprende una secuencia que tiene al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o más bases sucesivas o, respectivamente, los pares de bases de las secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 y/o la SEQ ID NO: 6 o los complementos de las mismas o de las secuencias que tienen al menos un 70 %, al menos 75, al menos 80, al menos 90, al menos 92, al menos 94, al menos 96, al menos 98 o al menos 99 % de identidad de la secuencia con las secuencias de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 6 o los complementos de las mismas.

El vector puede ajustarse para la expresión del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con la invención. A este respecto, para la expresión del GABA(A)R, un homólogo del mismo, o el fragmento del GABA(A)R comprendido por varios polipéptidos o un homólogo del mismo, es posible combinar tanto las secuencias de codificación de todos los polipéptidos, péptidos o proteínas que constituyen el GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo en un único vector o proporcionar un conjunto de vectores diferentes que, por ejemplo, cuando se transfieren en una célula o una población de células, pueden servir para expresar el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo que incluye los constituyentes respectivos. Por supuesto, es también posible expresar diferentes constituyentes del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo en poblaciones de células diferentes.

A este respecto, una célula modificada genéticamente que expresa o expresa en exceso el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo de acuerdo con la invención puede comprender uno o más vectores (por ejemplo, un conjunto de vectores como se ha descrito anteriormente). Dicha célula puede utilizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica para producir copias del vector o para expresar el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con la invención. A este respecto, se prefiere si la célula es una célula eucariota, más preferentemente una célula de mamífero, incluso más preferentemente una célula humana y, lo más preferentemente, una célula humana inmortalizada tal como una célula HEK.

Se describe además en el presente documento un procedimiento *in vitro* para pronosticar o diagnosticar una enfermedad autoinmunitaria, que comprende las etapas:

a. poner una muestra líquida que comprende un anticuerpo procedente de un sujeto en contacto con un GABA(A)R, un fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o con la célula de acuerdo con la invención o poner una muestra de tejido procedente del sujeto en contacto con un anticuerpo de acuerdo con la invención, y

5 b. detectar la unión del anticuerpo al GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, con la célula o la muestra de tejido.

El procedimiento *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas cubre un procedimiento en el que, en una primera etapa, una muestra líquida que comprende un anticuerpo de un sujeto se pone en contacto con un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con la invención, y, en una segunda etapa, se detecta la unión de un anticuerpo procedente de la muestra líquida al GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o a la célula de acuerdo con la invención, es decir, una célula que expresa o expresa en exceso el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo.

Así como, el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la invención cubre un procedimiento en el que, en una primera etapa, una muestra de tejido de un sujeto se pone en contacto con un anticuerpo de la invención, y, en una segunda etapa, se detecta la unión de dicho anticuerpo a dicha muestra de tejido.

15 De acuerdo con una realización preferida, en una etapa que precede a la etapa que se ha descrito anteriormente, se proporciona un líquido o una muestra de tejido de un sujeto.

Una muestra líquida de acuerdo con la invención puede ser cualquier fluido corporal, siempre que contenga anticuerpos. Por ejemplo, una muestra puede ser líquido cefalorraquídeo (CSF), sangre o plasma sanguíneo, linfa, fluido intersticial.

20 Una muestra de tejido de acuerdo con la invención puede estar constituida por células individuales o un agregado de células unidas tanto entre sí directamente como a través de una matriz extracelular. De acuerdo con una realización preferida, la muestra de tejido es de origen neural, por ejemplo, del sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico o el sistema nervioso autónomo. Alternativamente, la muestra de tejido puede ser tejido de ganglios linfáticos.

La unión de un anticuerpo al GABA(A)R, un fragmento u homólogo del mismo en línea con las enseñanzas inventivas puede explicarse usando una variedad de procedimientos de detección conocidos por una persona experta en la materia, por ejemplo, microscopía de inmunofluorescencia o espectroscopía, luminiscencia, espectroscopía de RMN, radioactividad, reticulación química, resonancia de plasmón superficial, electroforesis en gel nativo o actividad enzimática. Aunque algunos de estos procedimientos permiten la detección directa del complejo, se prefiere que una de las moléculas asociadas, preferentemente el anticuerpo o, más preferentemente, un segundo anticuerpo de unión al anticuerpo, estén marcados con el fin de que el complejo pueda detectarse específicamente debido a las propiedades intrínsecas del marcador, por ejemplo, la fluorescencia, radioactividad, actividad enzimática, visibilidad en la RMN o los espectros de IRM o similares. En una realización preferida, el diagnóstico o el pronóstico se lleva a cabo usando un procedimiento seleccionado entre el grupo que comprende la transferencia western, inmunotransferencia en mancha, micromatriz de proteínas, ELISA, inmunotransferencia en línea, microscopía de inmunofluorescencia indirecta. Alternativamente, se pueden usar más de uno de estos procedimientos de una manera complementaria para obtener resultados más fiables.

En una realización preferida, los procedimientos de pronóstico, diagnóstico, o el kit de ensayo en línea con las reivindicaciones adjuntas contempla el uso de una inmunotransferencia en línea. La persona experta en la técnica está familiarizada con la configuración experimental de las inmunotransferencias en línea, que se describe en el estado de la técnica.^{34,35} En resumen, el uno o más antígenos de interés, en el caso de la presente invención, el GABA(A)R, un fragmento u homólogo del mismo que comprende al menos parte de la subunidad alfa uno, puede unirse a un transportador, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa, y a menudo en combinación con antígenos y controles adicionales. El transportador de nitrocelulosa se expone posteriormente a una muestra del paciente que comprende anticuerpos tales como un suero diluido. Si la muestra comprende un anticuerpo de unión al antígeno, se forma un complejo que se puede detectar, preferentemente mediante incubación con unión de anticuerpo secundario a la región constante del primer anticuerpo, cuyo anticuerpo secundario comprende un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, un colorante fluorescente o, en una realización preferida, una enzima activa fusionada o unida al anticuerpo secundario, tal como la fosfatasa alcalina, que se puede evaluar fácilmente usando sustratos cromógenos seguido por un simple examen visual. Los reactivos, dispositivos y paquetes de software adecuados están comercialmente disponibles, por ejemplo de EUROIMMUN, Lubeck, Alemania.

En otra realización preferida, los procedimientos de pronóstico, diagnóstico, o el kit de ensayo con las reivindicaciones adjuntas contempla el uso de inmunofluorescencia indirecta. La persona experta en la técnica está familiarizada con dichas técnicas y la preparación de las muestras adecuadas, que se describen en el estado de la técnica.^{36,37,38} En resumen, un transportador, tal como un cubre de vidrio para su uso en un microscopio, se reviste con células o secciones de tejido que comprende el antígeno, en el caso de la presente invención, el GABA(A)R, un fragmento u homólogo del mismo que comprende al menos parte de la subunidad alfa uno. El transportador que comprende el antígeno se expone a una muestra del paciente que comprende anticuerpos tales como suero diluido. Si la muestra comprende un anticuerpo de unión al antígeno, se puede detectar el complejo resultante, preferentemente mediante

incubación con un anticuerpo secundario que comprende un colorante fluorescente tal como fluoresceína, seguido por examen visual usando microscopio de fluorescencia.

Los reactivos, dispositivos y paquetes de software adecuados están comercialmente disponibles, por ejemplo de EUROIMMUN, Lubeck, Alemania.

- 5 Asimismo, se proporciona un kit de ensayo en el contexto de la presente invención, cuyo kit de ensayo comprende uno o más GABA(A)R, fragmentos de GABA(A)R u homólogos del mismo de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con una realización preferida, el kit de ensayo es para la detección de anticuerpos y comprende antígenos en la forma de uno o más GABA(A)R, fragmentos de GABA(A)R u homólogos del mismo de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. A este respecto, un kit de ensayo puede comprender, por ejemplo, diferentes subunidades individuales del GABA(A)R o fragmentos potencialmente inmunógenos u homólogos de mismo, o las combinaciones de dichos compuestos. Es por supuesto posible proporcionar un kit de ensayo útil para detectar anticuerpos así como GABA(A)R, fragmentos de GABA(A)R u homólogos del mismo.

Además, La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende GABA(A)R, un fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo y/o una célula de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

- 15 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender una o más sustancias farmacéuticamente activas además del polipéptido de acuerdo con la invención. Además, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender uno o más excipientes farmacéuticos. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención es particularmente útil para la unión/absorción de anticuerpos de diferentes clases (IgA, IgG) de la sangre o el plasma de un sujeto y en concreto, para el tratamiento extracorpóreo de un trastorno autoinmunitario. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica puede emplearse en inmunoféresis. A este respecto, la presente invención proporciona también un dispositivo médico revestido con un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, dicho dispositivo médico puede ser un dispositivo empleado en el intercambio de plasma convencional o en inmunoféresis y que comprende superficies que entran en contacto con sangre o plasma del sujeto que se va a tratar.
- 20
- 25 Además, la presente invención proporciona un dispositivo médico o diagnóstico revestido con un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o con una célula, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Dicho dispositivo médico o diagnóstico puede ser un dispositivo que se puede poner en contacto con una muestra líquida o de tejido de un sujeto, tal como un porta de microscopio, un cubre, una perla magnética u otro transportador, una placa de microvaloración o un dispositivo para cultivar células en el anterior, por ejemplo, una placa petri o placa de cultivo. De acuerdo con otra realización, dicho dispositivo puede ser un dispositivo usado en plasmáféresis o inmunoféresis, cuyo dispositivo se pone en contacto con el plasma de un paciente para unirse y extraer autoanticuerpos. Los dispositivos diagnósticos adecuados tales como biochips, microplacas para ELISA, inmunotransferencias en línea o perlas revestidas están comercialmente disponibles, por ejemplo de EUROIMMUN, Lubeck, Alemania.

- 35 Además, la presente invención proporciona también un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo el procedimiento las etapas de
- a. someter una muestra líquida que comprende anticuerpos de un sujeto a un procedimiento diagnóstico *in vitro* de la invención, y
 - b. tratar al sujeto con al menos una sustancia farmacéutica adecuada y/o intercambio de plasma.

- 40 Una sustancia farmacéutica adecuada, de acuerdo con la invención puede incluir una sustancia que modula, en concreto suprime, el sistema inmunitario de un sujeto o una parte específica del mismo. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la sustancia farmacéutica adecuada puede ser un fármaco inmunosupresor tal como uno seleccionado del grupo que consiste en Rituximab, prednisona, metilprednisolona, ciclofosfamida, micifenolato de mofetilo, inmunoglobulina intravenosa, tacrolimus, ciclosporina, metotrexato y azatioprina.

- 45 Además de la administración de inmunosupresores, el paciente puede tratarse también con sustancias farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de los síntomas y dolencias relacionadas o producidas por el trastorno autoinmunitario que se va a tratar. De acuerdo con una realización preferida, la etapa b. referida anteriormente incluye por tanto también la administración de otros compuestos tales como fármacos antiepilépticos. Dichos fármacos antiepilépticos pueden seleccionarse del grupo que consiste en clonazepam, fenitoína, lamotrigina, fenobarbital, ácido valproico, levetiracetam, carbamazepina, tiagabina, felbamato, pregabalina, primidona y gabapentina.
- 50

De acuerdo con una realización preferida adicional, los inmunosupresores y fármacos antiepilépticos pueden administrarse al paciente en paralelo o en sucesión.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, comprendiendo el procedimiento las etapas de

a. extraer sangre o plasma de un sujeto,

b. poner en contacto la sangre o el plasma con la composición farmacéutica o el dispositivo médico de la invención a fin de retirar los anticuerpos asociados a la enfermedad, y

c. readministrar la sangre o el plasma al sujeto.

5 En dicho procedimiento, por ejemplo, inmunoféresis, los anticuerpos asociados a la enfermedad se retiran del plasma del sujeto poniendo la sangre o el plasma en contacto con el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo inmovilizado de acuerdo con la invención. Se han descrito los procedimientos correspondientes, por ejemplo, para el tratamiento de una miocardiopatía dilatativa basándose en la secuencia del receptor beta-adrenérgico.³⁹

10 De acuerdo con una realización preferida, la inmunoféresis puede combinarse con otros modos de tratamiento, por ejemplo, la administración de compuestos inmunosupresores o compuestos para el tratamiento de los síntomas asociados con la enfermedad autoinmunitaria descrita en el presente documento.

La presente invención proporciona también un procedimiento para aislar un anticuerpo que se une a un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de

15 a. poner una muestra que comprende un anticuerpo que se une a un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo, en contacto con el GABA(A)R, el fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas,

b. aislar un complejo que comprende el GABA(A)R, un fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo y el anticuerpo,

c. disociar el complejo aislado en la etapa c, y

20 d. separar el anticuerpo del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o la célula.

25 De acuerdo con una realización preferida, la etapa A esta precedida por la etapa adicional de proporcionar una muestra que comprende un anticuerpo que se une a GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, por ejemplo, el anticuerpo de la invención. Dicha muestra puede ser, por ejemplo, una muestra líquida como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, o por ejemplo, un sobrenadante procedente de una muestra de tejido o de un cultivo celular.

La enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso, preferentemente, encefalitis autoinmunitaria. Alternativamente, la invención se refiere a enfermedades en asociación con anticuerpos contra GABA(A)R.

Leyendas de las figuras

30 Figura 1: Hallazgos de IRM en el paciente n.º 1

35 En el día n.º 3 de la admisión la IRM de este paciente mostró múltiples anomalías corticales-subcorticales con una señalización de FLAIR/T2 aumentada que implicaba el lóbulo temporal izquierdo y las regiones parasagitales frontales (A, E). En el día n.º 10, una repetición de la IRM mostró un aumento del tamaño de la lesión temporal y una nueva lesión cortical en el lóbulo frontal izquierdo (B, F). La repetición de las IRM en los días n.º 22 y 48 no muestra cambios sustanciales (no se muestra). Otra IRM obtenida 4 meses después del inicio de la enfermedad muestra numerosas anomalías multifocales junto con atrofia difusa y un aumento del tamaño de los ventrículos (C, G). Una repetición de la IRM dos meses después, 6 meses después del inicio de los síntomas muestra una mejora y resolución sustanciales de las anomalías así como una mejora de la dilatación ventricular (D, H).

Figura 2: Hallazgos de IRM en el paciente con el índice n.º 2

40 En el día 2 de la admisión, la IRM de este paciente mostró múltiples áreas de anomalía de la señalización FLAIR/T2 que implicaban predominantemente a las regiones corticales (A-C), sin edema, efecto de masa, o potenciación del contraste (no se muestra), pero con pérdida de definición de la unión de la materia gris-blanca. En el día 14, la repetición de la IRM muestra un aumento del intervalo de la implicación cortical-subcortical, con edema en el lóbulo temporal derecho (D-F). Las IRM posteriores mostraron un empeoramiento marcado de estas anomalías que implicaban ahora extensamente regiones corticales y subcorticales (G-I).

Figura 3: Descargas periódicas generalizadas en pacientes con encefalitis y anticuerpo contra GABA(A)R

50 El registro en A corresponde al EREG del paciente n.º 1 obtenido un mes después de la admisión; indica la presencia de descargas epileptiformes generalizadas. El registro en B corresponde al paciente n.º 2; Este paciente mostró inicialmente actividad epileptiforme en el lóbulo temporal derecho con tendencia a la generalización en registros posteriores, como se muestra en B.

Figura 4: Reactividad de CSF de un paciente con anticuerpos GABA(A)R con cerebro de rata

El CSF del paciente mostró una inmunotinción extensa y difusa del neuropilo de las regiones corticales y subcorticales (A). Este modelo de reactividad del neuropilo sugirió la presencia de anticuerpos contra un antígeno superficial de las células neuronales, que se confirmó en cultivos de neuronas vivas de hipocampo de rata (B). Los paneles C y D muestra un estudio similar usando CSF de un control individual sin anticuerpos GABA(A)R. En B y D se contratiñó el núcleo de las neuronas con DAPI. Barra de escala en C= 2 mm y en D = 20 micrómetros.

Figura 5: Reactividad del CSF del paciente con el hipocampo y el cerebelo de rata a un aumento elevado

Los paneles A y B muestran la reactividad del CSF de un paciente (1.4) con hipocampo y cerebelo de rata. Los paneles C y D muestran la ausencia de reactividad de un CSF del control. Barras de escala = 500 micrómetros.

Figura 6: Reactividad del suero de un paciente con células HEK vivas que expresan GABA(A)R

Reactividad de células HEK vivas que expresan las subunidades alfa 1 y beta 3 humanas del GABA(A)R con el suero de un paciente y un anticuerpo monoclonal contra la subunidad alfa 1 (B). Se muestran en C las reactividades combinadas. Se muestra un ensayo similar con suero de un individuo normal en (D-F). Se muestran los núcleos de las células con DAPI en C y F. Se indica la reactividad específica de los anticuerpos del paciente con células que expresan GABA(A)R y la buena localización simultánea con la reactividad del anticuerpo comercial. Barras de escala = 20 micrómetros.

Figura 7: Inmunoabsorción del GABA(A)R del anticuerpo sérico y reactividad cerebral y neuronal

Los paneles A y C muestran la reactividad del suero del paciente tras la inmunoabsorción con células HEK no transfectadas. Los paneles B y D muestran que esta reactividad se eliminó después que se inmunoabsorbido el suero con células HEK que expresan el GABA(A)R. Barra de escala en A y C = 500 micrómetros, Barra de escala en B y D = 20 micrómetros.

Figura 8: Estudios de inmunocompetición que demuestran que los anticuerpos del paciente reconocen los mismos epítomos del GABA(A)R

Reactividad con cerebro de rata de la IgG biotinilada de un paciente con anticuerpos GABA(A)R en el que el tejido se ha preincubado con suero de un individuo normal (A y B), el suero del mismo paciente cuya IgG se ha biotinilado (C, D) y el suero de otro paciente con anticuerpos GABA(A)R. Se indica la drástica disminución de la reactividad (competición por los mismos epítomos del GABA(A)R en los paneles E y F en comparación con A y B. Los paneles C y D (la competición con el suero del mismo paciente sirve para demostrar los antecedentes de la reactividad). Barra de escala para A, C, E = 1 mm; Barra de escala para B, D y E = 200 micrómetros.

Figura 9: Los anticuerpos del paciente se unen selectivamente a GABA(A)R y alteran la localización del GABA(A)R en neuronas vivas

A) se tiñeron 14 neuronas div vivas con CSF del paciente que contenía anticuerpos GABA(A)R (verde, panel derecho, imagen más superior), a continuación se fijaron y tiñeron con anticuerpos GABA(A)R comerciales (rojo, panel de la derecha, imagen intermedia). B) La cuantificación de la localización simultánea entre anticuerpos del CSF del paciente y el anticuerpo GABA(A)R comercial muestra que el 89 ± 3 % de los receptores marcados por los anticuerpos del paciente se marcaron simultáneamente con el anticuerpo comercial contra GABA(A)R, y 11 ± 3 % no se marcaron. C) 14 neuronas div se incubaron con CSF del paciente durante 48 horas y se tiñeron posteriormente para el GABA(A)R postsináptico (verde, panel de la izquierda) y el vGAT presináptico (rojo, panel de la derecha, superpuesto con la señalización del panel de la izquierda). los GABA(A)R sinápticos (muestra una punta amarilla en las condiciones del control) se redujeron mucho tras el tratamiento con CSF del paciente. D) El número de grupos GABA(A)R junto con las dendritas de las neuronas tratadas con CSF del paciente no es diferente del número de neuronas tratadas con el CSF del control (Prueba de Mann-Whitney, $p = 0,6$). E) En contraste, el número de GABA(A)R localizados en las sinapsis disminuyó significativamente en neuronas tratadas con el CSF del paciente en comparación con las neuronas tratadas con el CSF del control ($40 \pm 0,3$ en comparación con el control como 100 %, Prueba de Mann-Whitney, $p < 0,0001$). F) el CSF del paciente no afecta a los grupos de gefirina (postsináptica) marcados simultáneamente con vGAT (presináptica) a lo largo de una dendrita cuando se compara con los efectos del CSF del control (Prueba de Mann-Whitney, $p = 0,5$).

Ejemplos

Ejemplo 1: Pacientes

Desde agosto de 2012 hasta febrero de 2013, dos pacientes con encefalitis, convulsiones refractarias, y CSF que muestran un modelo similar de reactividad con las proteínas de la superficie celular del neuropilo de cerebro de rata se identificaron prospectivamente (índice de los pacientes 1 y 2). La gravedad del cuadro clínico y la identidad desconocida del antígeno incitó a los investigadores a aislar y caracterizar este y a revisar retrospectivamente la información clínica e inmunitaria de los pacientes con características similares.

Desde abril de 2006 hasta abril de 2013, el suero y el CSF de 1134 pacientes con encefalitis y convulsiones sospechosas de ser autoinmunitarias se estudiaron en el Department of Neurology, del Hospital of the University of Pennsylvania o en el Service of Neurology, del Hospital Clinic, de la University of Barcelona (actualmente, Center of Neuroimmunology, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer [IDIBAPS]).

De estos 1134 pacientes, 356 (44 %) tenían suero o anticuerpos CSF que hicieron reaccionar con superficies celulares/antígenos sinápticos celulares, y 140 tenían la tríada encefalitis, convulsiones, y anticuerpos contra antígenos desconocidos del neurópilo de cerebro de rata. El suero y el CSF de estos pacientes se volvió a examinar para la reactividad del anticuerpo con características similares a las de los casos del índice. Además, Se ensayaron de manera similar el suero de 30 individuos normales (donantes sanos) y el suero o el CSF de 217 pacientes con diversos trastornos, incluyendo 65 con anticuerpos contra la ácido glutámico decarboxilasa 65 (GAD65), 25 con anticuerpos NMDAR, 21 con anticuerpos GABA(B)R, 23 con opsoclon-mioclono, 12 con anticuerpos LGI1, 12 con anticuerpos Hu, 9 con encefalitis posterior a virus del herpes simple, 30 con esclerosis múltiple, y 20 con trastornos degenerativos no inflamatorios.

Se homologaron los estudios por los comités de revisión institucionales de la Universidad de Pensilvania y la Universidad de Barcelona.

a) Caso índice 1

Esta chica de 16 años de edad se presentó en el hospital con unos antecedentes de cuatro días de fatiga y cefalea graves, acompañadas por vértigo, náuseas y escotomas centelleantes. La paciente se quejaba de algunos meses de dificultades de memoria, disfunción cognitiva, ansiedad, estado de ánimo deprimido y fatiga. Sus antecedentes médicos anteriores eran significativos de un linfoma de Hodgkin que estaba en remisión debido a que se había completado una quimioterapia y radiación 10 meses antes. En el quinto día de admisión, ella tuvo convulsiones tónicas-clónicas generalizadas y progreso rápidamente a tener convulsiones frecuentes. El recuento sanguíneo completo, la proteína C reactiva y la velocidad de sedimentación de los eritrocitos fueron normales. El ensayo de la peroxidasa antitiroidea, la antitiroglobulina, los anticuerpos antinucleares, los anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos, y los anticuerpos paraneoplásicos (Hu, Ri, Yo, CRMP5, anifisina) fueron negativos. La UIRM del cerebro en el día 3 demostró múltiples foci de la señalización de T2/FLAIR aumentada en ambos hemisferios (Figura 1A, E). el análisis del CSF mostró una presión de abertura normal, 23 glóbulos blancos (WBC)/ mm³ (69 % de linfocitos), citología normal, y concentraciones de proteína y glucosa. La tinción Gram, cultivos rutinarios y el ensayo de la PCR para el virus del herpes simple, Enterovirus y *Mycoplasma pneumoniae* fueron negativos. La serología para Cytomegalovirus, virus de Epstein Barr, Arbovirus, *Bartonella henselae*, y la enfermedad de Lyme fueron negativos.

Se inició un tratamiento con altas dosis de metilprednisolona se iniciaron en el día 7. Se requirieron dosis muy altas de fenobarbital para suprimir las convulsiones electrográficas. Un ciclo posterior de plasmaféresis en días alternativos durante una semana fracasó en mejorar el modelo de convulsión. En el día 10, la repetición de la IRM cerebral mostró un aumento del tamaño de las anomalías de FLAIR/T2, principalmente en el lóbulo temporal izquierdo, y nuevas lesiones corticales y subcorticales multifocales en ambos hemisferios cerebrales (Figura 1B, F). La biopsia cerebral en el día 14 demostró una gliosis astrocítica reactiva difusa intensa a lo largo de la corteza asociada con activación de la microglía y una población de linfocitos T reactivos. Algunos días después, Se identificaron anticuerpos contra antígenos superficiales de las células neuronales en su CSF. Ella recibió una dosis alta de corticoesteroides, inmunoglobulina intravenosa, rituximab y ciclofosfamida. Se continuó el coma con fenobarbital durante cuatro meses momento en el cual se produjeron convulsiones completas si se dejó disminuir el nivel del fenobarbital. Los registros del EEG demostraron descargas periódicas generalizadas posteriores en el primer mes de la admisión (Figura 3, A).

después de tres meses, el EEG mostró más descargas epileptiformes en el lado focal izquierdo. Se disminuyó la dosis de fenobarbital y la paciente comenzó una lenta recuperación neurológica con resolución gradual del patrón de EERG encefalopático. Cuatro meses después de la admisión una repetición de la punción lumbar mostró la resolución de la leucocitosis; sin embargo, la repetición de la IRM mostró numerosas nuevas lesiones multifocales a lo largo del cerebro con atrofia difusa y dilatación ventricular ex-vacuo moderada (Figura 1 C, G). Seis meses después de su presentación inicial, la paciente comenzó a mostrar una recuperación neurológica más rápida. La repetición de la IRM no demostró nuevas lesiones, la mejora o la resolución de todas las lesiones previas, y la reducción de la atrofia difusa observada previa (Figura 1 D, H). La paciente fue transferida a una instalación de rehabilitación intrahospitalaria siete meses después del ingreso y aproximadamente tres meses después experimentó significativas mejoras hasta el punto de que la paciente fue capaz de comunicarse, comer, beber y arreglarse por sí misma. La paciente podía andar distancias cortas con asistencia mínima. Diez meses después que la paciente se presentara por primera vez, la paciente recibió el alta a domicilio y fue capaz de llevar a cabo la mayoría de actividades de la vida diaria de manera independiente.

b) Caso índice 2

Se ingresó a un hombre de 51 años de edad en el hospital debido a los síntomas de cambio de comportamiento rápidamente progresivos y a un nuevo inicio de psicosis. Antes del ingreso, el paciente se observó varias veces en el departamento de urgencias de otro hospital donde se le diagnosticó un nuevo inicio de depresión y se trató con sertralina y alprazolam. Además, se quejaba de prurito generalizado y desarrollo un empeoramiento de la tensión arterial elevada. En varias ocasiones, la familia escuchó al paciente decir que iba a matar a otras personas y a él

mismo. Unos pocos días antes del ingreso, se negó a salir de la cama, y se volvió apático con una reducción casi total de la expresión verbal. Sus antecedentes médicos pasados eran relevantes de tensión arterial elevada, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, ictus (del cual se había recuperado completamente), y púrpura trombocitopénico trombótico tratado unos pocos años antes con esplenectomía y esteroides.

- 5 En el ingreso, el cuadro clínico se asemejó a mutismo acinético, con periodos breves en los que el paciente pronunció espontáneamente algunas oraciones incoherentes. El día del ingreso, el paciente indicó que tenía convulsiones clónicas que implicaban el lado izquierdo de la cara y el brazo izquierdo que se resolvieron con diazepam y levetiracetam intravenoso. Durante las siguientes 24 horas el paciente desarrolló insuficiencia respiratoria aguda debido a neumonía, requiriendo intubación y el ingreso en la unidad de cuidados intensivos. Dos días después el
- 10 paciente desarrolló un estado epiléptico caracterizado por movimientos clónicos del lado izquierdo de la cara y del brazo izquierdo, asociados con movimientos oculares sacádicos continuos hacia la izquierda que fueron refractarios a todos los tratamientos, incluyendo levetiracetam, lacosamida, y fenitoína. El paciente se mantuvo en un coma farmacológico, usando midazolam, propofol, y tiopental secuencialmente. Las convulsiones persistieron hasta la muerte del paciente 10 semanas después del ingreso.
- 15 El EEG inicial, mostró una actividad epileptiforme en el lóbulo temporal derecho con una tendencia a la generalización que en registros posteriores progresó a un patrón de actividad generalizada de ondas periódicas (Figura 3, B). La IRM mostró múltiples anomalías de la señalización FLAIR/T2 aumentada, que implicaban extensamente a la corteza sin efecto de masa o potenciación del contraste, pérdida de definición de la unión de la materia gris-blanca (Figura 2 A-C). El estudio del CSF inicial fue normal, pero una repetición del análisis del CSF varios días después mostró bandas de IgG e IgM oligoclonales sin bandas de suero correspondientes. Las siguientes pruebas fueron negativas: 1)
- 20 Estudios de enfermedades infecciosas de la sangre para la sífilis, virus de la hepatitis B y C, brucella melitensis, borrelia burgdorferi, toxoplasma gondii, streptococcus pneumoniae, y legionella pneumophila; 2) Estudios del CSF para las infecciones bacterianas y fúngicas, virus del herpes simple 1 y 2; virus del herpes 6 humano, citomegalovirus, virus de la varicela zóster, virus JC y enterovirus, 3) panel para anticuerpos paraneoplásicos, y trastornos reumatológicos/del tejido conectivo (anticuerpos contra ADNbc, Sm, Rib-P, PCNA, U1-RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70, CENP-B, RNA Pol III, Jo-1, Mi-2, PM-Scl, y ANCA), niveles del complemento, 4) electroforesis de proteínas séricas, 5) marcadores tumorales: CEA, AFP, Ca 19.9, PSA, y B-2-microglobulina. Se encontró que el paciente tenía niveles bajos de anticuerpos de peroxidasa tiroidea (156 UI/ml) y anticuerpos de troglobulina (158 UI/ml).
- 25 tras excluir una etiología infecciosa, se inició el tratamiento del paciente con corticoesteroides e IVIG sin efecto significativo. Una semana después, El paciente recibió 5 tratamientos de intercambio de plasma sin efecto clínico y sin cambios en la IRM (Figura 2 D-F). En este tiempo, los estudios de laboratorio desvelaron anticuerpos séricos y de CSF contra la superficie celular de las neuronas, y se inició el tratamiento con ciclofosfamida (1 g por m²/ mes) y rituximab (1 g cada 2 semanas). A pesar de estos tratamientos, el paciente no mostró mejora clínica o radiológica y continuó con el estado epiléptico electrográfico. La repetición de las IRM mostró nuevas anomalías de FLAIR/T2 que implicaban de forma difusa la corteza (Figura 2 G-I), y el paciente murió dos meses después del ingreso.
- 30
- 35

c) Resultados

- seis pacientes incluyendo los dos casos índice cuyo suero se usó para la inmunoprecipitación y 4 casos adicionales cuyo suero se usó para los estudios de inmunoprecipitación condujeron a la caracterización inicial de GABA(A)R como el autoantígeno del trastorno (descrito a continuación). los 6 pacientes (5 varones; con un intervalo de edad de 3-63
- 40 años, mediana 22) con suero y CSF que mostraban una reactividad similar con el neurófilo de cerebro de rata (bloqueando cada uno la reactividad de los otros en los estudios de inmunocompetición) desarrollaron una encefalopatía rápidamente progresiva que dio como resultado eventualmente convulsiones refractarias en todos los pacientes, y un estado epiléptico y/o epilepsia parcial continua en 5 (Tabla 1). En todos los pacientes, los síntomas epilépticos estuvieron precedidos o asociados con un cambio de comportamiento o la cognición; además, algunos
- 45 pacientes desarrollaron confusión, discinesias, síntomas psiquiátricos, disfunción verbal, o déficits motores focales. Uno de los pacientes más jóvenes (varón de 3 años de edad) tenía anticuerpos adicionales contra el GABA(B)R; además de convulsiones, el paciente desarrolló también confusión, opsoclono, ataxia y corea. Cinco pacientes tuvieron CSF anómalo, incluyendo pleocitosis leve (mediana 75 WBC/microlitro, intervalo 23-154), concentración de proteína s aumentada (mediana 60, intervalo 59-60 mg/dl) y/o bandas oligoclonales. Los seis pacientes tenían IRM cerebral
- 50 anómala, que mostraba con frecuencia extensas anomalías de FLAIR/T2, con implicación cortical multifocal o difusa sin potenciación del contraste (Figura 1 y Figura 2); un paciente tenía también implicación de los ganglios basales. En todos los pacientes, el EEG mostró actividad epiléptica; dos de los pacientes con descargas periódicas generalizadas (Figura 3). Además de los anticuerpos GABA(A)R, 3 pacientes tenían anticuerpos de peroxidasa tiroidea (TPO)=, uno anticuerpos de ácido glutámico decarboxilasa 65 (GAD65), y dos anticuerpos GABA(B)R (véase a continuación). Otros
- 55 hallazgos sugiriendo una propensión a la autoinmunidad o una disregulación inmunitaria incluyeron unos antecedentes anteriores de linfoma de Hodgkin en un paciente, y púrpura trombocitopénico idiopático en otro.

- El tratamiento y el seguimiento se asemejaron en los 6 pacientes: 1 niño recibió levetiracetam sin inmunoterapia y tuvo una sustancial recuperación (seguimiento a largo plazo no disponible). Los otros 5 recibieron inmunoterapia y antiepilépticos múltiples, 4 de los pacientes requiriendo coma inducido farmacológicamente. Tres de estos pacientes
- 60 tuvieron una recuperación total o parcial, y 2 murieron como resultado de septicemia durante la hospitalización durante el estado epiléptico. Uno de los pacientes fue el niño con anticuerpos GABA(B)R concomitantes indicados

anteriormente, se identificaron anticuerpos (GABA(A)R tras esta muerte en las muestras de suero archivadas y CSF; detalles clínicos y patológicos anteriormente descritos¹⁸). El paciente de más edad de la serie (63 años) tenía también anticuerpos GABA(B)R; el paciente se recuperó completamente de la encefalopatía grave asociada a GABA(A) y GABA(B), y 7 años después desarrolló diplopía y hemiataxia con anticuerpos GAD de las cuales se recuperó también completamente.

Además de los 6 pacientes con títulos de anticuerpos GABA(A)R en suero y CSF elevados, 12 pacientes tuvieron títulos bajos de anticuerpos en suero. Tres de estos pacientes tuvieron estudios de anticuerpos CSF negativos y de los otros 9 no estaba disponible el CSF. En estos 12 pacientes, la presencia de anticuerpos GABA(A)R podría solo demostrarse con CBA vivas (células HEK que expresan las subunidades alfa 1 / beta 3 del GABA(A)R); no se detectó reactividad relacionada con GABA(A)R con secciones de cerebro de rata y solo las muestras 7-13 mostraron una reactividad leve con neuronas cultivadas. En la tabla 3 se muestra la información clínica. En resumen, los 6 pacientes con encefalitis tuvieron convulsiones, uno de los mismos (caso n.º 7; un varón de 2 años de edad) con estado epiléptico refractario que requirió coma inducido farmacológicamente. Entre los otros 6 pacientes, 2 tenían opsoclonos-mioclono, y 4 síndrome de persona rígida.

En general, 6 de 12 pacientes tuvieron otros anticuerpos neuronales además de los anticuerpos GABA(A)R: 5 tenían anticuerpos GAD y 1 anticuerpos NMDAR. Lo hallazgos adicionales sugiriendo una propensión a la autoinmunidad o desregulación inmunitaria incluyeron, anticuerpos TPO en 1 paciente, diabetes mellitus de tipo 1 en 2, y tiroiditis de Hashimoto en 1.

El tratamiento y el seguimiento fueron evaluables en 6 pacientes. Se usó la inmunoterapia en 5/6 pacientes: 1 tuvo una recuperación completa, 3 una recuperación parcial y 1 murió. El paciente que no recibió inmunoterapia tuvo síndrome de persona rígida que se controló sintomáticamente con clobazam y baclofeno.

Ejemplo 2: Inmunohistoquímica del cerebro de ratón

Se sacrificaron ratas Wistar hembra adultas sin perfusión, y se extrajo el cerebro y se fijó mediante inmersión en paraformaldehído al 4 % durante 1 hora a 4 °C, se crioprotegieron en sacarosa al 40 % durante 48 horas, se incluyeron en medio de compuesto para congelación, y se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Secciones de tejido con un espesor de siete micrómetros se incubaron a continuación secuencialmente con H₂O₂ al 0,3 % durante 15 minutos, suero de cabra al 5 % durante 1 hora, y CSF del paciente (1:5) o suero del control (1:200), a 4 °C durante la noche. Tras usar los anticuerpos biotinilados secundarios adecuados (anticuerpo de cabra dirigido contra BA-3000 humana, dilución 1:2000), se desarrolló la reactividad con el procedimiento de la avidina-biotina-peroxidasa, como se notificó.¹

Ejemplo 3: Inmunocitoquímica en cultivos neuronales

se prepararon cultivos neuronales de hipocampo de rata como se ha notificado.⁵ se incubaron neuronas vivas en crecimiento sobre cubres durante 1 hora a 37 °C con suero de pacientes o del control (dilución final 1:200) o CSF (1:10). Tras retirar el medio y un lavado extenso con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las neuronas se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % y se inmunomarcaron con anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con Alexa Fluor 488 (dilución 1:1000, Invitrogen, A11013). Se fotografiaron los resultados con un microscopio de fluorescencia usando el software Zeiss Axiovision (Zeiss, Thornwood, NY).

Ejemplo 4: Inmunocitoquímica en células HEK293

a) Células fijadas

Se transfectaron células HEK293 con plásmidos que contenían la subunidad alfa 1 humana del GABA(A)R (número de referencia: NM_000806.3; Número del catálogo de Origene: SC119668; SEQ ID NO.: 1) o la subunidad beta 3 humana del receptor (número de referencia: NM_000814.3; Número del catálogo de Origene: SC125324; SEQ ID NO: 2); las células transfectadas con un plásmido sin inserción se usaron como control. e hicieron crecer las células durante 24 horas tras la transfección antes de la evaluación. Las células transfectadas se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,3 % y a continuación se incubaron con suero del paciente (diluciones en serie 1:20 y superiores) o CSF (diluciones en serie 1:5 y superiores) junto con un anticuerpo de ratón comercial contra la subunidad alfa 1 del GABA(A)R (dilución 1:5000, Millipore, MAB339) o subunidades beta 3 (dilución 1:5000, Abcam AB4046) durante 2 horas a temperatura ambiente, y los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondiente (anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con Alexa Fluor 488, A11013, dilución 1:1000; y anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594, A11032, dilución 1:1000; ambos de Invitrogen). Se fotografiaron los resultados con un microscopio de fluorescencia usando el software Zeiss Axiovision.

b) Células vivas

Células HEK vivas se incubaron con suero (diluciones en serie 1:20 y superiores) o CSF (diluciones en serie 1:5 y superiores) del paciente junto con los mismos anticuerpos comerciales contra GABA(A)R indicados anteriormente durante 1 hora a 37 °C, se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 5 minutos. Tras el lavado, las

células se incubaron a continuación con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa Fluor indicados anteriormente.

Ejemplo 5: Inmunoprecipitación e inmunotransferencia

5 Neuronas vivas obtenidas como anteriormente, se hicieron crecer en placas de 100 mm (densidad $1,5 \times 10^6$ neuronas/placa) y se incubaron a 37 °C con suero del paciente filtrado (dilución 1.200) durante 1 hora. A continuación se lavaron las neuronas con PBS, se lisaron con tampón (NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, tris (hidroximetil) aminometano [Tris]-HCl 100 mM, desoxicolato ácido al 0,5 %, Triton X-100 al 1 %, pH 7,5) que contenía inhibidores de la proteasa (P8340; Sigma Labs), y se centrifugaron a $16,1 \times 10^3$ g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retuvo y se incubó con perlas de proteína A/G agarosa (20423; Pierce, Rockford, IL) durante la noche a 4 °C, se centrifugó, y el aglomerado que contenía las perlas con anticuerpos del paciente unidos al antígeno superficial de la célula diana se lavaron a continuación con tampón de lisis, se distribuyeron en alícuotas, y se mantuvieron a -80 °C. Se resuspendió una alícuota de este aglomerado en tampón Laemmli, se sometió a ebullición durante 5 minutos, se separó en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio del 4 al 15 % y se visualizaron las proteínas con el gel de tinción EZBlue (G1041; Sigma Labs). debido a la ausencia de diferencias entre las bandas visibles de EZBlue entre las muestras del paciente y las muestras del control, Todas las proteínas precipitadas que corrieron a lo largo del gel se analizaron usando la espectrometría de masas.

Ejemplo 6: Espectrometría de masas

Se llevó a cabo la espectrometría de masas en la Proteomics Facility en el Abramson Cancer Center de la University of Pennsylvania. Las bandas de proteínas se digirieron con tripsina y se analizaron con una cromatografía de nanolíquidos (nano LC) nanopulverización/trampa de iones lineal (LTQ) espectrómetro de masas (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA) como se notificó.²⁷ En resumen, 3 ml de muestra digerida con tripsina se inyectaron con un automuestreado de Eksigent (Dublín, CA). Las muestras digeridas se separaron en una columna C18 de 10 cm, usando nano LC de Eksigent con un caudal de 200 ml/minuto, gradiente de 45 minutos. se usó la nanopulverización en línea para pulverizar los péptidos separados en la LTQ, y se utilizó el software Xcalibur (Thermo Scientific, Waltham, MA) para adquirir los datos en bruto. se investigaron los archivos de datos en bruto utilizando Mascot (Matrix Science, Boston, MA) frente a las bases de datos NCBI y Swissprot (Swiss Institute of Bioinformatics (Basilea, Suiza).

Ejemplo 7: Estudios de inmunoabsorción e inmunocompetición

A fin de determinar si la reactividad del cerebro a los anticuerpos del paciente fue específicamente debida a la unión de GABA(A)R, seis placas de 60 mm de células HEK 293 que expresaban GABA(A) se incubaron secuencialmente con suero del paciente (1:200), cada placa durante 1 hora a 37 °C. tras la incubación con las seis placas, el suero inmunoabsorbido se incubó con secciones de hipocampo de rata, como anteriormente. El suero del paciente adsorbido con células HEK 293 no transfectadas sirvió como control.

Para determinar si los anticuerpos del paciente se dirigieron contra antígenos y epítomos similares de GABA(A)R, Se llevaron a cabo estudios de inmunocompetición. Se aisló la IgG de un paciente cuyo suero contenía altos niveles de anticuerpos IgG contra GABA(A)R usando proteína A y perlas de sefarosa G, y posteriormente se eluyó y marcó con biotina, como se notificó (ref). Después, se incubaron las secciones del cerebro de rata con otros sueros del paciente o del control (diluidos 1:5) durante la noche a 4 °C, se lavaron en PBS, y se incubaron posteriormente con la IgG biotinilada humana indicada que contenía anticuerpos GABA(A)R (dilución 1:40) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se desarrolló la reactividad usando el procedimiento de la avidina-biotinperoxidasa. Se consideraron dos sueros para competir por los mismos epítomos de GABA(A)R, cuando la preincubación del tejido con un suero abrogó la reactividad de la IgG del otro paciente.

Ejemplo 8: Análisis cuantitativo del inmunomarcado del GABA(A)R neuronal por los anticuerpos del paciente

Para determinar el grado de inmunomarcado del GABA(A)R por los anticuerpos del paciente, se incubaron neuronas de hipocampo de rata (div) 14 días *in vitro* con un CSF del paciente representativo (dilución 1.20) durante 30 minutos, a continuación se lavaron, se fijaron y se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón comercial (Millipore 05-474; 1:500) contra una secuencia contenida en la subunidad beta 2/3 (que es un componente de la mayoría de GABA(A)R³⁰) seguido por los anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes adecuados,, anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con Alexa Fluor 488 (A11013; dilución 1:200) y anticuerpo de burro dirigido contra IgG de ratón conjugado con Alexa fluor 594 (A21203; dilución 1:200, ambos de Invitrogen). Se obtuvieron imágenes con microscopio confocal de barrido de láser (Leica TCS SP5). Se ajustaron los niveles de luz láser y la ganancia y la compensación del detector en cada experimento de tal manera que no se saturaron los valores de píxeles en cualquiera de las condiciones de tratamiento. Se determinaron los valores umbral de las imágenes, y se determinó el número de agrupaciones individuales a lo largo de las dendritas neuronales usando software interactivo (ImageJ).

Ejemplo 9: Análisis de los efectos estructurales de los anticuerpos del paciente en las agrupaciones de GABA(A)R

Para determinar los efectos de los anticuerpos del paciente sobre el número y la localización de las agrupaciones de GABA(A)R, 14 neuronas de hipocampo de rata *div* se trataron con CSF del paciente o del control (dilución 1:20 en

medio Neuro-Basal + B27; GIBCO, Carlsbad, CA) durante 2 días. Cada día, 20 de 300 microlitros de medio en cada pocillo de cultivo se retiraron y se sustituyeron con 20 microlitros de CSF reciente del paciente o del control. Aproximadamente 16 neuronas *div*, se fijaron en paraformaldehído preparado recientemente (paraformaldehído al 4 %, sacarosa al 4 % en solución salina tamponada con fosfato) durante 5 minutos, se permeabilizaron en Triton X-100 al 0,25 % durante 10 minutos, y se bloquearon en suero de cabra normal al 5 % durante 1 hora. A continuación se incubaron las neuronas con el anticuerpo monoclonal indicado contra la subunidad beta 2/3 (dilución 1:500), o un anticuerpo monoclonal de ratón contra gefirina (dilución 1:200, Synaptic Systems, 147011), o un anticuerpo policlonal de cobaya contra el transportador vesicular de GABA (VGAT, dilución 1:1000; Synaptic Systems, 131004) o un anticuerpo de conejo contra GluN1 (anti-NMDAR1, dilución 1:100; Millipore, AB9864R) durante 2 horas, seguido por los anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes adecuados (anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488, A-11001, dilución 1:200; anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de cobaya conjugado con Alexa Fluor 594, A-11076, dilución 1:200; anticuerpo de burro dirigido contra IgG de conejo conjugado con Cy5, dilución 1:200, Jackson ImmunoResearch 711-175-152). se obtuvieron imágenes y se analizaron como anteriormente.

Ejemplo 10: Identificación del antígeno diana como el GABA(A)R

Usando la inmunohistoquímica del suero y el CSF del cerebro de rata de los dos pacientes índice y 4 pacientes adicionales se produjo un patrón similar de reactividad del neuropilo (Figura 4, A; Figura 5). Estudios posteriores con cultivos de neuronas de hipocampo de roedores vivos demostraron que el antígeno diana estaba en la superficie celular (Figura 4, B). La inmunoprecipitación del antígeno diana usando el suero de un paciente, seguido por la separación electroforética de proteínas y la tinción con el gel EZBlue no producen ninguna banda específica en comparación con el suero del control (no se muestran los datos). La espectrometría de masas de todas las proteínas separadas demostró que el suero del paciente, pero no el suero del control, tenía fragmentos de proteínas precipitadas que contenían tres secuencias del GABA(A)R (subunidad beta 3; Tabla 2).

Ejemplo 11: Los anticuerpos del paciente reconocen una subunidad GABA(A)R expresada en células HEK (ensayo basado en células)

Debido a que las subunidades beta 3 forman complejos con la subunidad alfa 1 del GABA(A)R, los inventores ensayaron la reactividad de los anticuerpos del paciente con células HEK transfectadas con las subunidades alfa 1 o beta 3 humanas, o una combinación de ambas. Estos experimentos mostraron que todos los pacientes reconocieron la expresión simultánea de las subunidades alfa 1 / beta 3 en suero o CSF, pero cuando las subunidades se evaluaron individualmente, cuatro muestras del paciente reconocieron las subunidades alfa 1 y beta 3, solo una de las subunidades alfa 1, y otra requirieron la expresión simultánea de alfa 1 /beta 3. Por este motivo, la expresión simultánea de ambas subunidades se usó para la determinación de los títulos (Tabla 1). Para optimizar las CBA, los inventores compararon la sensibilidad del ensayo usando células HEK vivas o fijadas y permeabilizadas (CBA viva, o CBA fijada) que expresaban las subunidades alfa 1 / beta 3 del GABA(A)R. estos estudios mostraron que todos los anticuerpos CSF de los pacientes fueron detectables con CBA vivas o fijadas, pero los anticuerpos séricos fueron predominantemente visibles con CBA vivas (Figura 6).

La inmunoabsorción de un suero representativo (que compitió con los anticuerpos de los otros 5 pacientes por los mismos epítomos cerebrales) con células HEK que expresaban las subunidades alfa 1 / beta 3 del GABA(A)R dio como resultado una anulación de la reactividad con el cerebro de rata y los cultivos de neuronas, confirmando adicionalmente que esta reactividad estaba con el GABA(A)R (Figura 7).

Ejemplo 12: Identificación de dos grupos inmunitarios de pacientes

Usando las CBA vivas indicadas, se identificaron 12 pacientes adicionales con anticuerpos contra la subunidad GABA(A)R. En estos 12 pacientes, el título del anticuerpo sérico usando diluciones en serie de muestras fue siempre <1:160; de 3 de estos pacientes (casos n.º 7, 12 y 18) el CSF estaba disponible y todos fueron negativos; de los otros 9 pacientes no estaba disponible el CSF. Se describe en el presente documento anteriormente un resumen de estos pacientes y se muestra en la tabla 3. En resumen, 5 pacientes tuvieron encefalitis con convulsiones prominente (uno con estado epiléptico refractario requirió coma inducido farmacológicamente), 1 tenía encefalitis anti-NMDAR, 2 opsoclono-mioclono, y 4 síndrome de persona rígida (2 de ellos en asociación con anticuerpos GAD).

En general, estos experimentos desvelaron dos grupos inmunitarios de pacientes, (1) los 6 pacientes descritos anteriormente con títulos elevados de anticuerpos en suero (>1:160) y CSF, y (2) los 12 pacientes con títulos bajos de anticuerpos en suero y/o anticuerpos ausentes en CSF. Mientras que los anticuerpos en pacientes del primer grupo se demostraron con tres técnicas (inmunohistoquímica con cerebro de rata, neuronas cultivadas, y CBA), los anticuerpos en pacientes del segundo grupo fueron solo detectables con CBA vivas (todos los casos) y se cultivaron neuronas vivas (casos n.º 7-13).

Ejemplo 13: Los anticuerpos del paciente se unen selectivamente al GABA(A)R neuronal y eliminan los receptores de las sinapsis

Los siguientes estudios se realizaron con CSF de un paciente representativo cuya reactividad cerebral era específica solamente por los anticuerpos GABA(A)R. La reactividad se anuló mediante preabsorción en células HEK que expresan GABA(A)R (similar a la Figura 7), y mediante ensayos de inmunocompetición con anticuerpos procedentes

de los otros 5 pacientes con títulos altos de anticuerpos, indicando que todos los anticuerpos de los pacientes se dirigen a los mismos epítomos (Figura 8). Para examinar el grado de reconocimiento del GABA(A)R por los anticuerpos del CSF del paciente, el inmunomarcado de GABA(A)R se cuantificó mediante microscopía confocal (Figura 9A). Estos resultados sugieren que el 89 % de los anticuerpos del paciente marcados con los grupos que contienen GABA(A)R (Figura 9B). Para examinar los efectos de los anticuerpos del paciente sobre las sinapsis inhibitoras que contienen GABA(A)R, las neuronas se trataron con los anticuerpos del CSF del paciente o un CSF de control durante 48 horas. Estos estudios mostraron que la densidad de los grupos de GABA(A)R a lo largo de las dendritas no había disminuido significativamente (Figura 9C, panel izquierdo, puntos de color verde, Figura 9D), pero que los grupos de GABA(A)R en las sinapsis, medidos como densidad de puntos marcados simultáneamente con el marcador presináptico vGAT se redujeron en gran medida (Figura 9C, puntos de color amarillo en el panel derecho superpuestos entre los puntos verdes y rojos, Figura 9E). Este hallazgo sugiere que los anticuerpos presentes en el CSF del paciente, pero no en el CSF de control, eliminaron GABA(A)R de los sitios sinápticos. El efecto era específico de GABA(A)R ya que la densidad de la agrupación de otros marcadores sinápticos tales como gefirina (Figura 9F) y la subunidad GluN1 del NMDAR (no se muestran los datos) no se vio afectada.

15 **Listado de referencias**

1. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, Galetta SL, Dichter M, Alavi A, Rosenfeld MR, Dalmau J. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain* 2005;128:1764-1777.
2. Andrade DM, Tai P, Dalmau J, Wennberg R. Tonic seizures: a diagnostic clue of anti-LGII encephalitis? *Neurology* 2011;76:1355-1357.
3. Bayreuther C, Bourg V, Dellamonica J, Borg M, Bernardin G, Thomas P. Complex partial status epilepticus revealing anti-NMDA receptor encephalitis. *Epileptic Disord* 2009;11:261-265.
4. Blanc F, Ruppert E, Kleitz C, Valenti MP, Cretin B, Humbel RL, Honnorat J, Namer IJ, Hirsch E, Manning L, de Seze J. Acute limbic encephalitis and glutamic acid decarboxylase antibodies: a reality? *J Neurol Sci* 2009; 287:69-71.
5. Buchhalter JR, Dichter MA. Electrophysiological comparison of pyramidal and stellate nonpyramidal neurons in dissociated cell culture of rat hippocampus. *Brain Res Bull* 1991;26:333-338.
6. Dalmau J. Status epilepticus due to paraneoplastic and nonparaneoplastic encephalitides. *Epilepsia* 2009;50 Supl 12:58-60.
7. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008;7:1091-1098.
8. Florance NR, Davis RL, Lam C, Szperka C, Zhou L, Ahmad S, Campen CJ, Moss H, Peter N, Gleichman AJ, Glaser CA, Lynch DR, Rosenfeld MR, Dalmau J. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol* 2009;66:11-18.
9. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, Schuster FL, Christie LJ, Tureen JH. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* 2006;43:1565-1577.
10. Gonzalez MI. The possible role of GABAA receptors and gephyrin in epileptogenesis. *Front Cell Neurosci* 2013;7:113.
11. Höftberger, R., Titulaer, M. J., Sabater, L., et al. Encephalitis and GABA(B) Receptor Antibodies: Novel Findings in a New Case Series of 20 Patients. *Neurology*. 2013.
12. Honnorat J, Saiz A, Giometto B, Vincent A, Brieva L, de Andres C, Maestre J, Fabien N, Vighetto A, Casamitjana R, Thivolet C, Tavalato B, Antoine J, Trouillas P, Graus F. Cerebellar ataxia with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies: study of 14 patients. *Arch Neurol* 2001;58:225-230.
13. Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci* 2010;30:5866-5875.
14. Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, Peles E, Buckley C, Lang B, Vincent A. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 2010; 133 :2734-2748.
15. Irani SR, Michell AW, Lang B, Pettingill P, Waters P, Johnson MR, Schott JM, Armstrong RJ, Zagami S, Bleasel A, Somerville ER, Smith SM, Vincent A. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi 1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2011;69:892-900.

16. Jeffery OJ, Lennon VA, Pittock SJ, Gregory JK, Britton JW, McKeon A. GABAB receptor autoantibody frequency in service serologic evaluation. *Neurology* 2013;81:882-887.
17. Johnson N, Henry C, Fessler AJ, Dalmau J. Anti-NMDA receptor encephalitis causing prolonged nonconvulsive status epilepticus. *Neurology* 2010;75:1480-1482.
- 5 18. Kruer, M. C., Lim, K. Y., Hoftberger, R., Svoboda, M. D., Woltjer, R. L., Dalmau, J. Opsoclonus, Ataxia, Chorea, and Seizures in Pediatric GABA(B) Receptor Autoimmunity. *JAMA Neurol.* 2013.
19. Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, Mata S, Kremens D, Vitaliani R, Geschwind MD, Bataller L, Kalb RG, Davis R, Graus F, Lynch DR, Balice-Gordon R, Dalmau J. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 2009;65:424-434.
- 10 20. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010;9:776-785.
21. Lancaster E, Dalmau J. Neuronal autoantigens-pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* 2012;8:380-390.
- 15 22. Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol* 2010;9:67-76.
23. Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology* 2011;77:179-189.
- 20 24. Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2010;67:470-478.
25. Mukherjee J, Kretschmannova K, Gouzer G, Maric HM, Ramsden S, Tretter V, Harvey K, Davies PA, Triller A, Schindelin H, Moss SJ. The residence time of GABA(A)Rs at inhibitory synapses is determined by direct binding of the receptor alpha1 subunit to gephyrin. *J Neurosci* 2011;31:14677-14687.
- 25 26. Saiz A, Blanco Y, Sabater L, Gonzalez F, Bataller L, Casamitjana R, Ramio-Torrenta L, Graus F. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain* 2008;131 :2553-2563.
27. Strader MB, Tabb DL, Hervey WJ, Pan C, Hurst GB. Efficient and specific trypsin digestion of microgram to nanogram quantities of proteins in organic-aqueous solvent systems. *Anal Chem* 2006;78:125-134.
- 30 28. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangue T, Glaser C, Iizuka T, Honig LS, Benseler SM, Kawachi I, Martinez-Hernandez E, Aguilar E, Gresa-Arribas N, Ryan-Flanagan N, Torrents A, Saiz A, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 2013;12:157-165.
29. Tretter V, Moss SJ. GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci* 2008;1:7.
- 35 30. Vithlani M, Terunuma M, Moss SJ. The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol Rev* 2011;91:1009-1022.
31. Zhou C, Huang Z, Ding L, Deel ME, Arain FM, Murray CR, Patel RS, Flanagan CD, Gallagher MJ. Altered cortical GABAA receptor composition, physiology, and endocytosis in a mouse model of a human genetic absence epilepsy syndrome. *J Biol Chem* 2013;288:21458-21472.
- 40 32. Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, Tilley DH, Glaser CA. The Frequency of Autoimmune N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis Surpasses That of Individual Viral Etiologies in Young Individuals Enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin Infect Dis* 2012.
33. Gable MS, Gavali S, Radner A, Tilley DH, Lee B, Dyner L, y col. Anti-NMDA receptor encephalitis: report of ten cases and comparison with viral encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1421-1429.
- 45 34. 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.
35. Documento WO2013041540
36. Documento US4647543

37. Voigt, J., Krause, C., Rohwader, E., Saschenbrecker, S., Hahn, M., Danckwardt, M., Feirer, C., Ens, K, Fechner, K, Barth, E, Martinetz, T., y Stöcker, W. (2012), Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEP-2 Cells," Clinical and Developmental Immunology, vol. 2012, doi:10.1155/2012/651058.

5 38. Bonilla, E., Francis, L., Allam, F. y col., "Immunofluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients," Clinical Immunology, vol. 124, n.º 1, pp. 18-21,2007.

39. Rönspeck W, Brinckmann R, Egner R, Gebauer F, Winkler D, Jekow P, et. al. Peptide based adsorbers for therapeutic immunoadsorption. Ther Apher Dial 2003 Feb;7(1):91-7.

Tabla 1: Rasgos clínicos de pacientes con anticuerpos GABA(A)R

N.º	Sexo edad	Síntomas principales	Otro	CSF	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
1	F, 16	Varios meses de problemas de memoria, disfunción cognitiva, empeoramiento de la ansiedad social, estado de ánimo deprimido y fatiga. Cuatro días antes del ingreso desarrolló cefalea, fatiga, vértigo, náuseas y escotomas centelleantes. Cinco días después del ingreso hospitalario desarrolló convulsiones tónicas-clónicas que evolucionaron rápidamente a convulsiones frecuentes y estado epiléptico	Linfoma de Flodgkin tratado con quimioterapia y radioterapia. En la presentación, no había tenido cáncer durante 10 meses. La biopsia cerebral del día 14 mostró gliosis astrocítica reactiva difusa intensa, activación de la microglía y una población de linfocitos T reactivos	23 WBC (recuento leucocitario)/µl (69 % de linfocitos); proteína 60 mg/dl; Repetición del estudio al cabo de 5 meses: normal	Múltiples foci de una señal T2/FLAIR elevada en ambos hemisferios, sin restricción de difusión. Repetición del estudio a los 5 meses: Numerosas nuevas lesiones multifocales y atrofia cortical difusa. Repetición del estudio a los 6 meses: sin nuevas lesiones, mejora o resolución de todas las lesiones anteriores y resolución de la atrofia difusa	Ralentización del EEG inicial generalizado mostrando actividad bitemporal epileptiforme. A finales del primer mes de hospitalización descargas generalizadas periódicas epileptiformes	Anticonvulsivos: Levetiracetam, topiramato, midazolam, fenobarbital coma durante 4 meses <u>Inmunosupresores:</u> Metilprednisolona a dosis elevada, IVIG, intercambio de plasma, rituximab, ciclofosfamida, micofolato mofetilo	Tres meses después del ingreso, recuperación neurológica progresiva con resolución gradual del patrón del EEG. Seis meses después del ingreso, recuperación neurológica más rápida. Derivación a rehabilitación a los 7 meses, y a casa a los 10 meses; capaz de caminar con asistencia limitada, de comunicarse y de realizar la mayoría de actividades diarias independientemente. La paciente continuó mejorando su función cognitiva y su memoria a corto plazo.	Suero: alfa 1, beta 3 alfa 1 / beta 3 (>1/1280) <u>CSF:</u> alfa 1 alfa 1 / beta 3 (>1/320)

Continúa

N.º	Sexo edad	Síntomas principales	Otro	CSF	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
2	M, 51	Cambios conductuales, inicialmente con rasgos depresivos que evolucionan a síntomas psicóticos y mutismo. Prurito generalizado. Varias semanas después de la presentación desarrolló epilepsia parcial continuada y un estado epiléptico	Ictus isquémico de la arteria cerebral media derecha a los 46 años (múltiples factores de riesgo cardiovascular), púrpura idiopática trombocitopénica (esplenectomía). Bajos títulos de anticuerpos TPO y Tg	WBC y concentración de proteínas normal; OB positiva	Hiperintensidades T2/FLAIR multifocales con implicación cortical generalizada	Actividad epileptiforme temporal con generalización secundaria. La repetición de los estudios mostró descargas generalizadas periódicas	<u>Anticonvulsivos:</u> Levetiracetam, diazepam, lacosamida, fenitoína, midazolam, propofol, tiopental <u>Inmunosupresores:</u> Esteroides, IVIG, intercambio de plasma, ciclofosfamida y rituximab	El estado epiléptico persistió durante más de 10 semanas, cuando el paciente murió de septicemia	<u>Suero:</u> alfa 1, beta 3 alfa 1/beta 3 (>1/1280) <u>CSF:</u> alfa 1 alfa 1/beta 3 (>1/320)

(continuación)

N.º	Sexo edad	Síntomas principales	Otro	CSF	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
3	M, 28	Cambios conductuales y cognitivos, convulsiones parciales complejas, estado epiléptico	Anticuerpos positivos para TPO	<5 WBC/ μ l; proteína <45 mg/dl	Hiperintensidad mesiotemporal bilateral persistente en FLAIR	Actividad epileptiforme, supresión de ráfagas inducidas farmacológicamente	Anticonvulsivos Propofol, midazolam, levetiracetam, fenitoína, fenobarbital, topiramato, clobazam, tiopental Inmunosupresores: Corticoesteroides IV después oral en disminución	8 semanas de ingreso en cuidados intensivos. Derivación al centro de rehabilitación para gestión de enfermedades críticas, miopatía y deterioro cognitivo, y retorno gradual a la función inicial. En el último seguimiento, 18 meses después de la presentación, el paciente estaba bien, sin convulsiones, o sin medicaciones, y volvió a su empleo anterior.	Suero: alfa 1, beta 3 alfa 1/ (> 1/640) CSF: alfa 1, beta 3 alfa 1 / (> 1/160)

(continuación)

N.º	Sexo edad	Síntomas principales	Otro	CSF	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
4	M, 3	Confusión, apatía, oposición, movimientos distónicos de la lengua, ataxia y corea que afecta las extremidades y el tronco. A las 24 horas desarrolló convulsiones parciales complejas frecuentes y estado epiléptico	Anticuerpos GABA(B)R positivos en suero y CSF La biopsia cerebelar demostró astroglisis diseminada y activación de la microglia con Purkinje y pérdida de granulocitos	154 WBC/µl (94 %L); 228 RBC/µl; proteína 59 mg/dl	Hiperintensidades DWI multifocales dentro del pedúnculo cerebral y el cerebelo sin la correspondiente restricción de ADC. Repetición del estudio: evolución de lesiones a hiperintensidad T2/FLAIR con implicación de los ganglios basales e hipocampos	Intervalo delta difuso con ralentización y descargas de onda en espiga occipital bilateral con generalización secundaria rápida en poliespiga y descargas de onda lenta seguido por atenuación	Anticonvulsivos: Múltiples. Coma inducido con pentobarbital. Debido al empeoramiento de edema cerebral, se realizó una craniectomía posterior descompresiva. Inmunosupresores: Corticosteroides en dosis alta por vía intravenosa e IVIG sin beneficio claro.	Las convulsiones persistieron a pesar de la administración de múltiples anticonvulsivos y eventualmente se controlaron con una infusión continua de pentobarbital. El estado epiléptico reapareció cuando se intentó una reducción de la dosis. A pesar del intenso tratamiento complementario y la gestión agresiva de las convulsiones, 4 semanas después de la presentación inicial, el paciente desarrolló septicemia intensa y falleció. No se realizó autopsia.	Suero: n/a CSF: alfa 1, beta 3 alfa 1 /beta 3 (>1/320)

(continuación)

N.º	Sexo edad	Síntomas principales	Otro	CSF	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
5	M, 4	Hemiparesis progresiva derecha seguida, 2 meses después, por convulsiones parciales complejas que evolucionaron a estado epiléptico		Aumento de WBC y concentración de proteínas	Cambios anómalos en IRM FLAIR que sugieren encefalitis	Ralentización inicialmente generalizada. La repetición del estudio mostró actividad lenta con descargas epileptiformes	Anticonvulsivos: Levetiracetam Inmunosupresores: No	El estado epiléptico se controló con anticonvulsivos y las convulsiones no repitieron durante el ingreso hospitalario.	<u>Suero</u> : alfa 1 alfa 1/beta 3 (>1/320) <u>CSF</u> : negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/beta 3 (>1/40)
6	M, 63	Inicio subagudo de pérdida de memoria a corto plazo, alucinaciones gustativas y olfatorias, calambres faciales, deterioro progresivo con aumento de agitación psicomotora, tinnitus	Diabetes mellitus de tipo 2, hipertensión Hipotiroidismo positivo para GABA(B)R, GAD, anticuerpos TPO y Tg	75 WBC/ μ l; aumento en la concentración de proteínas; OB positiva Repetición del estudio en una recaída 7 años después: <5 WBC/ μ l; proteína <45 mg/dl; OB positiva	aumento de la señal T2/FLAIR en la corteza temporal derecha sin potenciación con gadolinio ni restricción de la difusión	Actividad epiléptica en regiones frontotemporales	Anticonvulsivos: Valproato, levetiracetam, barbiturato Inmunosupresores: Corticosteroides por vía oral	Tras estar exento de síntomas durante 7 años, el paciente desarrolló diplopía y hemiataxia sin opsoclono que se resolvieron de forma espontánea. Durante la recaída no se encontraron anticuerpos GABA(A)R y GABA(B)R, pero persistieron los anticuerpos GAD.	<u>Suero</u> : n/a <u>CSF</u> : negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/beta 3 (>1/20)

*CSF= líquido cefalorraquídeo, EEG = electroencefalografía, F = mujer, FLAIR = recuperación de inversión de imagen por fluido, GABA = ácido gamma-aminobutírico, GAD = ácido glutámico descarboxilasa 65, IVIG = inmunoglobulina intravenosa, M = varón, IRM = formación de imágenes mediante resonancia magnética, ND = no disponible, NMDA = N-metil-D-aspartato, OB = bandas oligoclonales, Tg = tiroglobulina, TPO = peroxidasa tiroidea, WBC = recuento de glóbulos blancos, DWI = obtención de imágenes ponderada por difusión, ADC = coeficiente de difusión aparente

Tabla 2: Secuencias asiladas mediante inmunoprecipitación con el suero del paciente

Secuencia	Subunidad beta 3 de GABA(A)R, probabilidad de identificación del péptido	Sequest XCorr	Sequest delta Cn
(R)LHPDGTVLYGLR(I) (+3H)	95 %	2,97	0,21
R)NVVFATGAYPR(L) (+2H)	95 %	3,21	0,55
(R)VADqLWVPDTYFLnDKK(S)(+3H)	95 %	2,98	0,42

Los datos de masa espectral se analizaron usando el motor de búsqueda Sequest. La confianza del péptido se determinó mediante puntuación de correlación cruzada que representa la sensibilidad, comparando el espectro de fragmentación experimental de los péptidos contra el espectro de fragmentación teórico previsto; y por el DeltaCn, que representa la especificidad de la identificación del péptido. Xcorr > 2 (+2 H), 2,5 (+3 H) y deltaCn > 0,2) indican un buen espectro.

5

Tabla 3: Rasgos clínicos principales de 12 pacientes con títulos bajos de anticuerpos GABA(A)R en suero y/o sin anticuerpos en el CSF

N.º	Sexo, edad	Síntomas principales	Otro	CSF inicial	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
7	M, 2 años y 9 meses (12-218)	Inicio subagudo de convulsiones parciales, 4 meses después desarrolló estado epiléptico resistente al tratamiento, deterioro neurológico y movimientos coreoatetóticos anómalos	Biopsia del músculo y amplios estudios metabólicos: Normal	WBC y concentración de proteínas normal	Primera IRM normal, la repetición del estudio mostró atrofia cortical atribuida a esteroides	Actividad epiléptica con predominancia parietal derecha, ralentización generalizada. Supresión de ráfagas durante el coma inducido con pentobarbital.	Anticonvulsivos: Carbamazepina, valproato, midazolam, levetiracetam, fenobarbital, coma inducido con pentobarbital Inmunosupresores: Corticoesteroides en dosis alta por vía intravenosa y oral en disminución Otros: dieta cetogénica, tiamina, riboflavina, clonidina, biperideno	Respuesta parcial con la dieta cetogénica y los corticoesteroides, muestran deterioro progresivo de las habilidades cognitivas y motoras. Las convulsiones parciales persistían a los 18 meses de seguimiento	Suero: beta 3 alfa 1/ beta 3: 1/160 CSF: negativo

(continuación)

N.º	Sexo, edad	Síntomas principales	Otro	CSF inicial	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
8	M, 41 (08-758)	Inicio subagudo de convulsiones secundarias generalizadas y fiebre. Desarrollo progresivo de epilepsia parcial continua y afasia. Después de 2 años, se desarrollaron varios episodios de estado epiléptico	Anticuerpos dirigidos contra GAD.	WBC y concentración de proteínas normal negativo para OB	Primero: señal suave aumentada en T2/FLAIR en el lóbulo frontal izquierdo. Repetición del estudio: múltiples lesiones en la corteza y la materia blanca en los lóbulos frontal, temporal y occipital izquierdos. La repetición del estudio al cabo de 7 meses fue normal y siguió siendo normal después de 2 años	Anomalías epilépticas en las áreas frontales bilaterales (izquierda > derecha)	Anticonvulsivos: Valproato, oxcarbamazepina, levetiracetam Inmunosupresores: Corticoesteroides en dosis alta por vía intravenosa, tratamiento a largo plazo con esteroides por vía oral a baja dosis	Respuesta parcial a los corticoesteroides en dosis alta por vía intravenosa. Dos años después de la presentación se desarrolló estado epiléptico con buena respuesta al ajuste de los anticonvulsivos y corticoesteroides en dosis alta por vía intravenosa; los anticuerpos GABA (A)R y GAD fueron negativos	Suero: alfa alfa 1/ beta 3: 1/160) CSF: n/a
9	F, 15 (10-494)	Expresión verbal reducida, convulsiones.	Anticuerpos dirigidos contra GAD	8 WBC/ul; proteína 34 mg/dl	Foci bilateral frontotemporal, parietal derecho y frontal izquierdo de señal T2/FLAIR aumentada con potenciación leptomenígea	Actividad epileptiforme multifocal	ND	ND	Suero: alfa 1, beta 3 alfa 1/ beta 3: 1/160) CSF: n/a

(continuación)

N.º	Sexo, edad	Síntomas principales	Otro	CSF inicial	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
10	F, 32 (10-530)	Convulsiones multifocales resistentes al tratamiento.	Diabetes melitus de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto GAD, anticuerpos TPO y Tg	WBC y concentración de proteínas normal	Estudios de IRM iniciales y posteriores normales.	Ondas epilépticas multifocales, convulsiones independientes bilaterales en el lóbulo temporal	Anticonvulsivos: Oxcarbazepina, carbamazepina, lacosamida, levetiracetam, zonisamida, topiramato, clobazam, fenitoína, lamotrigina <u>Inmunosupresores:</u> IVIg, Corticoesteroides de omalizumab, ciclosporina, hidroxicloroquina	Siete años después del inicio seguía habiendo convulsiones descontroladas (tratadas con fenitoína y lamotrigina), dismotilidad gastrointestinal grave. Urticaria resuelta.	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario (alfa 1/ beta 3: 1/40) <u>CSF:</u> n/a
11	F, 74 (06-178)	Inicio subagudo de letargia y cambios alternantes en el nivel de conciencia, sospecha de convulsiones en el lóbulo temporal	Antecedentes de cáncer de ovario	WBC y concentración de proteínas normal	Normal, la repetición del estudio también fue normal	Normal (en el momento en que la paciente estaba alerta)	ND	ND	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario (alfa 1/ beta 3: 1/40) <u>CSF:</u> n/a

(continuación)

N.º	Sexo, edad	Síntomas principales	Otro	CSF inicial	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
12	F, 16 (12-518)	Insomnio, anomalías progresivas del comportamiento, disminución en el nivel de consciencia, discinesia orofacial, convulsiones cortas	Anticuerpos positivos para NMDAR en suero y CSF	17 WBC/µl proteína 24 mg/dl	Primera IRM normal, la repetición del estudio 2 meses después mostró un aumento en la intensidad de la señal (FLAIR cortical, T1 subcortical en el giro temporal superior izquierdo	Ralentización difusa no específica de moderada a severa	Anticonvulsivos: Valproato Inmunosupresores: Corticosteroides en dosis alta por vía intravenosa, IVIG, plasmaféresis, rituximab	Sin convulsiones después del valproato. No se aprecian beneficios evidentes del uso de fármacos inmunosupresores de primera línea. Tres meses después de iniciar rituximab, la disautonomía, la discinesia y las convulsiones se resolvieron. Mejora gradual de las anomalías neuropsiquiátricas/conductuales y de expresión oral durante muchos meses.	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/ beta 3:1/20) CSF: negativo
13	M, 19 (02-699)	Síndrome de la persona rígida asociado con GAD	Diabetes melitus de tipo 1, Anticuerpos dirigidos contra GAD	No se realizó punción lumbar	Normal	No realizado	Anticonvulsivos: Clonazepam Inmunosupresores: Sin otros: baclofeno	Estable, independiente para las actividades diarias	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/ beta 3: 1/ 40) CSF n/d

(continuación)

N.º	Sexo, edad	Síntomas principales	Otro	CSF inicial	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Titulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
14	M, 12 (10-260)	síndrome de la persona rígida asociado con GAD (7 años de síntomas)	Anticuerpos dirigidos contra GAD	ND	ND	ND	ND	ND	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/ beta 3: 1/ 20) <u>CSF</u> n/d
15	M, 21 (02-527)	Síndrome de la persona rígida (5 años de síntomas)	Anticuerpos antinucleares 1/640	ND	ND	ND	ND	ND	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/ beta 3: 1/20) <u>CSF</u> n/d
16	M, ? (00-125)	Síndrome de la persona rígida		ND	ND	ND	ND	ND	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/ beta 3: 1/20) <u>CSF</u> n/d

(continuación)

N.º	Sexo, edad	Síntomas principales	Otro	CSF inicial	IRM	EEG	Tratamiento	Resultado	Títulos subunidad alfa 1/beta 3 diana
17	F, 34 (00-151)	Síndrome de opsoclonía-mioclónia	Idiopático qué?	ND	Normal	No realizado	ND	ND	Suero: negativo con alfa 1 y beta 3 expresado en solitario alfa 1/ beta 3: 1/ 40) <u>CSF</u> n/d
18	M, 65 (94-131)	Síndrome de opsoclonía-mioclónia	Tabaquismo intenso, positivo para ANA, Cribado negativo para neoplasia	WBC y concentración de proteínas normal	Normal	No realizado	Inmunosupresores: Corticoesteroides	Sin respuesta, murió pocos meses después del inicio	Suero: beta 3 alfa 1 / beta 3 (1/20) negativo para <u>CSF</u>
**Los 12 pacientes tenían un título bajo ($\leq 1/160$) de anticuerpos contra GABA(A)R en suero; de los pacientes con números 7, 12, y 18, el CSF estuvo disponible para determinar los anticuerpos contra GABA(A)R; de los otros 9 pacientes, el CSF no estaba disponible. CSF= líquido cefalorraquídeo, EEG = electroencefalografía, F = mujer, FLAIR = recuperación de inversión atenuada por fluido, GABA = ácido gamma-aminobutírico, GAD = ácido glutámico descarboxilasa 65, IVIG = inmunoglobulina intravenosa, M = varón, IRM = formación de imágenes mediante resonancia magnética, ND = no disponible, NMDA = N-metil-D-aspartato, OB = bandas oligoclonales, Tg = tiroglobulina, TPO = peroxidasa tiroidea, WBC = recuento de glóbulos blancos									

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> INSTITUCIO CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANQATS (ICREA) INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES AUGUST PI I SUNYER (ID IBAPS)
5	<120> Procedimiento diagnóstico para detectar una enfermedad autoinmunitaria relacionada con gaba(a) y materia objeto relacionada
	<130> 103263PC
	<160> 4
	<170> BiSSAP 1.0
10	<210> 1
	<211> 456
	<212> PRT
	<213> <i>Homo sapiens</i>
	<220>
15	<221> FUENTE
	<222> 1..456
	<223> /mol_type="protein" /organismo="Homo sapiens"
	<400> 1

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

<210> 2

<211> 473
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..473
 <223> /mol_type="protein" /organismo="Homo sapiens"

<400> 2

```

Met Trp Gly Leu Ala Gly Gly Arg Leu Phe Gly Ile Phe Ser Ala Pro
1      5      10      15
Val Leu Val Ala Val Val Cys Cys Ala Gln Ser Val Asn Asp Pro Gly
20      25      30
Asn Met Ser Phe Val Lys Glu Thr Val Asp Lys Leu Leu Lys Gly Tyr
35      40      45
Asp Ile Arg Leu Arg Pro Asp Phe Gly Gly Pro Pro Val Cys Val Gly
50      55      60
Met Asn Ile Asp Ile Ala Ser Ile Asp Met Val Ser Glu Val Asn Met
65      70      75      80
Asp Tyr Thr Leu Thr Met Tyr Phe Gln Gln Tyr Trp Arg Asp Lys Arg
85      90      95
Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Leu Asn Leu Thr Leu Asp Asn Arg Val
100     105     110
Ala Asp Gln Leu Trp Val Pro Asp Thr Tyr Phe Leu Asn Asp Lys Lys
115     120     125
Ser Phe Val His Gly Val Thr Val Lys Asn Arg Met Ile Arg Leu His
130     135     140
Pro Asp Gly Thr Val Leu Tyr Gly Leu Arg Ile Thr Thr Thr Ala Ala
145     150     155     160
Cys Met Met Asp Leu Arg Arg Tyr Pro Leu Asp Glu Gln Asn Cys Thr
165     170     175
Leu Glu Ile Glu Ser Tyr Gly Tyr Thr Thr Asp Asp Ile Glu Phe Tyr
180     185     190
Trp Arg Gly Gly Asp Lys Ala Val Thr Gly Val Glu Arg Ile Glu Leu
195     200     205
Pro Gln Phe Ser Ile Val Glu His Arg Leu Val Ser Arg Asn Val Val
210     215     220

```

```

Phe Ala Thr Gly Ala Tyr Pro Arg Leu Ser Leu Ser Phe Arg Leu Lys
225                230                235                240
Arg Asn Ile Gly Tyr Phe Ile Leu Gln Thr Tyr Met Pro Ser Ile Leu
                245                250                255
Ile Thr Ile Leu Ser Trp Val Ser Phe Trp Ile Asn Tyr Asp Ala Ser
                260                265                270
Ala Ala Arg Val Ala Leu Gly Ile Thr Thr Val Leu Thr Met Thr Thr
                275                280                285
Ile Asn Thr His Leu Arg Glu Thr Leu Pro Lys Ile Pro Tyr Val Lys
                290                295                300
Ala Ile Asp Met Tyr Leu Met Gly Cys Phe Val Phe Val Phe Leu Ala
305                310                315                320
Leu Leu Glu Tyr Ala Phe Val Asn Tyr Ile Phe Phe Gly Arg Gly Pro
                325                330                335
Gln Arg Gln Lys Lys Leu Ala Glu Lys Thr Ala Lys Ala Lys Asn Asp
                340                345                350
Arg Ser Lys Ser Glu Ser Asn Arg Val Asp Ala His Gly Asn Ile Leu
                355                360                365
Leu Thr Ser Leu Glu Val His Asn Glu Met Asn Glu Val Ser Gly Gly
                370                375                380
Ile Gly Asp Thr Arg Asn Ser Ala Ile Ser Phe Asp Asn Ser Gly Ile
385                390                395                400
Gln Tyr Arg Lys Gln Ser Met Pro Arg Glu Gly His Gly Arg Phe Leu
                405                410                415
Gly Asp Arg Ser Leu Pro His Lys Lys Thr His Leu Arg Arg Arg Ser
                420                425                430
Ser Gln Leu Lys Ile Lys Ile Pro Asp Leu Thr Asp Val Asn Ala Ile
                435                440                445
Asp Arg Trp Ser Arg Ile Val Phe Pro Phe Thr Phe Ser Leu Phe Asn
                450                455                460
Leu Val Tyr Trp Leu Tyr Tyr Val Asn
465                470

```

<210> 3

<211> 1371

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

<222> 1. .1371

<223> /mol_type="ADN" /organismo="Homo sapiens"

<400> 3

ES 2 768 609 T3

```

atgaggaaaa gtccaggtct gtctgactgt ctttgggcct ggatcctcct tctgagcaca      60
ctgactggaa gaagctatgg acagccgtca ttacaagatg aacttaaaga caataccact      120
gtcttcacca ggattttgga cagactccta gatggttatg acaatcgctt gagaccagga      180
ttgggagagc gtgtaaccga agtgaagact gatatcttcg tcaccagttt cggacccggt      240
tcagaccatg atatggaata tacaatagat gtatttttcc gtcaaagctg gaaggatgaa      300
aggttaaaat ttaaaggacc tatgacagtc ctccggttaa ataacctaata ggcaagtaaa      360
atctggactc cggacacatt tttccacaat ggaaagaagt cagtggccca caacatgacc      420
atgcccaaca aactcctgcg gatcacagag gatggcacct tgctgtacac catgaggctg      480
acagtgagag ctgaatgtcc gatgcatttg gaggacttcc ctatggatgc ccatgcttgc      540

ccactaaaat ttggaagtta tgcttataca agagcagaag ttgtttatga atggaccaga      600
gagccagcac gctcagtggg tgtagcagaa gatggatcac gtctaaacca gtatgacctt      660
cttgacaaaa cagtagactc tggaattgtc cagtcaagta caggagaata tgttggttatg      720
accactcatt tccacttgaa gagaaagatt ggctactttg ttattcaaac atacctgcc      780
tgcataatga cagtgattct ctcaaacgct tccttctggc tcaacagaga gtctgtacca      840
gcaagaactg tctttggagt aacaactgtg ctaccatga caacattgag catcagtgcc      900
agaaactccc tccctaaggt ggcttatgca acagctatgg attgggttat tgccgtgtgc      960
tatgcctttg tgttctcagc tctgattgag tttgccacag taaactatct cactaagaga     1020
ggttatgcat gggatggcaa aagtgtggtt ccagaaaagc caaagaaagt aaaggatcct     1080
cttattaaga aaaacaacac ttacgctcca acagcaacca gctacacccc taatttggcc     1140
aggggcgacc cgggcttagc caccattgct aaaagtgcaa ccatagaacc taaagaggtc     1200
aagcccgaaa caaaaccacc agaaccgaag aaaaccttta acagtgtcag caaaattgac     1260
cgactgtcaa gaatagcctt cccgctgcta tttggaatct ttaacttagt ctactgggct     1320
acgtatttaa acagagagcc tcagctaaaa gccccacac cacatcaata g              1371

```

<210> 4
 <211> 1422
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> fuente
 <222> 1. .1422
 <223> /mol_type="ADN" /organismo="Homo sapiens"

<400> 4

ES 2 768 609 T3

```

atgtggggcc ttgcgggagg aaggcttttc ggcattcttct cggccccggt gctgggtggct      60
gtgggtgtgct gcgcccagag tgtgaacgat cccgggaaca tgtcctttgt gaaggagacg      120
gtggacaagc tgttgaaagg ctacgacatt cgcctaagac ccgacttcgg ggggtcccccg      180
gtctgcgtgg ggatgaacat cgacatcgcc agcatcgaca tggtttccga agtcaacatg      240
gattatacct taaccatgta ttttcaacaa tattggagag ataaaaggct cgcctattct      300
gggatccctc tcaacctcac gcttgacaat cgagtggctg accagctatg ggtgcccgcac      360
acatatttct taaatgacaa aaagtcatth gtgcatggag tgacagtga aaaccgcatg      420
atccgtcttc accctgatgg gacagtgctg tatgggctca gaatcaccac gacagcagca      480
tgcatgatgg acctcaggag ataccccctg gacgagcaga actgcactct ggaaattgaa      540
agctatggct acaccacgga tgacattgag ttttactggc gaggcgggga caaggctgtt      600
accggagtgg aaaggattga gctcccgag ttctccatcg tggagcaccg tctgggtctcg      660

aggaatgttg tcttcgccac aggtgcctat cctcgactgt cactgagctt tcggttgaag      720
aggaacattg gatacttcat tcttcagact tatatgccct ctatactgat aacgattctg      780
tcgtgggtgt ctttctggat caattatgat gcatctgctg ctagagttgc cctcgggatc      840
acaactgtgc tgacaatgac aaccatcaac acccaccttc gggagacctt gcccaaatc      900
ccctatgtca aagccattga catgtacctt atgggctgct tcgtctttgt gttcctggcc      960
cttctggagt atgcctttgt caactacatt ttctttggaa gaggccctca aaggcagaag     1020
aagcttgcag aaaagacagc caaggcaaag aatgaccgtt caaagagcga aagcaaccgg     1080
gtggatgctc atggaaatat tctgttgaca tcgctggaag ttcacaatga aatgaatgag     1140
gtctcaggcg gcattggcga taccaggaat tcagcaatat cctttgacaa ctcaggaatc     1200
cagtacagga aacagagcat gcctcgagaa gggcatgggc gattcctggg ggacagaagc     1260
ctcccgacac agaagaccca tctacggagg aggtcttcac agctcaaaat taaaatacct     1320
gatctaaccg atgtgaatgc catagacaga tgggtccagga tcgtgtttcc attcactttt     1380
tctcttttca acttagttta ctggctgtac tatgttaact ga                          1422

```

<210> 5
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..475
 <223> /mol_type="protein" /organismo="Homo sapiens"

<400> 5

ES 2 768 609 T3

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

ES 2 768 609 T3

Tyr	Val	Asn	Ser	Ile	Gly	Pro	Val	Asn	Ala	Ile	Asn	Met	Glu	Tyr	Thr	100	105	110	
Ile	Asp	Ile	Phe	Phe	Ala	Gln	Thr	Trp	Tyr	Asp	Arg	Arg	Leu	Lys	Phe	115	120	125	
Asn	Ser	Thr	Ile	Lys	Val	Leu	Arg	Leu	Asn	Ser	Asn	Met	Val	Gly	Lys	130	135	140	
Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Thr	Phe	Phe	Arg	Asn	Ser	Lys	Lys	Ala	Asp	Ala	145	150	155	160
His	Trp	Ile	Thr	Thr	Pro	Asn	Arg	Met	Leu	Arg	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	165	170	175	
Arg	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Leu	Thr	Ile	Asp	Ala	Glu	Cys	Gln	Leu	180	185	190	
Gln	Leu	His	Asn	Phe	Pro	Met	Asp	Glu	His	Ser	Cys	Pro	Leu	Glu	Phe	195	200	205	
Ser	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Arg	Glu	Glu	Ile	Val	Tyr	Gln	Trp	Lys	Arg	210	215	220	
Ser	Ser	Val	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Arg	Ser	Trp	Arg	Leu	Tyr	Gln	Phe	225	230	235	240
Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Arg	Asn	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Lys	Thr	Thr	Ser	245	250	255	
Gly	Asp	Tyr	Val	Val	Met	Ser	Val	Tyr	Phe	Asp	Leu	Ser	Arg	Arg	Met	260	265	270	
Gly	Tyr	Phe	Thr	Ile	Gln	Thr	Tyr	Ile	Pro	Cys	Thr	Leu	Ile	Val	Val	275	280	285	
Leu	Ser	Trp	Val	Ser	Phe	Trp	Ile	Asn	Lys	Asp	Ala	Val	Pro	Ala	Arg	290	295	300	
Thr	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Thr	Val	Leu	Thr	Met	Thr	Thr	Leu	Ser	Thr	305	310	315	320
Ile	Ala	Arg	Lys	Ser	Leu	Pro	Lys	Val	Ser	Tyr	Val	Thr	Ala	Met	Asp	325	330	335	
Leu	Phe	Val	Ser	Val	Cys	Phe	Ile	Phe	Val	Phe	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	340	345	350	

ES 2 768 609 T3

Tyr Gly Thr Leu Arg Tyr Phe Val Ser Asn Arg Lys Pro Ser Lys Asp
355 360 365

Lys Asp Lys Lys Lys Lys Asn Pro Leu Leu Arg Met Phe Ser Phe Lys
370 375 380

Ala Pro Thr Ile Asp Ile Arg Pro Arg Ser Ala Thr Ile Gln Met Asn
385 390 395 400

Asn Ala Thr His Leu Gln Glu Arg Asp Glu Glu Tyr Gly Tyr Glu Cys
405 410 415

Leu Asp Gly Lys Asp Cys Ala Ser Phe Phe Cys Cys Phe Glu Asp Cys
420 425 430

Arg Thr Gly Ala Trp Arg His Gly Arg Ile His Ile Arg Ile Ala Lys
435 440 445

Met Asp Ser Tyr Ala Arg Ile Phe Phe Pro Thr Ala Phe Cys Leu Phe
450 455 460

Asn Leu Val Tyr Trp Val Ser Tyr Leu Tyr Leu
465 470 475

<210> 6

<211> 1428

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

<222> 1..1428

<223> /mol_type="ADN" /organismo="Homo sapiens"

<400> 6

ES 2 768 609 T3

atgagttcgc	caaatatatg	gagcacagga	agctcagtct	actcgactcc	tgtattttca	60
cagaaaatga	cgggtgtggat	tctgctcctg	ctgtcgctct	accctggctt	cactagccag	120
aaatctgatg	atgactatga	agattatgct	tctaacaaaa	catgggtctt	gactccaaaa	180
gttcctgagg	gtgatgtcac	tgtcatctta	aacaacctgc	tggaaggata	tgacaataaa	240
cttcggcctg	atataggagt	gaagccaacg	ttaattcaca	cagacatgta	tgtgaatagc	300
attggtccag	tgaacgctat	caatatggaa	tacactattg	atatatTTTT	tgcgcaaacg	360
tggtatgaca	gacgtttgaa	atttaacagc	accattaaag	tcctccgatt	gaacagcaac	420
atggtgggga	aaatctggat	tccagacact	ttcttcagaa	attccaaaaa	agctgatgca	480
cactggatca	ccaccccaa	caggatgctg	agaatttgga	atgatggtcg	agtgtctctac	540
accctaaggt	tgacaattga	tgctgagtgc	caattacaat	tgacaaactt	tccaatggat	600
gaacactcct	gcccttgga	gttctcaagt	tatggctatc	cacgtgaaga	aattgtttat	660
caatggaagc	gaagtctctg	tgaagtgggc	gacacaagat	cctggaggct	ttatcaattc	720
tcatttggtg	gtctaagaaa	taccaccgaa	gtagtgaaga	caacttccgg	agattatgtg	780
gtcatgtctg	tctactttga	tctgagcaga	agaatgggat	actttaccat	ccagacctat	840
atcccctgca	cactcattgt	cgtcctatcc	tggtgtctct	tctggatcaa	taaggatgct	900
gttcagcca	gaacatcttt	aggtatcacc	actgtcctga	caatgaccac	cctcagcacc	960
attgcccgga	aatcgctccc	caaggtctcc	tatgtcacag	cgatggatct	ctttgtatct	1020
gtttgtttca	tctttgtctt	ctctgctctg	gtggagtatg	gcaccttgcg	ttatTTTgtc	1080
agcaaccgga	aaccaagcaa	ggacaaagat	aaaaagaaga	aaaaccctct	tcttcggatg	1140
ttttccttca	aggcccttac	cattgatatc	cgcccaagat	cagcaaccat	tcaaataaat	1200
aatgctacac	accttcaaga	gagagatgaa	gagtacggct	atgagtgtct	ggacggcaag	1260
gactgtgccca	gttttttctg	ctgttttgaa	gattgtcgaa	caggagcttg	gagacatggg	1320
aggatacata	tccgcattgc	caaaatggac	tcctatgctc	ggatcttctt	ccccactgcc	1380
ttctgcctgt	ttaatctggg	ctattgggtc	tcctacctct	acctgtga		1428

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o de una célula que expresa el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo para el pronóstico o diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto,
caracterizado porque
 dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende
- A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2;
 B) una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de acuerdo con A); y/o
 C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B);
- y en el que dicha enfermedad autoinmunitaria
- (a) se refiere a enfermedades asociadas con anticuerpos contra GABA(A)R y
 (b) se trata de una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso.
2. Procedimiento para pronosticar o diagnosticar *in vitro* una enfermedad autoinmunitaria en un sujeto, que comprende la etapa de detectar, en una muestra, un autoanticuerpo procedente del sujeto que se une a GABA(A)R, y en el que dicha enfermedad autoinmunitaria
- (a) se refiere a enfermedades asociadas con anticuerpos contra GABA(A)R y
 (b) se trata de una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso.
3. Autoanticuerpo que se une a GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, **caracterizado porque** dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende
- A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2;
 B) una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de acuerdo con A); y/o
 C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B).
4. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende las etapas:
- a. poner una muestra líquida que comprende un autoanticuerpo procedente del sujeto en contacto con un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o de una célula que expresa el GABA(A)R, un fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o poner una muestra de tejido procedente del sujeto en contacto con un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, y
 b. detectar la unión del autoanticuerpo al GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, con la célula o la muestra de tejido,
- caracterizado porque**
 dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende
- A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2;
 B) una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de acuerdo con A); y/o
 C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B).
5. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la etapa b) se lleva a cabo usando microscopía o espectroscopía de inmunofluorescencia, espectroscopía de RMN, espectrometría de masas, radioactividad, reticulación química, resonancia de plasmón superficial, electroforesis en gel natural, actividad cromatográfica o enzimática.
6. Kit de ensayo, caracterizado porque comprende un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, **caracterizado porque** dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo está unido a una fase sólida o sustrato sólido y comprende
- (A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 2
 (B) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de acuerdo con A); y/o
 (C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B).
7. Composición farmacéutica, **caracterizada porque** comprende un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo y/o una célula que expresa el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo,

caracterizada porque

dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo está unido a una fase sólida o sustrato sólido y comprende

- 5 A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 2;
B) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de acuerdo con A); y/o
C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B).

8. Dispositivo médico o diagnóstico revestido con un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o una célula que expresa el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo,

- 10 en el que el dispositivo es un dispositivo diagnóstico que se selecciona entre el grupo que comprende un biochip, una microplaca para ELISA, una inmunotransferencia en línea y una perla revestida,

caracterizado porque

dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende

- 15 A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2;
B) una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de acuerdo con A); y/o
C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B).

9. Un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o de una célula que expresa el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo para su uso en un procedimiento de diagnóstico *in vivo* de una enfermedad autoinmunitaria,

- 20 **caracterizado porque**

dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende

- 25 A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2;
B) una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de acuerdo con A); y/o
C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B);

y en el que dicha enfermedad autoinmunitaria

- (a) se refiere a enfermedades asociadas con anticuerpos contra GABA(A)R y
(b) se trata de una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso.

- 30 10. Un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo o de una célula que expresa el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria,

caracterizado porque

dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende

- 35 A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2;
B) una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de acuerdo con A); y/o
C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B);

y en el que dicha enfermedad autoinmunitaria

- 40 (a) se refiere a enfermedades asociadas con anticuerpos contra GABA(A)R y
(b) se trata de una enfermedad autoinmunitaria del sistema nervioso.

11. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el tratamiento comprende las etapas de

- a. someter una muestra líquida que comprende anticuerpos de un sujeto a un procedimiento *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5 y
b. tratar al sujeto con al menos una sustancia farmacéutica adecuada y/o intercambio de plasma,

- 45 en el que, preferentemente, la al menos una sustancia farmacéutica adecuada se selecciona del grupo que consiste en Rituximab, prednisona, metilprednisolona, ciclofosfamida, micifenolato de mofetilo, inmunoglobulina intravenosa, tacrolimus, ciclosporina, metotrexato, azatioprina, clonazepam, fenitoína, lamotrigina, fenobarbital, ácido valproico, levetiracetam, carbamazepina, tiagabina, felbamato, pregabalina, primidona y gabapentina y la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7,

- 50 o comprende las etapas de

- a. extraer sangre o plasma de un sujeto,
b. poner en contacto la sangre o el plasma con la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 o el dispositivo médico de acuerdo con la reivindicación 8 con el fin de retirar los anticuerpos asociados a la

enfermedad, y

c. readministrar la sangre o el plasma resultante de la etapa b al sujeto.

12. Procedimiento para aislar un autoanticuerpo que se une a GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de

- 5 a. poner una muestra que comprende un anticuerpo que se une a un GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo, en contacto con el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o una célula que expresa el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo,
- b. aislar un complejo que comprende el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo y el autoanticuerpo,
- 10 c. disociar el complejo aislado en la etapa b, y
- d. separar el autoanticuerpo del GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo o célula,

y **caracterizado porque**

dicho GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R, u homólogo del mismo comprende

- 15 A) una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2;
- B) una secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de acuerdo con A); y/o
- C) uno o más fragmentos que comprenden al menos 20 aminoácidos sucesivos de las secuencias de acuerdo con A) o B).

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5, el producto para su uso en el tratamiento de acuerdo con la cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o el dispositivo médico o diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo está unido a una molécula indicadora o a una fase sólida.

14. El kit de ensayo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el GABA(A)R, fragmento de GABA(A)R u homólogo del mismo está unido a una molécula indicadora.

Figura 1

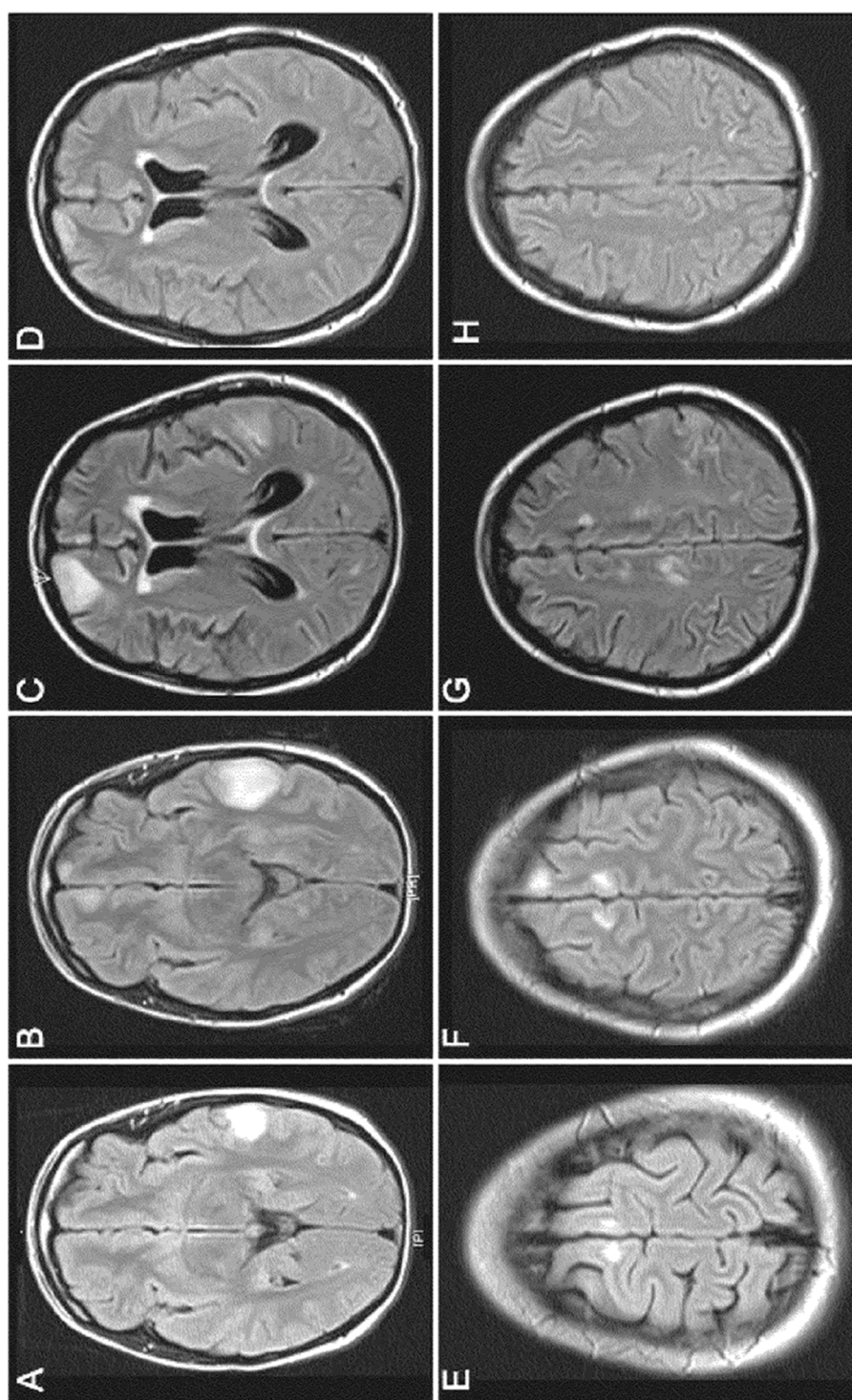


Figura 2

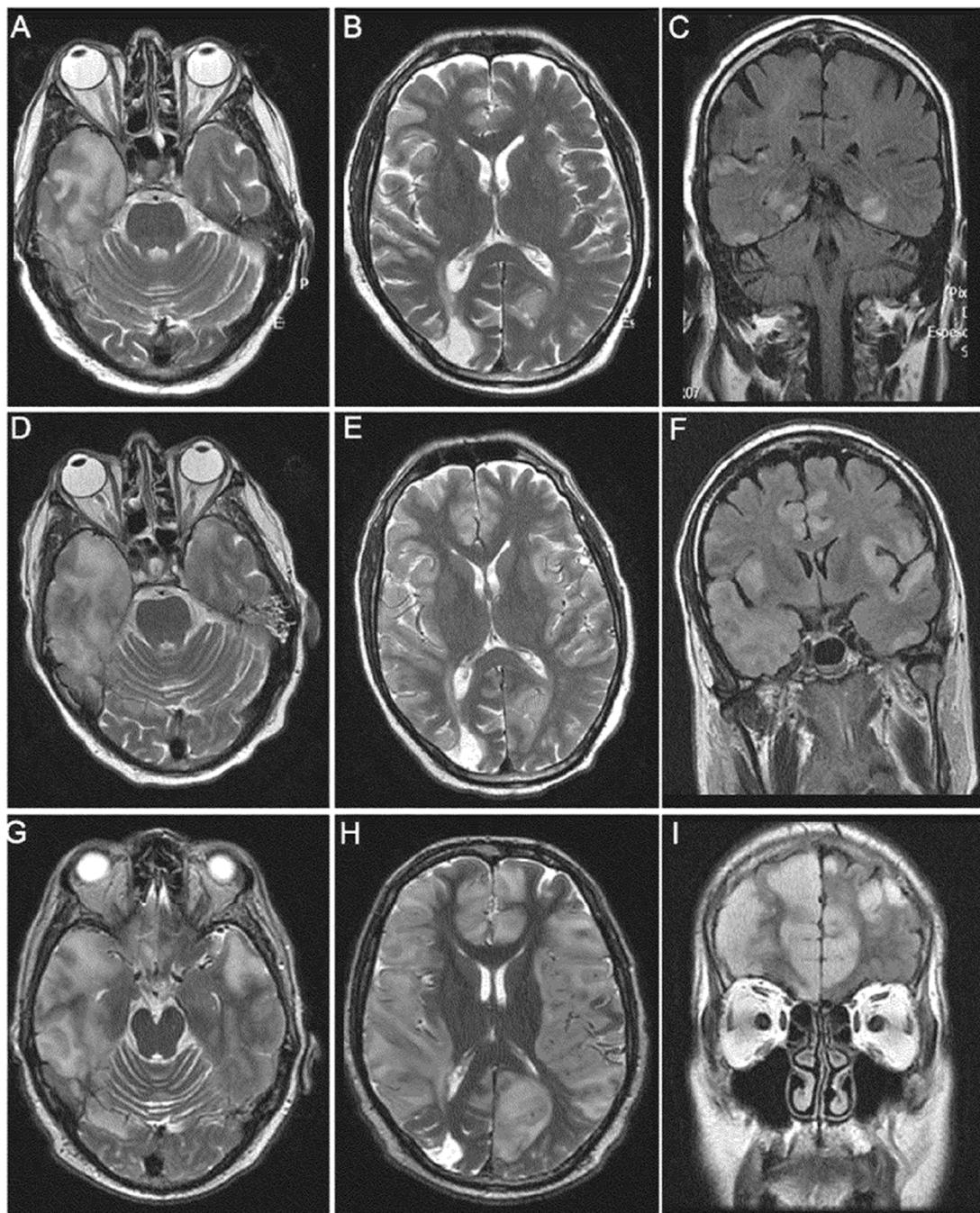
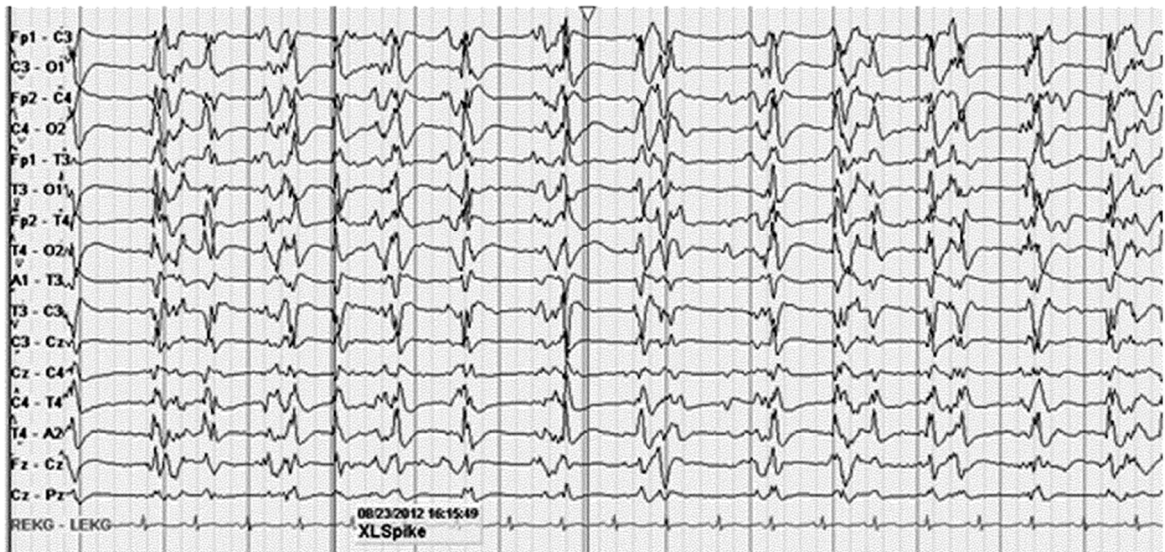


Figura 3

A



B

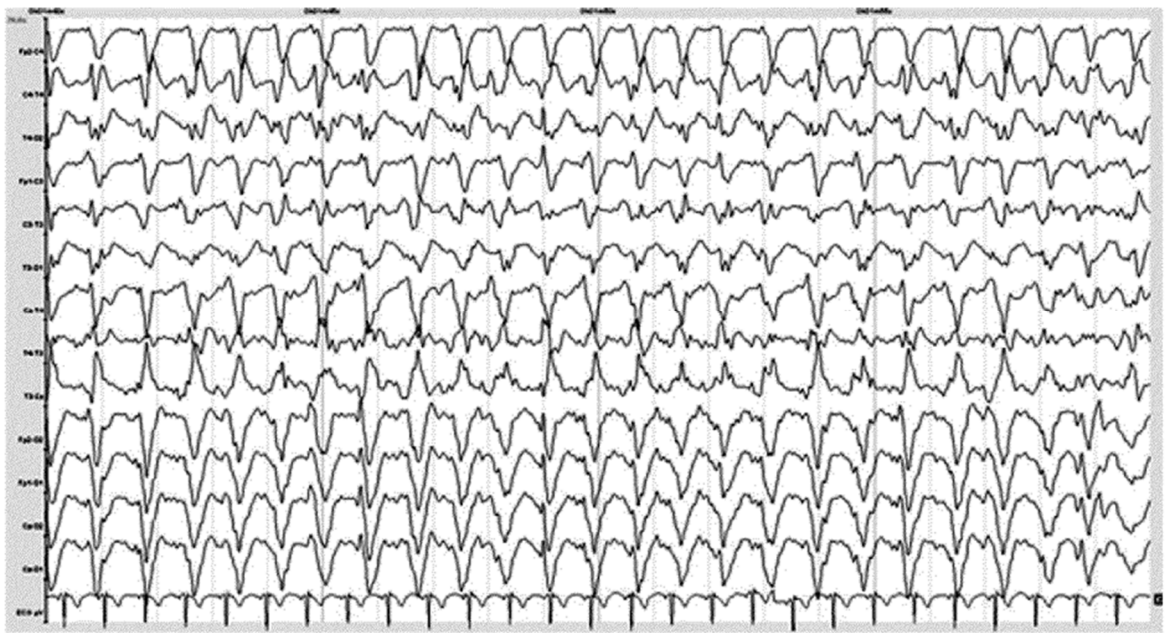


Figura 4

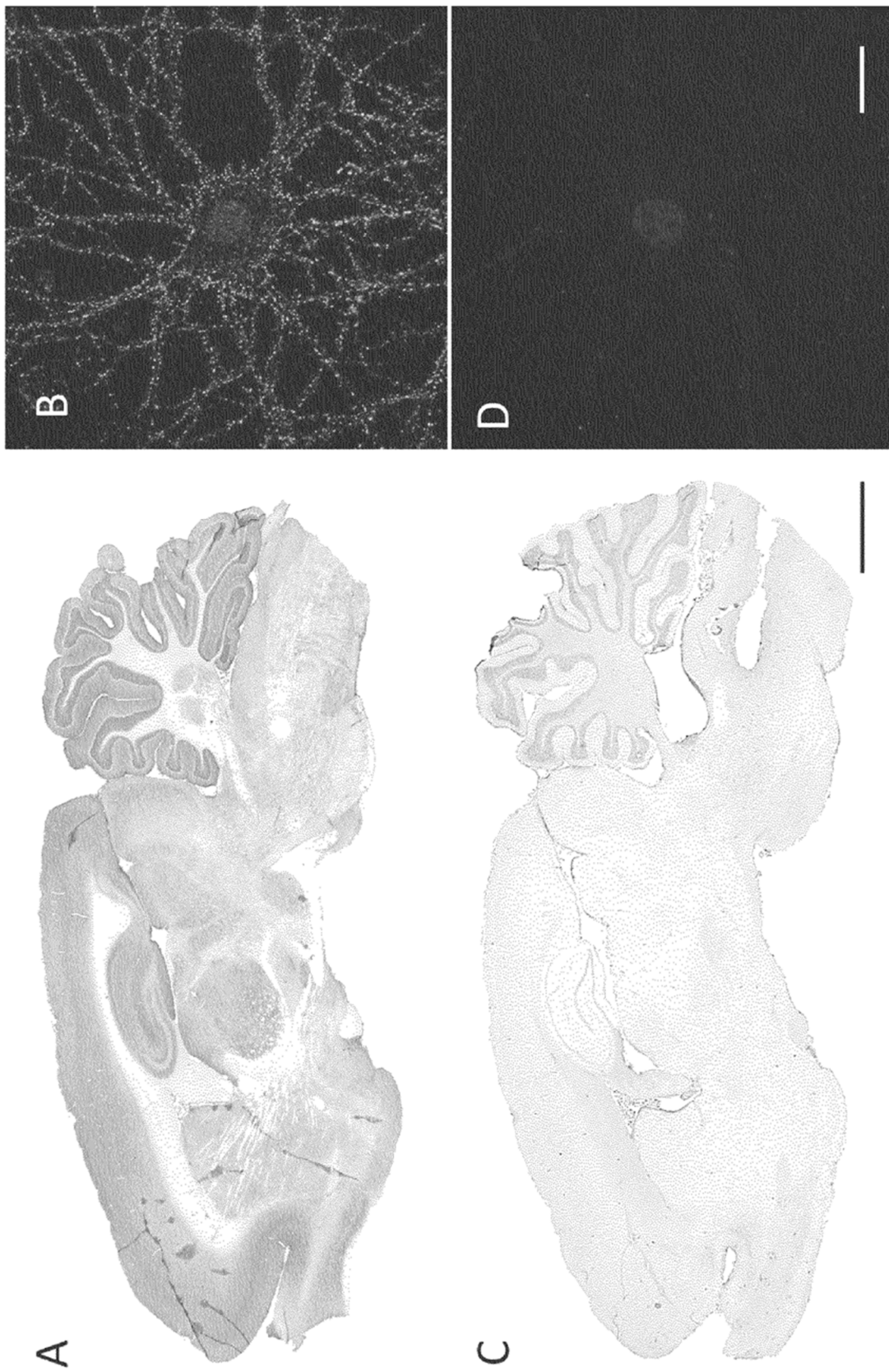


Figura 5

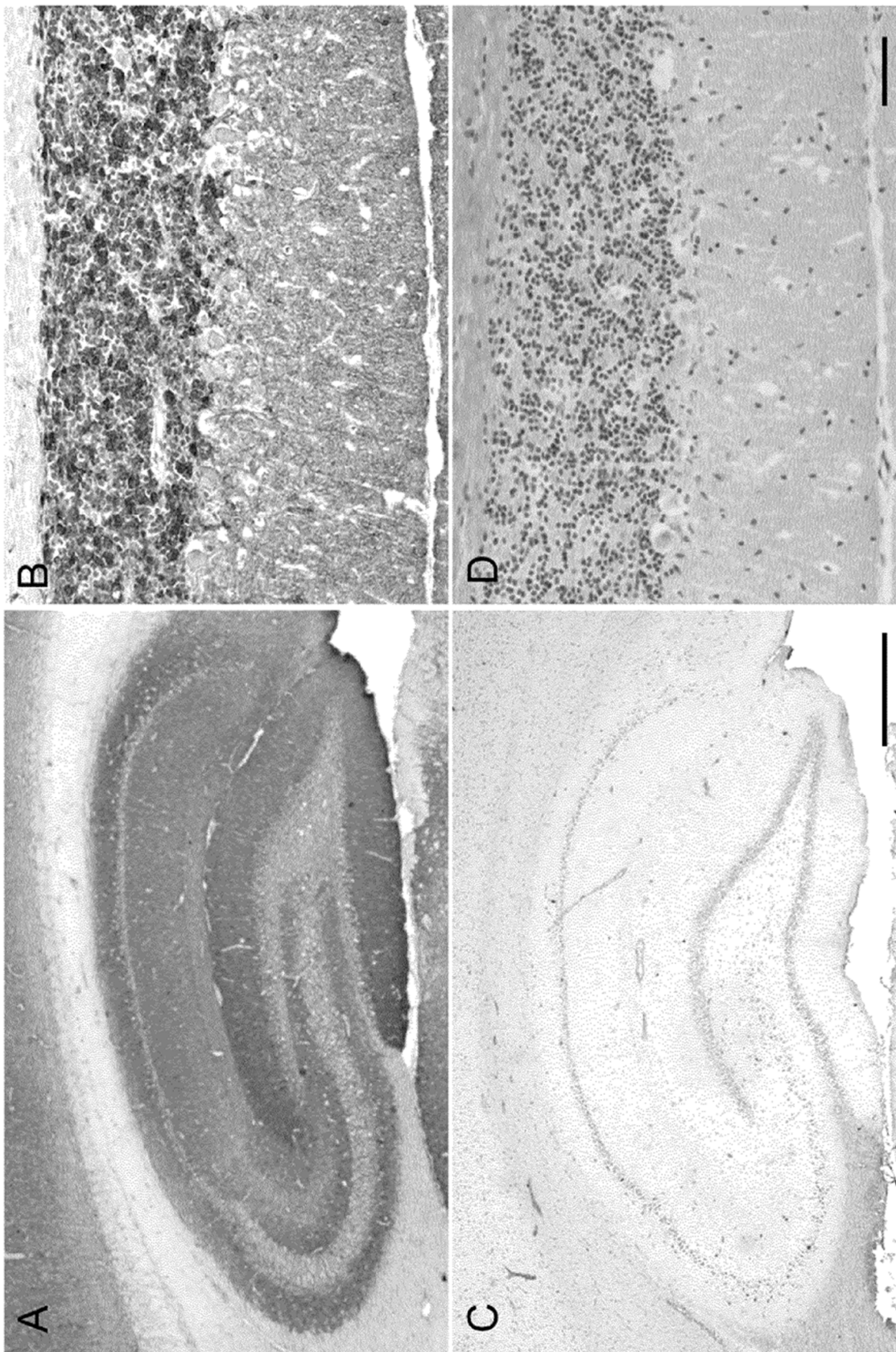


Figura 6

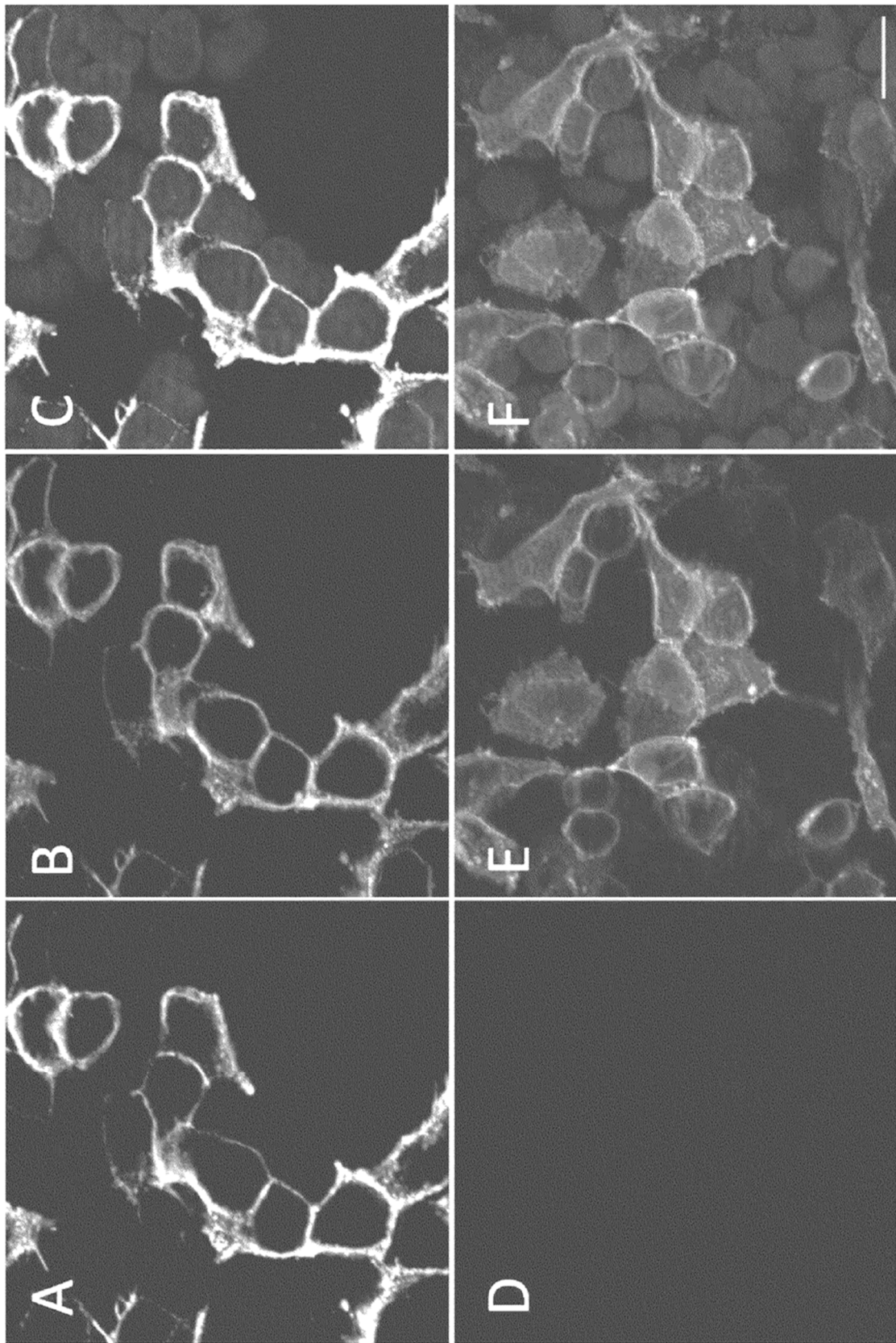


Figura 7

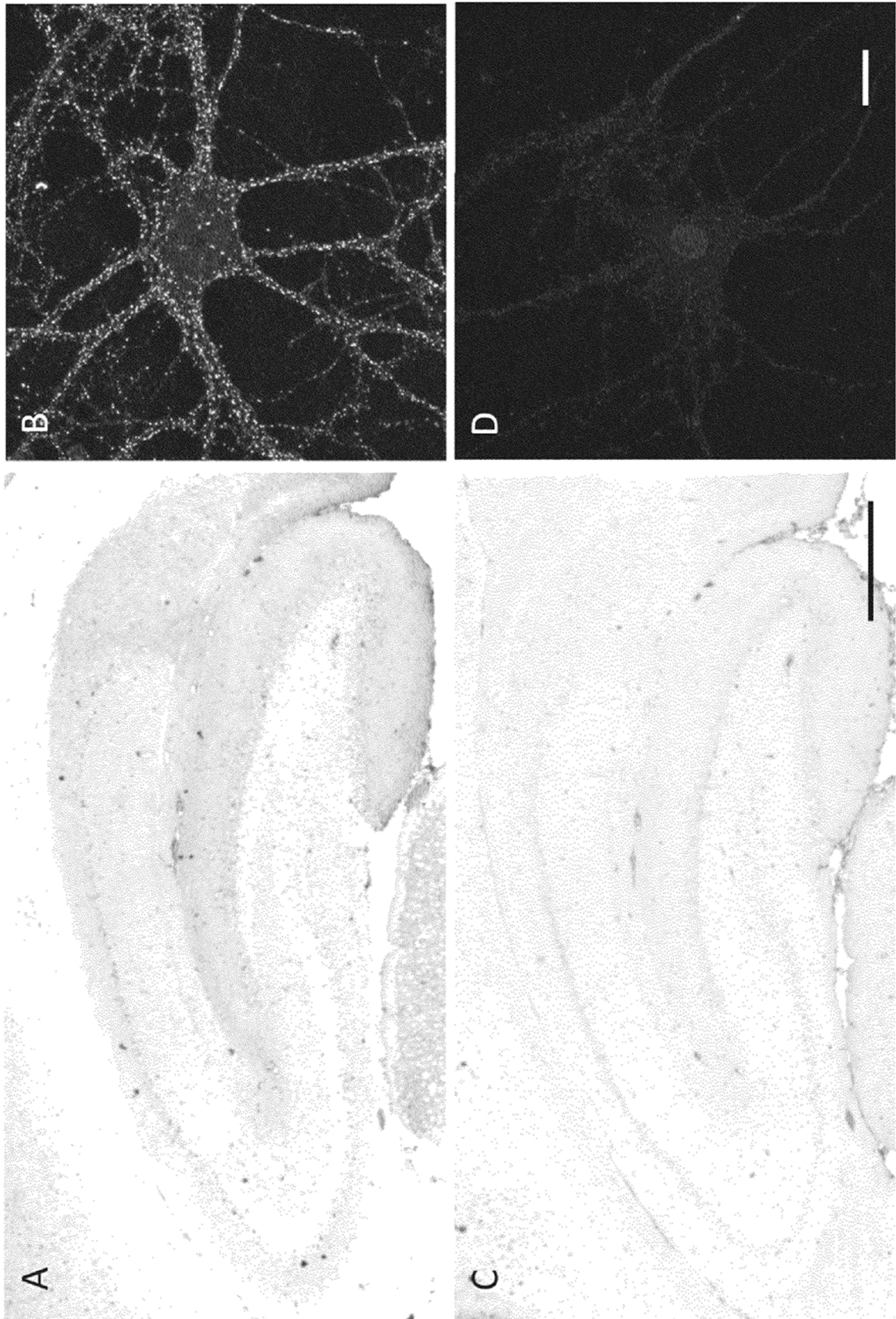


Figura 8

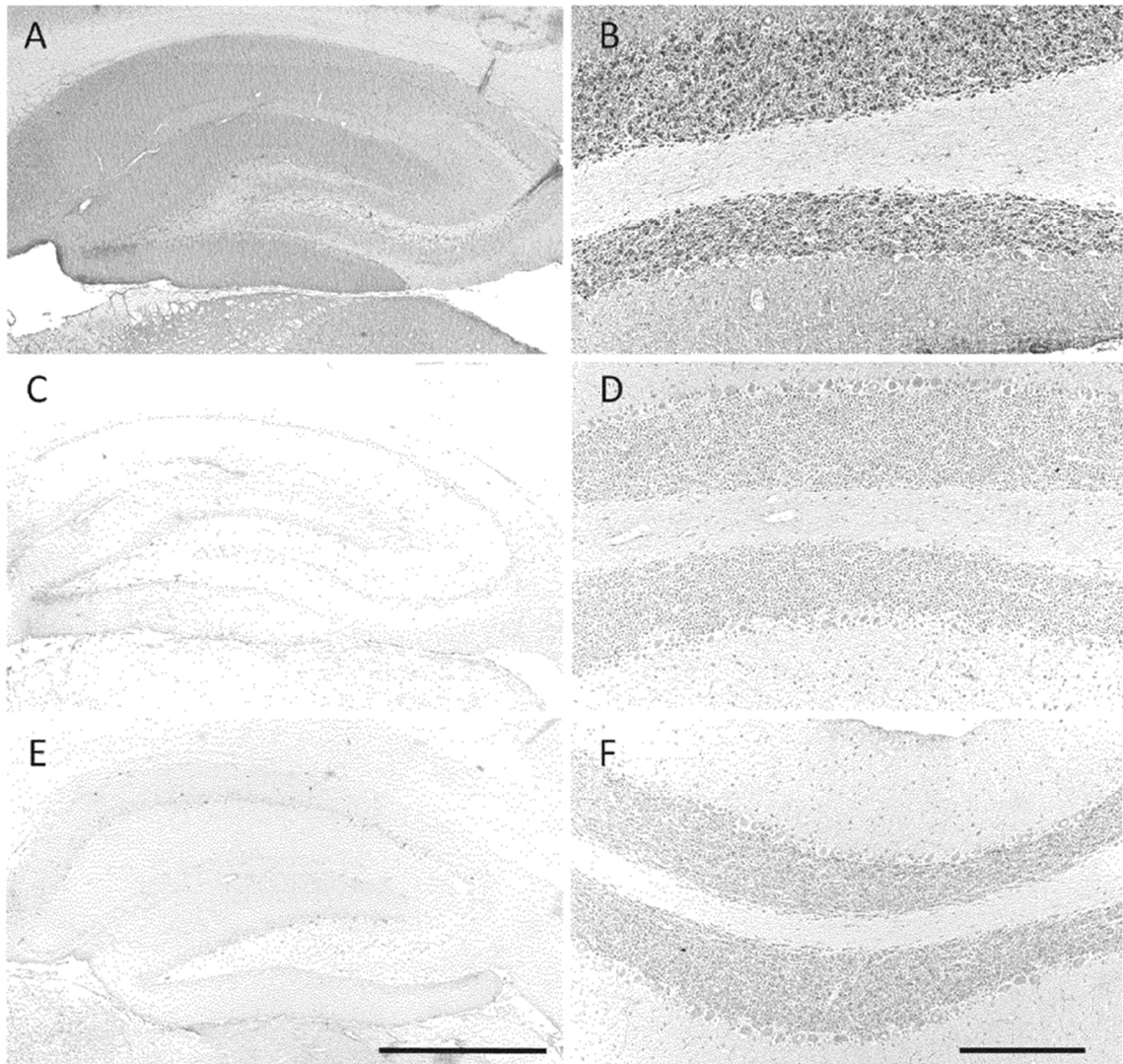


Figura 9

