

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 783**

21 Número de solicitud: 202030053

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

**G01N 33/564** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**23.01.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.07.2020**

71 Solicitantes:

**FUNDACION UNIVERSITARIA SAN PABLO - CEU  
(100.0%)**

**C/ Isaac Peral nº 58  
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**CRUZ SÁDABA, Maria ;  
MUÑOZ MORÓN, Úrsula ;  
ESCUADERO LIROLA, Esther ;  
QUINTANA, Francisco J y  
ROTHHAMMER, Veit Johanne**

74 Agente/Representante:

**FUENTES PALANCAR, José Julian**

54 Título: **ANTICUERPO SÉRICO IGM-PC COMO BIOMARCADOR DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE, Y NUEVA ELISA ULTRASENSIBLE PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESTA ENFERMEDAD**

57 Resumen:

Anticuerpo sérico IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) para ser utilizado como biomarcador de la esclerosis múltiple (EM) y de las diferentes fases de esta enfermedad, en especial de las fases tempranas CIS y EMRR, una vez constatado experimentalmente mediante una técnica ELISA adaptada, un nivel sorprendentemente alto de estos anticuerpos en las correspondientes fases de la EM respecto a los controles, que triplica el valor de cada grupo de cohorte, y que duplica el nivel de anticuerpos IgM-LC en suero de los mismos pacientes; y nueva técnica ELISA semicuantitativa desarrollada para la detección específica de dicho anticuerpo en muestras séricas de pacientes potenciales de la EM, como método de diagnóstico de alta sensibilidad y precisión.

23-01-2020

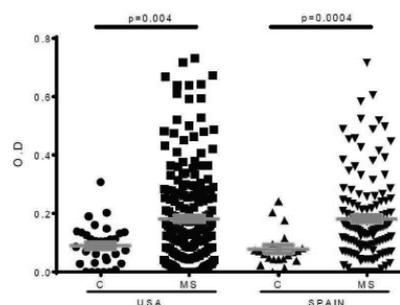


Figura 1

## DESCRIPCIÓN

### **Anticuerpo sérico IgM-PC como biomarcador de la esclerosis múltiple, y nueva ELISA ultrasensible para el diagnóstico de esta enfermedad**

5

El objeto de la presente invención abarca dos aspectos de especial relevancia en el diagnóstico diferencial de la esclerosis múltiple (EM): Por un lado, el anticuerpo sérico IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) para ser utilizado como biomarcador de la EM y de las diferentes fases de la enfermedad, en especial de las fases tempranas CIS y EMRR; y, por otro, la técnica ELISA semicuantitativa desarrollada para la detección específica de dicho anticuerpo en muestras séricas de pacientes potenciales de la EM, como método de diagnóstico de alta sensibilidad y precisión.

10

Conocido de diversos estudios experimentales que los lípidos, como componente principal de la capa de la mielina de las fibras nerviosas, son el principal objetivo de la respuesta autoinmune en la EM, y teniendo en cuenta el papel sugerido por los datos manejados para los anticuerpos IgG e IgM frente a los lípidos como biomarcadores en la EM, y los estudios recientes que revelan que la producción intratecal de IgG e IgM frente a lactosilceramida (LC) y fosfatidilcolina (PC) está estrechamente relacionada con la neurodegeneración característica de la EM, se ha realizado la cuantificación de anticuerpos IgG e IgM frente a dichos fosfolípidos en muestras de suero por una técnica ELISA adaptada, de alta sensibilidad, obteniéndose como resultado un nivel sorprendentemente alto de los anticuerpos séricos IgM-PC en pacientes con EM, que revelan además una asociación con los estadios CIS, RR, SP y PP de la enfermedad, especialmente para los dos primeros, sin detectar diferencias relevantes para el otro anticuerpo propuesto.

20

25

A partir de esta capacidad del anticuerpo sérico IgM-PC como biomarcador de la EM, se ha estandarizado la técnica ELISA aplicada para la detección de IgM-PC en muestras séricas de pacientes susceptibles de EM, con la sensibilidad y precisión demostrada, según una serie de etapas que incluyen parámetros y recursos de procedimiento que solventan los problemas inherentes a las técnicas inmunoquímicas de detección de anticuerpos en muestras de suero de pacientes con enfermedades autoinmunes, y que la convierten en un método de diagnóstico de la EM y subtipos de alta fiabilidad.

30

35

Por tanto, se tiene a disposición de la industria farmacéutica y hospitalaria, y de la comunidad científica en general, la IgM-PC como nuevo biomarcador sérico de la EM y

subtipos, y un nuevo método de diagnóstico de esta enfermedad tipo ELISA semicuantitativo para la detección de anticuerpos IgM-PC en sangre, de alta sensibilidad y precisión.

CAMPO DE APLICACIÓN.-

5

La presente invención puede encuadrarse en dos campos de investigación aplicada relacionados, según la perspectiva de la misma: Por un lado, dentro de la bioquímica, el de la identificación de anticuerpos séricos frente a lípidos en la esclerosis múltiple (EM) como potenciales biomarcadores para el diagnóstico de esta patología; y por otro, dentro de los ensayos inmunológicos, con sus materiales y métodos, el de las técnicas de enzimoimmunoanálisis tipo ELISA para la detección de anticuerpos frente a enfermedades autoinmunes, como técnicas de diagnóstico mejoradas de estas enfermedades.

10

ESTADO DE LA TECNICA.-

15

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante y neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC) que se inicia en la mayoría de los casos en la tercera y cuarta década de la vida, y por lo tanto supone un gran coste socioeconómico. Estos pacientes tienen un curso en brotes en la fase recurrente remitente (EMRR), que causan alteraciones motoras y sensoriales, pero al cabo de un periodo variable desarrollan la forma secundaria progresiva (EMSP) en la que la evolución es continua. Aproximadamente el 50% de los pacientes tarda mucho tiempo en desarrollar esta forma de la enfermedad pero el resto necesitarán una silla de ruedas tras 15 años de evolución. Un grupo minoritario de pacientes desarrolla la enfermedad en la sexta o séptima década de la vida y la progresión es continua desde el inicio, pero esta forma de la enfermedad, primaria progresiva (EMPP), se cree que en realidad es otra patología (Ref. bibliográfica 1).

20

25

No se conoce la etiología de la enfermedad aunque la teoría más aceptada es que se trata de una enfermedad autoinmune en la que los linfocitos B tendrían un papel principal (2-5).

30

Estudios histológicos realizados por el grupo de investigación y otros han demostrado la presencia de anticuerpos de clase IgG y de IgM en las lesiones alrededor de axones y de los oligodendrocitos que se asocian a factores de activación de complemento y macrófagos activados (6-8).

35

En este sentido, diversos ensayos clínicos en los que se ha ensayado tratamientos anti linfocitos B, como anticuerpos monoclonales anti-CD20 (rituximab, ocrelizumab, and ofatumumab), anti-CD19 (inebilizumab), y bloqueantes de la vía BAFF/APRIL (atacept,

belimumab, and LY2127399) han demostrado una gran eficacia (3, 5, 9, 10), lo que destaca la relevancia de las células B en la EM.

Tampoco existe hasta la fecha una prueba diagnóstica específica de la enfermedad, que se diagnostica en base a la caracterización de signos y síntomas clínicos compatibles con alteraciones de la sustancia blanca separados en tiempo y espacio junto los datos obtenidos con pruebas complementarias como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la detección de síntesis intratecal de IgG (SIIGG).

Los criterios diagnósticos basados en la resonancia magnética (11) han sido revisados a lo largo de estos últimos años (12) y se ha demostrado que tienen una sensibilidad del 80% y una especificidad del 70% (13), de modo que hay que aplicarlos con prudencia para evitar falsos diagnósticos (14). Para obtener esta sensibilidad además es necesario la inyección por vía intravenosa de gadolinio y, no menos importante, es una técnica cara, lo que contribuye al gran gasto socioeconómico que supone la EM (Fernández O. et al. 2017).

La técnica más sensible para analizar la presencia de SIIGG es la detección de bandas oligoclonales de IgG en líquido cefalorraquídeo (LCR) (15), basada en la realización de un isoelectroenfoque para separar las inmunoglobulinas presentes en muestras pareadas de suero y LCR y posteriormente un western blot, lo que es complejo y requiere de personal muy especializado para su interpretación. Por ello es difícilmente estandarizable y existe mucha variabilidad en la sensibilidad lograda entre laboratorios, variando entre el 91% a solamente el 69% (16). Además para el desarrollo de esta técnica se precisa de la realización de una punción lumbar para la obtención de la muestra de LCR, lo que conlleva una gran logística (médicos especialistas, sala de punción, material de punción...) y puede provocar al paciente intensas cefaleas e incluso daño neurológico y por ello no se realiza en países como EE.UU.

Debido a todas esta problemática se han intentado numerosos estudios en suero para detectar anticuerpos frente a proteínas del SNC. Por ejemplo, el documento de patente con número de publicación US2005064516-A1 hace referencia a diversas moléculas utilizadas como marcadores de la esclerosis múltiple, entre las que se encuentra la cadena  $\mu$  de la IgM, y en la reivindicación 3, se indica que la proteína puede aislarse de suero sanguíneo. Además, los análisis de los linfocitos B han demostrado que una relación entre los linfocitos B de sangre y en el sistema nervioso central (17-21). De hecho, anticuerpos aislados del suero de estos pacientes causan daño en los oligodendrocitos y mielina (22).

Se han detectado anticuerpos alrededor de la mielina, los oligodendrocitos y los axones, pero la contribución relativa de las células B en sangre y en el SNC a la producción de estos anticuerpos aún no está clara (23). Sin embargo, es conocido que uno de los distintivos de la EM es la presencia de síntesis intratecal de IgG en más del 90% de los pacientes (24). De hecho, la relevancia de las bandas oligoclonales (OCB) se ha reforzado en los criterios diagnósticos recientes de la EM (25). La alta prevalencia de anticuerpos y OCB en el SNC de pacientes con EM ha motivado múltiples estudios para identificar antígenos dirigidos por la respuesta de anticuerpos en la EM, los cuales han concluido con que los lípidos, como componentes principales de la capa de mielina de las fibras nerviosas, son el principal objetivo de la respuesta autoinmune en la EM (26).

Se han detectado anticuerpos en suero frente a gangliosidos y cerebrósidos, componentes fundamentales de los axones y mielina (27,28). Los datos se indizan en el trabajo de Antel J, Bar-Or A. (27), y muestran que los anticuerpos frente a gangliósidos en suero se han detectado entre el 50% y 13% de los pacientes con EM analizados y en casi un 40% de pacientes con otras autoinmunes.

Las últimas técnicas de microarrays han confirmado que existe un aumento de los niveles de anticuerpos frente a lípidos en el suero de estos pacientes, que también se asocian con distintos tipos de la enfermedad (29). El análisis de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante estas técnicas arrays detectó anticuerpos frente a los lípidos en el LCR de pacientes con EM (30, 31). De hecho, los anticuerpos IgG contra sulfatidos, gangliósido GM4 y galactocerebrosida se han detectado en múltiples estudios (32-35) y se ha demostrado que empeoran la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo experimental de EM (30). Asimismo cabe destacar que la detección de IgM en el LCR frente a fosfatidilcolina (PC) se asocia a un curso de enfermedad más grave en la EM (32, 33, 36-38), y los anticuerpos IgG contra la lactosilceramida (LC) en suero también se asocian con daño al tejido cerebral en pacientes con EM (39).

Por estos motivos, la producción intratecal de anticuerpos IgM y IgG frente a fosfatidilcolina (PC) y la lactosilceramida (LC) se ha relacionado recientemente con la actividad de la enfermedad y la neurodegeneración, lo cual sugiere un papel potencial para dichos anticuerpos frente a los correspondientes lípidos como biomarcadores en la EM.

En vista de ello, el trabajo que ha dado lugar a la presente invención ha tenido como primer objetivo la detección y cuantificación de anticuerpos IgG e IgM frente a LC y PC en muestras de suero de pacientes con EM, para lo cual ha sido necesario recurrir a una técnica ELISA

mejorada, de alta sensibilidad, que resuelva los problemas asociados al manejo de lípidos y a la baja afinidad y concentración de dichos anticuerpos en sangre, puestos de manifiesto por ejemplo en estudios como el de Jurewicz et al. (40), en los que se ha visto mediante ELISA aumento de anticuerpos de clase IgM frente a colesterol, pero sin que se llegue a demostrar su papel como biomarcador diagnóstico, tal y como se señala el en el apartado forma de realización en la comparativa de resultados con los de la técnica mejorada (**Figuras 1 y 2**).

Otro antecedente destacable es el del trabajo de Carlos J. Bidot et al. (41), en el que se aplica la técnica ELISA en la detección de anticuerpos IgM e IgG en pacientes en diferentes estadios de EM usando un panel de varios antígenos fosfolípidos, entre ellas fosfatidilcolina (PC), si bien IgM-PC no aparece como marcador fosfolípido único, sino como marcador a seleccionar entre un conjunto de seis dianas, y al igual que ocurre con el caso anterior, la técnica no permite obtener resultados demostrativos de una capacidad de biomarcador diagnóstico, ni para ese ni para los otros posible marcadores; el trabajo tiene más bien como objetivo valorar las características de neuroimagen en pacientes de MS con anticuerpos antifosfolípidos en plasma.

En cambio, con la nueva ELISA adaptada se ha constatado, según los resultados experimentales que se exponen a continuación dentro del compendio de la invención, que los anticuerpos IgM séricos frente a PC (IgM-PC) están sorprendentemente elevados en pacientes con EM, y que existe además una asociación con el estadio de la enfermedad: los pacientes con CIS y RRMS exhiben niveles más altos de IgM-PC que SPMS, PPMS y BENMS, sin que, por el contrario, se hayan detectado diferencias significativas en los anticuerpos IgG séricos frente a PC (IgG-PC), ni IgM o IgG frente a LC (IgM-LC e IgG-LC, respectivamente) entre los pacientes con EM y los controles, lo cual revela a los anticuerpos séricos IgM-PC como biomarcadores diagnósticos de la esclerosis múltiple y de las diferentes fases de esta patología.

Comparando la técnica ELISA ultrasensible desarrollada para el indicado objetivo con trabajos anteriores, cabe destacar las siguientes diferencias que han posibilitado el haber seleccionado con éxito a IgM-PC sérico como biomarcador diagnóstico de la EM:

1º Especificidad en su aplicación: A diferencia de anteriores aplicaciones de ELISA dirigidas al análisis de diferentes antígenos (gangliósidos, cerebrósidos, lactosilceramida, colesterol), con la ELISA implementada se ha analizado por primera vez la presencia en suero de anticuerpos IgM frente a fosfatidilcolina.

2° Alta sensibilidad: En el referido trabajo de Jurewicz et al., por ejemplo, se tienen que aislar los anticuerpos, y aun así se puede observar que las lecturas obtenidas no llegan a 0.15 O.D., cuando con el nuevo procedimiento se tienen lecturas de hasta 0.8, que están en el límite alto de la técnica ELISA, lo que indica una capacidad de detección de cantidades muy bajas de anticuerpos frente a lípidos.

3° Alta precisión en el diagnóstico de la EM: La sensibilidad obtenida en los estudios realizados previamente no alcanza el 50%, mientras que ahora, después de analizar más de 350 sueros de pacientes se ha podido comprobar que aproximadamente el 90% de los pacientes en primer brote o con la forma secundaria progresiva de la enfermedad presentan anticuerpos IgM frente a PC en suero, lo que supone el biomarcador más preciso descrito hasta la fecha para el diagnóstico de la EM.

Esto ha sido posible porque se han superado los principales impedimentos que hasta ahora han hecho difícil la estandarización y la interpretación de las ELISAS similares existentes, como son: la defectuosa pegada del lípido a la placa, que se ha solucionado ajustando concentración y solvente; el bloqueo, evitado utilizando una solución que no se une a los lípidos, a diferencia de las usadas clásicamente; el riesgo de solubilización de los lípidos, minimizado mediante lavando en frío; o la baja afinidad y concentración de anticuerpos en sangre, corregida mediante una amplificación de la señal usando un sistema biotina-streptavidina y TMBone como sustrato, todo ello para dar lugar a la nueva técnica semicuantitativa en trece pasos, específica para el marcador propuesto, que se explica en el siguiente apartado en detalle.

Sobre inmunoensayos tipo ELISA son conocidos diversos documentos de patentes que, como es previsible, aplican alguna de las etapas del método propuesto para la detección de otras moléculas, en algún caso similares (IgG, Igs en general), aunque no se tiene constancia de ninguno aplicado específicamente a la IgM-PC. Entre estas patentes son reseñables la norteamericana US2007020691-A1, que describe un método de diagnóstico de MS o una enfermedad desmielinizante, que utiliza, entre otras posibilidades, una técnica ELISA para lípidos, recubriendo placas de inmunoensayo con gangliósidos y cardiolipina, bloqueando con diluyente de ensayo y detectando el anticuerpo (IgG) conjugado con HRP; y la patente japonesa JPH06148193A, referida a un vehículo para unir un anticuerpo anti-fosfolípido, usado para diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias, así como un método de inmunoensayo que usa dicho vehículo, método que presenta algunas partes similares al desarrollado, aunque no sea para IgM, como la utilización de metanol y evaporación para ligar el anticuerpo a la placa.

Sin embargo, no se conoce ningún procedimiento inmunoquímico que combine todas las etapas de la secuencia que se propone de invención, ni que aplique todos los recursos y condiciones específicas en que se realiza, que influyen en la alta selectividad y precisión conseguida, y que posibilitan su estandarización.

5

#### COMPENDIO DE LA INVENCION.-

A la vista del estado de la técnica anterior, la determinación de los niveles de IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) y frente lactosilceramida (IgM-LC) mediante el nuevo ELISA  
 10 semicuantitativo implementado en muestras de suero de pacientes con esclerosis múltiple (EM) y en controles en cohortes de EE.UU y España, con los resultados reflejados en los gráficos de las **Figuras 1 y 3**, convierten al anticuerpo sérico IgM-PC en biomarcador para la EM, y como tal se reivindica de invención, ya que se consigue un incremento en el nivel de anticuerpos IgM-PC en suero de pacientes con esta enfermedad de hasta 0.8 de O.D  
 15 (Densidad Óptica media), con índices de reactividad  $P=0.004$  y  $P=0.0004$  respecto a los controles, que triplica el valor de cada grupo de cohorte (figura 1), y que duplica el nivel de anticuerpos IgM-LC en suero de los mismos pacientes (figura 2), lo que supone un impresionante aumento de los anticuerpos séricos IgM-PC detectados en pacientes con EM.

20 Asimismo, la detección de diferentes niveles en suero de IgM-PC en pacientes con síndrome clínico aislado (CIS), esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), secundaria progresiva (EMSP), primaria progresiva (EMPP) y benigna (BEN), en comparación con los controles, según los resultados reflejados en la Figura 3, confieren al anticuerpo sérico IgM-PC la capacidad de asociarse con el curso y subtipo de la EM, y le convierten en biomarcador de  
 25 las diferentes fases de la enfermedad, lo cual supone también una novedad destacable. En concreto, tras el ensayo ELISA semicuantitativo realizado se obtienen aumentos en el nivel de anticuerpos IgM-PC en sueros de pacientes CIS, EMRR, EMSP y EMPP primaria, en torno a 0.3, 0.25, 0.2 y 0.15 respectivamente, frente a un aumento de este anticuerpo en torno a 0.05 para el grupo de cohorte (gráfico de la **Figura 4**), traducidos en un porcentaje  
 30 de sueros positivos de 88.2%, 88.7%, 58.0% y 59.5% respectivamente, frente a un 25.0% para el grupo de cohorte.

Los niveles más elevados de anticuerpos IgM-PC en el suero de pacientes durante la fase CIS y EMRR de la enfermedad implican que el suero IgM-PC sea un biomarcador idóneo  
 35 para el diagnóstico temprano de la EM.

Todo lo cual justifica el uso de la IgM-PC sérica como biomarcador para la EM, solo o en combinación con otros agentes, en la preparación de composiciones y sistemas de detección comerciales para el diagnóstico diferencial mediante técnicas inmunoquímicas de esta enfermedad y de sus diferentes estadios, de síndrome clínico aislado (CIS), esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), secundaria progresiva (EMSP), primaria progresiva (EMPP) y benigna (BEN), particularmente importante para las fases tempranas de CIS y EMRR, y no solo por el método ELISA ultrasensible adaptado para la detección específica de dicho anticuerpo, sino por cualquier otra técnica inmunoquímica que en el futuro pueda desarrollarse con éxito para tal fin.

10

En este sentido, la técnica ELISA semicuantitativa desarrollada para la detección específica del anticuerpo IgM-PC en muestras séricas de pacientes potenciales de EM resulta idónea como método de diagnóstico de la enfermedad, por su comentada alta sensibilidad y precisión frente a las ELISAS similares existentes, por lo que también es reivindicada de invención.

15

Esto ha sido posible porque se han solventado los problemas inherentes a este tipo de analítica, de la siguiente manera:

20 Baja solubilidad de los lípidos en solventes acuosos y dificultad de pegada a la placa de ELISA:

- Se usa como diluyente de los lípidos ensayados metanol.

25 Baja unión de los lípidos a la placa microtiter de ELISA:

- Se usan placas Greiner high-binding que tienen una alta capacidad de unir diferentes moléculas.

30 • Se incuban las placas durante toda la noche a 4° hasta la completa evaporación del metanol para permitir la pegada del lípido a la placa microtiter).

- Para evitar que el lípido se despegue de la placa se usa como solución de lavado PBS (solución salina fisiológica tamponada con fosfato pH 7,2 a 4° C.

35

Las soluciones de bloqueo clásicas se unen a los lípidos y con ello impiden la unión de los anticuerpos específicos de estos antígenos presentes en las muestras analizadas:

- La albúmina y otras proteínas similares se usan para bloquear los sitios que quedan libres en la placa microtiter tras la pegada del lípido y así evitar la pegada inespecífica de los anticuerpos presentes en suero a la placa, y con ello lecturas erróneas.

5

- Estas proteínas que se usan clásicamente en la técnica de ELISA son transportadores de lípidos, y por ello se unen a los lípidos que se han pegado con anterioridad a la placa microtiter, impidiendo que los anticuerpos frente a lípidos presentes en el suero se puedan unir a ellos.

10

- Para evitar este bloqueo de la unión antígeno-anticuerpo se utiliza una solución de bloqueo que no se une a los lípidos: SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific).

15 Baja afinidad de los anticuerpos frente a los antígenos lipídicos y baja concentración en suero de los mismos:

- Se emplea un sistema de amplificación de la señal basado en el uso de un anticuerpo secundario anti IgM Humano, anti human IgM biotinilado (Jackson ImmunoResearch), seguido de streptavidina-peroxidasa, y en el uso como sustrato de 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific™), que es el de mayor sensibilidad existente hasta la fecha. La biotina une unas 12 streptavidinas y por lo tanto cada anticuerpo IgM de suero que se una al lípido fijará 12 peroxidases, que oxidan su sustrato y así se obtiene la señal amplificada.

25

La nueva técnica ELISA ultrasensible diseñada para la detección específica de anticuerpos séricos IgM-PC consta de las siguientes etapas que incluyen los parámetros y recursos de procedimiento indicados:

30

1) Añadir fosfatidilcolina (Merck) 1 µg/pocillo diluida en 100 microlitros de metanol como diluyente en placas microtiter Greiner High-Binding (Greiner), de lata capacidad de unión molecular:

35

2) Incubar las placas durante toda la noche a 4° C hasta la completa evaporación del metanol para asegurar la pegada del lípido a la placa;

## ES 2 768 783 A1

3) Lavar 5 veces con 250 µl/pocillo de suero fisiológico tamponado con fosfato pH=7,2 a 4°C, con lo que evita que el lípido se despegue de la placa;

4) Añadir 200 µl de la solución de SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer ThermoFisher) (BF), como solución específica de bloqueo, e incubar 2 horas.

5) Repetir etapa 3.

6) Añadir las muestras a dilución 1/100 en BF e incubar 2 horas a temperatura ambiente.

7) Repetir etapa 3.

8) Añadir 100 µl de anti human IgM biotilado (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/20.000 en BF, como anticuerpo secundario para la amplificación de la señal, e incubar 2 horas a temperatura ambiente.

9) Repetir etapa 3.

10) Añadir 100 µl de streptavidin-peroxidase (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/1.000 en BF e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

11) Repetir etapa 3.

12) Añadir 100 µl del sustrato 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific™) e incubar 5 minutos.

13) Añadir 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido al 5% en agua destilada para cortar la reacción y leer la placa en un espectrofotómetro a 450 nm.

Esta técnica ultrasensible ha demostrado por primera vez la presencia de un biomarcador en sangre para el diagnóstico temprano de la EM, lo que es de gran relevancia clínica puesto que cuanto antes se comience el tratamiento de la enfermedad mejor es la su evolución. Además supone la ventaja respecto a los métodos de diagnóstico existentes de que no se analiza líquido LCR, reduciéndose los protocolos y el tiempo del paciente en el hospital, que no sufre efectos secundarios derivados del procedimiento.

Metodológicamente también tiene ventajas con respecto a las existentes. Es cuantitativa y por ello objetiva y aunque el protocolo se ha desarrollado manualmente, se puede automatizar, lo que permitiría maximizar recursos y reducir costes, además de hacer que sea estandarizable y reproducible en cualquier laboratorio.

5

En definitiva, es una técnica que se podrá implantar en laboratorios de diagnóstico clínico hospitalarios o extra hospitalarios a nivel mundial.

#### FIGURAS Y GRAFICOS.-

10

Al final de la presente memoria descriptiva se presentan las siguientes figuras con gráficos que reflejan los resultados de los ensayos realizados con el nuevo ELISA semicuantitativo en pacientes con EM para la determinación de los niveles de IgM-PC y IgM-LC, incluyendo a efectos comparativos, el gráfico resultante del análisis de Jurewicz et al. para IgM frente a

15

colesterol:

**Figura 1:** Gráficos de niveles de IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) en muestras séricas de pacientes de USA y España con EM y controles.

20

**Figura 2:** Gráfico de niveles de IgM frente a colesterol en el ensayo realizado por Jurewicz et al. mediante ELISA convencional.

**Figura 3:** Gráficos de niveles de IgM frente a lactosilceramida (IgM-LC) en muestras de suero de pacientes de USA y España con EM y controles.

25

**Figura 4:** Gráfico de niveles séricos de IgM-PC en pacientes con diferentes fases de la EM: CIS, RR, SP, PP y BEN, y grupo control C.

30

**Figura 5:** Gráfico de niveles séricos de IgM-LC en pacientes con diferentes fases de la EM: CIS, RR, SP, PP y BEN, y grupo control C.

Los gráficos de estas figuras se comentan en el siguiente apartado, de descripción de la forma de llevar a cabo la invención.

35

#### FORMA DE REALIZACIÓN.-

Se ha analizado la presencia de anticuerpos séricos IgG e IgM frente a lactosilceramida (LC) y fosfatidilcolina (PC) con la nueva técnica semicuantitativa ultrasensible desarrollada.

**1. Materiales y Métodos.-**

5

**1.1. Muestras de suero.-**

Se recogieron muestras de sangre periférica de 362 pacientes con EM y 80 pacientes sin enfermedades neurológicas (grupo control). Las muestras de suero se alicuotaron y almacenaron a -80 ° C hasta que se analizaron.

10

Las muestras se obtuvieron de la Investigación Longitudinal Integral de Esclerosis Múltiple (CLIMB, Boston, MA) y EPIC (San Francisco, CA), como parte del consorcio SUMMIT y del Servicio de Neurología del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla, España). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para su participación en el estudio. Los pacientes estaban libres de recaídas en el momento de la toma de muestras de sangre. y se clasificaron como síndrome clínicamente aislado (CIS, n = 17), EM remitente recurrente (EMRR, n = 62), EM secundaria progresiva (EMSP, n = 50), MS progresiva primaria (EMPP, n = 37) y EM benigna (BENMS, n = 36).

15

20

Los datos clínicos y demográficos de los pacientes con EM y grupo control se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

25

FIGURA	COHORTS	MUJERES	EDAD	DURACIÓN ENFERMEDAD	ÍNDICE EDSS	TRATAMIENTO
1, 3	Controles (80) USA (60) España (20)	47 (78,3%) 17 (85%)	44 (25-63) 58 (28-88)			0 (0%)
	EM (362) USA (235) España (127)	246 (70,7%) 173 (73,6%) 73 (57,5%)	48 (19-92) 47 (19-92) 49 (19-77)	13 (0-57) 13 (0-51) 15 (2-57)	3,0 (0-9) 2,2 (0-9) 4,4 (0-9)	120 (33%) 113 (48%) 7 (6%)
4, 5	CIS (17)	10 (58.8%)	44 (19-76)	10 (2-36)	1.9 (0-6)	0 (0%)
	RR (63)	43 (70.5%)	49 (23-92)	15 (2-56)	2.0 (0-7)	4 (6%)
	SP (50)	31 (62.0%)	59 (37-79)	22 (8-57)	6.4 (3-9)	7 (14%)
	PP (37)	18 (48.6%)	54 (31-75)	12 (4-27)	6.0 (2-9)	0 (0%)
	BENIGN (36)	20 (55.6%)	48 (34-61)	22 (4-42)	2,7 (0-8)	6 (17%)
	Control (80)	64 (80%)	48 (25-88)			0 (0%)

En esta tabla los campos “Mujeres” indica el número de casos analizados y porcentaje en el grupo, “Edad” la duración de la enfermedad y escala de estado de discapacidad expandida (EDSS): media, mínima y máxima; y “Tratamiento” el número y porcentaje de pacientes tratados.

5

Las muestras de los pacientes cuyos resultados de análisis se plasman en la **Figura 1** fueron tratadas con IFN, acetato de glatiramer y natalizumab. El tratamiento empleado para las muestras de pacientes con la forma remitente recurrente (RR) fue interferón beta (IFN); las de los pacientes con la forma secundaria progresiva (SP) fueron tratados con IFN, acetato de glatiramer y natalizumab, y los pacientes con la forma benigna fueron tratados con IFN y natalizumab. Primaria progresiva (PP) no fueron tratadas.

10

### 1.2. Ensayo ELISA.-

Para detectar anticuerpos IgG e IgM frente a la lactosilceramida (LC) y la fosfatidilcolina (PC), las placas de 96 pocillos se incubaron con el antígeno correspondiente. Las placas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con solución de bloqueo. Las muestras de suero se diluyeron en solución de bloqueo y se pipetearon en los pocillos.

20

Los anticuerpos unidos a los antígenos se detectaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Jackson Immunoresearch), seguidos de avidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich). Finalmente, se usó TMBone (Kementec) como sustrato. Las placas se leyeron a 450 nm utilizando un espectrofotómetro Infinite® 200 PRO (instrumento Tecan). Las muestras de suero se clasificaron como positivas cuando la O.D era mayor que la media  $\pm$  2xSEM (error estándar de la media) del grupo de control.

25

### 1.3. Estadística.-

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism (versión 6.0). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones entre más de dos grupos. Para analizar el porcentaje de individuos que mostraban anticuerpos contra los lípidos, se utilizó la prueba de Fisher para las comparaciones entre los pacientes con EM y el grupo de control, y la prueba de Chi-cuadrado de Pearson para las comparaciones entre los diferentes tipos de EM.

35

## 2. Resultados.-

Dos resultados relevantes:

- 5 Primero.- Aumento en suero de anticuerpos IgM frente a fosfatidilcolina en los pacientes con EM:

10 Anomalías en el metabolismo de los esfingolípidos se han descrito en la EM (42-44). Además, los anticuerpos contra los lípidos se detectan en pacientes con EMSP y se correlacionan con marcadores de la progresión de la enfermedad, como la atrofia cerebral (30, 39, 45). Por lo tanto, inicialmente se analizaron los anticuerpos séricos IgG e IgM frente PC y LC en pacientes con EM y controles en cohortes independientes de los Estados Unidos de América (EE.UU.) y España. Se detectó una mayor reactividad de IgM frente a la fosfatidilcolina (IgM-PC) en muestras de suero de pacientes con EM tal y como se refleja en

15 la **Figura 1**. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas en los niveles séricos de IgM frente a lactosilceramida (IgM-LC) ni en los niveles de IgG frente a PC (IgG-PC) o LC (IgG-LC) entre los pacientes con EM y los controles, tal y como refleja la **Figura 3**.

Los gráficos de la **Figura 1** reflejan los niveles de IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) en

20 muestras séricas de pacientes con EM y controles, obtenidos mediante la técnica ELISA ultrasensible desarrollada. Los datos se presentan como la densidad óptica media (O.D)  $\pm$  SEM (error estándar de la media), pudiéndose observar que los pacientes con EM tienen niveles muy superiores de anticuerpos de IgM frente a fosfatidilcolina que los controles en ambas cortes obteniéndose valores de hasta 0.8 O.D.

25

La eficacia de la nueva técnica queda puesta de manifiesto cuando se comparan los resultados con los del gráfico de la **Figura 2**, del análisis de la presencia de anticuerpos de IgM sérico frente a colesterol en paciente con EM realizado por Jurewicz et al. mediante ELISA convencional, en los que si bien se observa que los pacientes con EM tienen más

30 anticuerpos frente a dicho antígeno, se obtienen valores en todos los casos que no superan el nivel de 0.2 O.D., que es insuficiente para una función de IgM-Colesterol como biomarcador de la EM.

Y también frente a los gráficos de la **Figura 3**, que reflejan los niveles de IgM frente a lactosilceramida (IgM-LC) en muestras de suero de pacientes con EM y grupo de control (C) (NS: no significativo), donde los valores de O.D. están a la mitad que el caso de IgM-PC.

35

Segundo.- Los anticuerpos IgM-PC están asociados con el curso y el subtipo de la enfermedad:

Se cree que la progresión de la EM implica un cambio en el proceso inflamatorio que pasaría de estar mediado por células inmunitarias periféricas a ser provocado por células residentes en el SNC (46, 47). Por lo tanto, se analizó la presencia en suero de IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) en pacientes con diferentes fases de la enfermedad, detectándose niveles séricos más altos de IgM-PC en pacientes con síndrome clínico aislado (CIS), esclerosis múltiple remitente recurrente (RR), secundaria progresiva (SP), primaria progresiva (PP) en comparación con los controles (C), tal y como queda reflejado en la **Figura 4**, en la que los datos se presentan como la densidad óptica media (O.D)  $\pm$  SEM (error estándar de la media). NS: no significativo. Además, los pacientes clasificados como CIS y EMRR muestran niveles séricos de anticuerpos IgM-PC más altos que los EMSP y los EMPP, según queda también constatado por los porcentajes de sueros positivos para IgM-PC en pacientes con EM y grupo control mostrados en la Tabla 2. No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de IgM-PC entre las muestras de pacientes con CIS y EMRR, ni entre las de pacientes con EMSP y EMPP.

Adicionalmente, no se detectaron diferencias en los niveles séricos de IgM-LC cuando se analizaron las muestras de diferentes subtipos de EM, tal y como reflejan los gráficos de la **Figura 5** y los porcentaje de sueros positivos para IgM-LC en pacientes con EM y grupo control mostrados en la Tabla 2. Tampoco se detectaron diferencias en los niveles séricos de IgG-LC o IgG-PC.

La Tabla 2 muestra los porcentajes de sueros positivos para IgM-PC y IgM-LC en pacientes con diferentes subtipos de EM y grupo control.

**Tabla 2.**

	CIS	RR	SP	PP	BEN	CONTROL
IgM-PC	15 (88,2%)	55 (88,7%)	29 (58,0%)	22 (59,5%)	4 (11,1%)	13 (25,0%)
IgM-LC	5 (29,4%)	4 (6,5%)	10 (20,0%)	6 (16,2%)	3 (8,3%)	7 (13,5%)
IgM-LIP	16 (94,1%)	55 (88,7%)	29 (58,0%)	23 (62,2%)	7 (19,4%)	16 (30,8%)

30

En esta tabla, IgM-PC: Sueros positivos para IgM-PC; IgM-LC: Sueros positivos para IgM-LC; IgM-LIP: Sueros positivos para IgM-PC o IgM-LC; CIS: síndrome clínicamente aislado; RR: remisión-remisión; SP: secundaria progresiva; PP: primaria progresiva; BEN: benigno; PC: fosfatidilcolina; LC: lactosilceramida; LIP: lípidos.

5

### 3. Discusión de los resultados.-

La síntesis intratecal de IgG se detecta en la mayoría de los pacientes con EM (24) y más del 60% de estos pacientes presentan IgM con LCR reactivo a los lípidos (32). De hecho, la  
 10 detección de OCM de IgM reactivos a los lípidos en el LCR se considera un marcador de mal pronóstico en la EM (36-38). En suero de pacientes con EM también se han detectado anticuerpos IgG e IgM frente a proteínas de la mielina (48, 49). Sin embargo, la detección de anticuerpos reactivos a los lípidos es complicada debido a problemas técnicos relacionados con la solubilidad del antígeno, la accesibilidad de los grupos reactivos y el requerimiento de  
 15 lípidos auxiliares (50, 51). En el trabajo realizado se describe una nueva técnica para el análisis en pacientes con EM de anticuerpos séricos frente a PC y LC. Usando este ensayo, se han detectado niveles aumentados de IgM-PC en muestras de suero de pacientes con EM, sin haberse encontrado diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes con EM cuando se analizó la presencia de IgM-LC, lo que corrobora los estudios previos,  
 20 desarrollados mediante arrays de proteínas, en las que tampoco se observó un aumento de anticuerpos IgM en suero frente a LC en pacientes con EM (39).

La presencia en sangre de células B específicas de antígenos del sistema nervioso central se ha relacionado con la aparición de recaídas (52). Además, las terapias dirigidas a las  
 25 células B reducen la progresión de la enfermedad (53). En la investigación que ha dado lugar a la presente solicitud de patente se han detectado niveles séricos más altos de IgM-PC en pacientes con CIS y RRMS que SPMS y PPMS, lo que sugiere que la IgM-PC sérica refleja el desarrollo del proceso inflamatorio y la destrucción de la mielina provocada por la activación linfocitos B de sangre periférica. Además, estos datos están en la línea de  
 30 estudios previos, en los que se ha observado una disminución en la respuesta inmune humoral y un papel predominante para los mecanismos intrínsecos del SNC durante la fase progresiva de la EM (46, 54). De hecho, anteriormente describimos que las OCB de IgM frente a lípidos en el LCR persisten durante el curso de la enfermedad (36), y también detectamos los anticuerpos IgM e IgG depositados en los axones y oligodendrocitos en las  
 35 muestras MS CNS (55), lo que sugiere que estos anticuerpos se producen localmente en el SNC, probablemente en estructuras similares a folículos detectables en las meninges (56-59). Aunque se ha demostrado que algunos anticuerpos reactivos a los lípidos albergan

actividades patógenas (30), aún no está claro si los anticuerpos IgM-PC albergan actividad patogénica directa sobre la mielina, que además podría provocar la liberación de lípidos bioactivos (8, 45, 60, 61), y/o son simplemente subproductos del proceso inflamatorio que tienen un papel como biomarcador diagnóstico (31, 34, 39, 61).

5

En resumen, todos estos datos indican que la detección de la IgM-PC sérica es al menos un marcador diagnóstico de la enfermedad y además puede complementar otro marcador pronóstico, como la detección de anticuerpos en muestras de líquido cefalorraquídeo (38).

- 10 La IgM frente a PC forma parte del repertorio de anticuerpos naturales, que proporciona protección contra múltiples patógenos (62-64). Los autoanticuerpos naturales se producen por las células B-1, que son T independientes (65, 66) y, por lo general, no experimentan un cambio de isotipo a IgG (67). El mecanismo implicado en la generación de anticuerpos naturales es la unión del antígeno específico al receptor de las células B (BCR), y también a
- 15 través de vías de estimulación adicionales de las células B (68). Se ha demostrado que la PC puede activar diversas vías de las células B (69, 70), y es posible que el daño de la mielina libere PC a sangre y en un contexto inflamatorio active a los linfocitos B-1 periféricos específicos de este antígeno a través del BCR y otras vías. De hecho, se ha observado aumento en suero de lípidos como GM1 y GD1a, componentes fundamentales de la mielina,
- 20 en pacientes con EMRR durante el primer brote (71). Además, el hallazgo fruto de la investigación realizada del aumento en suero de la IgM-PC sugiere una actividad exacerbada de las células B-1, que podrían ser un mecanismo fundamental en la patogenia de la EM (23), como se ha descrito en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o la púrpura trombocitopénica idiopática (72). De hecho, el número de células
- 25 B-1 en el líquido cefalorraquídeo se ha relacionado con un mal pronóstico en pacientes con EM (38).

En conclusión, los resultados obtenidos identifican los anticuerpos IgM-PC como biomarcadores diagnósticos de la EM, y sugieren un papel para las células B1 en la

30 patogénesis de la enfermedad. Estudios futuros deben extender estas observaciones a cohortes adicionales de pacientes, analizar el efecto de las terapias modificadoras de la enfermedad en los anticuerpos IgM-PC y el valor de las células B1 como dianas terapéuticas en la EM.

## BIBLIOGRAFIA.-

1. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000;343(13):938-952.
2. Blauth K, Owens GP, Bennett JL. The Ins and Outs of B Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2015;6:565.
- 5 3. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Front Immunol.* 2015;6:642.
4. Hohlfeld R, Dornmair K, Meinl E, Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *Lancet Neurol.* 2016;15(3):317-331
- 10 5. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS- Compartmentalized Inflammation. *Front Immunol.* 2015;6:636.
6. Sádaba MC, Tzartos J, Paíno C, et al. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol.* 2012;247(1-2):86-94.
7. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med.* 1999;5(2):170-175.
8. Metz I, Weigand SD, Popescu BF, et al. Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 2014;75(5):728-738.
- 15 9. Rahmanzadeh R, Weber MS, Brück W, Navardi S, Sahraian MA. B cells in multiple sclerosis therapy-A comprehensive review. *Acta Neurol Scand.* 2018;137(6):544-556.
10. Krumbholz M, Meinl E. B cells in MS and NMO: pathogenesis and therapy. *Semin Immunopathol.* 2014;36(3):339-350.
11. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001;50(1):121-127.
- 20 12. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011;69(2):292-302.
13. Villar LM, García-Barragán N, Sádaba MC, et al. Accuracy of CSF and MRI criteria for dissemination in space in the diagnosis of multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2008;266(1-2):34-37.
14. Mantero V, Abate L, Balgera R, La Mantia L, Salmaggi A. Clinical Application of 2017 McDonald Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis. *J Clin Neurol.* 2018;14(3):387-392.
- 25 15. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994;57(8):897-902.
16. Schäffler N, Köpke S, Winkler L, et al. Accuracy of diagnostic tests in multiple sclerosis--a systematic review. *Acta Neurol Scand.* 2011;124(3):151-164.
17. Beltrán E, Obermeier B, Moser M, et al. Intrathecal somatic hypermutation of IgM in multiple sclerosis and neuroinflammation. *Brain.* 2014;137(Pt 10):2703-2714.
18. Obermeier B, Lovato L, Mentele R, et al. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J Neuroimmunol.* 30 2011;233(1-2):245-248.
19. Bankoti J, Apeltsin L, Hauser SL, et al. In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. *Ann Neurol.* 2014;75(2):266-276.
20. Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC, et al. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med.* 2014;6(248):248ra106.
21. Stern JN, Yaari G, Vander Heiden JA, et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med.* 2014;6(248):248ra107.

22. Raine CS, Hummelgard A, Swanson E, Bornstein MB. Multiple sclerosis: serum-induced demyelination in vitro. A light and electron microscope study. *J Neurol Sci.* 1973;20(2):127-148.
23. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. 2018. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol.*
24. Sádaba MC, González Porqué P, Masjuan J, Alvarez-Cermeño JC, Bootello A, Villar LM. 2004. An ultrasensitive method for the detection of oligoclonal IgG bands. *J Immunol Methods* 284: 141-5.
25. Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, González-Porqué P, Plaza J, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. 2005. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol* 62: 574-7.
26. O'Brien JS, Sampson EL. 1965. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* 6: 545-51.
27. Antel J, Bar-Or A. Roles of immunoglobulins and B cells in multiple sclerosis: from pathogenesis to treatment. *J Neuroimmunol.* 2006;180(1-2):3-8.
28. Kasai N, Pachner AR, Yu RK. Anti-glycolipid antibodies and their immune complexes in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1986;75(1):33-42.
29. Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, et al. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(48):18889-18894.
30. Kanter JL, Narayana S, Ho PP, Catz I, Warren KG, Sobel RA, Steinman L, Robinson WH. 2006. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med* 12: 138-43.
31. Yeste A, Quintana FJ. 2013. Antigen microarrays for the study of autoimmune diseases. *Clin Chem* 59: 1036-44.
32. Brennan KM, Galban-Horcajo F, Rinaldi S, O'Leary CP, Goodyear CS, Kalna G, Arthur A, Elliot C, Barnett S, Linington C, Bennett JL, Owens GP, Willison HJ. 2011. Lipid arrays identify myelin-derived lipids and lipid complexes as prominent targets for oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 238: 87-95
33. Kasai N, Pachner AR, Yu RK. 1986. Anti-glycolipid antibodies and their immune complexes in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 75: 33-42
34. Quintana FJ, Patel B, Yeste A, Nyirenda M, Kenison J, Rahbari R, Fetco D, Hussain M, O'Mahony J, Magalhaes S, McGowan M, Johnson T, Rajasekharan S, Narayanan S, Arnold DL, Weiner HL, Banwell B, Bar-Or A, Network CPDD. 2014. Epitope spreading as an early pathogenic event in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 83: 2219-26
35. Quintana FJ, Yeste A, Weiner HL, Covacu R. 2012. Lipids and lipid-reactive antibodies as biomarkers for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 248: 53-7
36. Villar L, García-Barragán N, Espiño M, Roldán E, Sádaba M, Gómez-Rial J, González-Porqué P, Alvarez-Cermeño J. 2008. Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Mult Scler* 14: 183-7
37. Villar LM, Masterman T, Casanova B, Gómez-Rial J, Espiño M, Sádaba MC, González-Porqué P, Coret F, Alvarez-Cermeño JC. 2009. CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 211: 101-4
38. Villar LM, Sádaba MC, Roldán E, Masjuan J, González-Porqué P, Villarrubia N, Espiño M, García-Trujillo JA, Bootello A, Alvarez-Cermeño JC. 2005. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* 115: 187-94
39. Bakshi R, Yeste A, Patel B, Tauhid S, Tummala S, Rahbari R, Chu R, Regev K, Kivisakk P, Weiner HL, Quintana FJ. 2016. Serum lipid antibodies are associated with cerebral tissue damage in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 3: e200
40. Jurewicz A, Domowicz M, Galazka G, Raine CS, Selmaj K. Multiple sclerosis: Presence of serum antibodies to lipids and predominance of cholesterol recognition. *J Neurosci Res.* 2017;95(10):1984-1992.

41. Bidot CJ, Jy W, Horstman LL, Huang H, Jimenez JJ, Yaniz M, Ahn YS: Factor VII/VIII: A new antigen in the antiphospholipid antibody syndrome. *Br J Haematol.* 2003, 120: 618-626. 10.1046/j.1365-2141.2003.04161.x.
42. Vidaurre OG, Haines JD, Katz Sand I, Adula KP, Huynh JL, McGraw CA, Zhang F, Varghese M, Sotirchos E, Bhargava P, Bandaru VV, Pasinetti G, Zhang W, Inglese M, Calabresi PA, Wu G, Miller AE, Haughey NJ, Lublin FD, Casaccia P. 2014. Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics. *Brain* 137: 2271-86
43. Wheeler D, Bandaru VV, Calabresi PA, Nath A, Haughey NJ. 2008. A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 131: 3092-102
44. Cumings JN, Goodwin H. 1968. Sphingolipids and phospholipids of myelin in multiple sclerosis. *Lancet* 2: 664-5
45. Farez MF, Quintana FJ, Gandhi R, Izquierdo G, Lucas M, Weiner HL. 2009. Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE. *Nat Immunol* 10: 958-64
46. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. 2018. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97: 742-68
47. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. 2018. Multiple sclerosis. *The Lancet* 391: 1622-36
48. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M. 2003. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 349: 139-45
49. Cross AH, Trotter JL, Lyons J. 2001. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 112: 1-14
50. Jurewicz A, Domowicz M, Galazka G, Raine CS, Selmaj K. 2017. Multiple sclerosis: Presence of serum antibodies to lipids and predominance of cholesterol recognition. *J Neurosci Res* 95: 1984-92
51. Ravindranath MH, Muthugounder S, Saravanan TS, Presser N, Morton DL. 2005. Human antiganglioside autoantibodies: validation of ELISA. *Ann N Y Acad Sci* 1050: 229-42
52. Hohmann C, Milles B, Schinke M, Schroeter M, Ulzheimer J, Kraft P, Kleinschnitz C, Lehmann PV, Kuerten S. 2014. Categorization of multiple sclerosis relapse subtypes by B cell profiling in the blood. *Acta Neuropathol Commun* 2: 138
53. Sabatino JJ, Jr., Zamvil SS, Hauser SL. 2018. B-Cell Therapies in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*
54. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. 2018. Multiple sclerosis. *Lancet* 391: 1622-36
55. Sádaba MC, Tzartos J, Paíno C, García-Villanueva M, Alvarez-Cermeño JC, Villar LM, Esiri MM. 2012. Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol* 247: 86-94
56. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 2007;130(Pt 4):1089-1104.
57. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14: 164-74
58. Zurawski J, Lassmann H, Bakshi R. 2017. Use of Magnetic Resonance Imaging to Visualize Leptomeningeal Inflammation in Patients With Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA Neurol* 74: 100-9
59. Zurawski J, Tauhid S, Chu R, Khalid F, Healy BC, Weiner HL, Bakshi R. 2018. Leptomeningeal enhancement in the brain on 7T MRI scans is common and is associated with cortical lesions in relapsing-remitting multiple sclerosis. Presented atECTRIMS, Berlin
60. Mayo L, Trauger SA, Blain M, Nadeau M, Patel B, Alvarez JI, Mascanfroni ID, Yeste A, Kivisakk P, Kallas K, Ellezam B, Bakshi R, Prat A, Antel JP, Weiner HL, Quintana FJ. 2014.

Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med* 20: 1147-56

- 5 61. Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, Izquierdo G, Lucas M, Basso AS, Khoury SJ, Lucchinetti CF, Cohen IR, Weiner HL. 2008. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18889-94
62. Corti D, Lanzavecchia A. 2013. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu Rev Immunol* 31: 705-42
63. Haigwood NL, Stamatatos L. 2003. Role of neutralizing antibodies in HIV infection. *AIDS* 17 Suppl 4: S67-71
- 10 64. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286: 2156-9
65. Berland R, Wortis HH. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20: 253-300
66. Panda S, Ding JL. 2015. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J Immunol* 194: 13-20
67. Fagarasan S. 2000. T-Independent Immune Response: New Aspects of B Cell Biology. *Science* 290: 89--92
- 15 68. Quintana FJ, Solomon A, Cohen IR, Nussbaum G. 2008. Induction of IgG3 to LPS via Toll-like receptor 4 co-stimulation. *PLoS One* 3: e3509
69. Brewer JW, Solodushko V, Aragon I, Barrington RA. 2016. Phosphatidylcholine as a metabolic cue for determining B cell fate and function. *Cell Immunol* 310: 78-88
70. Fagone P, Gunter C, Sage CR, Gunn KE, Brewer JW, Jackowski S. 2009. CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha is required for B-cell proliferation and class switch recombination. *J Biol Chem* 284: 6847-54
- 20 71. Zaprianova E, Deleva D, Ilinov P, Sultanov E, Filchev A, Christova L, Sultanov B. 2001. Serum ganglioside patterns in multiple sclerosis. *Neurochem Res* 26: 95-100
72. Yamanishi S, Iizumi T, Watanabe E, Shimizu M, Kamiya S, Nagata K, Kumagai Y, Fukunaga Y, Takahashi H. 2006. Implications for induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori* urease. *Infect Immun* 74: 248-56

25

30

## REIVINDICACIONES

1. **Anticuerpo sérico IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) como biomarcador para la esclerosis múltiple (EM)**, seleccionado entre el grupo de anticuerpos séricos contra los lípidos detectados en la respuesta autoinmune de la EM, caso particular de IgM frente a lactosilceramida (IgM-LC), **caracterizado** por conseguir un aumento en el nivel de anticuerpos IgM-PC en suero de pacientes con EM de hasta 0.8 de O.D. (Densidad Óptica media) mediante ensayo ELISA semicuantitativo, con índices de reactividad  $P=0.004$  y  $P=0.0004$  respecto a controles en cohortes de Estados Unidos y España, que triplica el valor del grupo de cohorte en ambos casos (gráfico de la **Figura 1**), y que duplica el nivel de anticuerpos IgM-LC en suero de los mismos pacientes con dicha enfermedad (gráfico de la **Figura 2**).

2. Anticuerpo sérico IgM-PC como biomarcador para la EM, según reivindicación 1, **caracterizado** por su capacidad de asociarse con el curso y subtipo de la enfermedad, al obtenerse tras ensayo ELISA semicuantitativo aumentos en el nivel de anticuerpos IgM-PC en sueros de pacientes con síndrome clínico aislado (CIS), esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), secundaria progresiva (EMSP) y primaria progresiva (EMPP), en torno a 0.3, 0.25, 0.2 y 0.15 respectivamente, frente a un aumento de este anticuerpo en torno a 0.05 para el grupo de cohorte (gráfico de la **Figura 3**), traducidos en un porcentaje de sueros positivos de 88.2%, 88.7%, 58.0% y 59.5% respectivamente, frente a un 25.0% para el grupo de cohorte.

3. Uso de la IgM-PC sérica como biomarcador para la EM, según reivindicación 1, solo o en combinación con otros agentes, en la preparación de composiciones y sistemas de detección comerciales para el diagnóstico diferencial mediante técnicas inmunoquímicas de dicha enfermedad.

4. Uso de la IgM-PC sérica como biomarcador para las fases CIS, RR, SP y PP de la EM, según reivindicaciones 1 y 2, solo o en combinación con otros agentes, en la preparación de composiciones y sistemas de detección comerciales para el diagnóstico diferencial mediante técnicas inmunoquímicas de dichas fases de la enfermedad.

5. Uso de la IgM-PC sérica como biomarcador para las fases CIS y RR de la EM, según reivindicaciones 1 y 2, solo o en combinación con otros agentes, en la preparación de composiciones y sistemas de detección comerciales para el diagnóstico diferencial mediante técnicas inmunoquímicas de dichas fases temprana de la enfermedad.

**6. Técnica ELISA semicuantitativa de alta sensibilidad para la detección de anticuerpos séricos IgM frente a fosfatidilcolina (IgM-PC) en pacientes con esclerosis múltiple (EM)**, del tipo de ELISA utilizada para la detección de anticuerpos frente a sustancias y compuestos antigénicos en muestras de suero de pacientes con enfermedades autoinmunes, **caracterizada** por un procedimiento que consta de los siguientes etapas o pasos:

- 1) Añadir fosfatidilcolina (Merck) 1 µg/pocillo diluida en 100 microlitros de metanol como diluyente en placas microtiter Greiner High-Binding (Greiner), de lata capacidad de unión molecular:
- 2) Incubar las placas durante toda la noche a 4° C hasta la completa evaporación del metanol para asegurar la pegada del lípido a la placa;
- 3) Lavar 5 veces con 250 µl/pocillo de suero fisiológico tamponado con fosfato pH=7,2 a 4°C, con lo que evita que el lípido se despegue de la placa;
- 4) Añadir 200 µl de la solución de SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer ThermoFisher) (BF), como solución específica de bloqueo, e incubar 2 horas.
- 5) Repetir etapa 3.
- 6) Añadir las muestras a dilución 1/100 en BF e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
- 7) Repetir etapa 3.
- 8) Añadir 100 µl de anti human IgM biotilado (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/20.000 en BF, como anticuerpo secundario para la amplificación de la señal, e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
- 9) Repetir etapa 3.
- 10) Añadir 100 µl de streptavidin-peroxidase (Jackson ImmunoResearch) diluido 1/1.000 en BF e incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- 11) Repetir etapa 3.

12) Añadir 100 µl del sustrato 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Scientific™) e incubar 5 minutos.

5 13) Añadir 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido al 5% en agua destilada para cortar la reacción y leer la placa en un espectrofotómetro a 450 nm.

10 7. Técnica ELISA semicuantitativa de alta sensibilidad para la detección de anticuerpos séricos IgM-PC en pacientes con EM, según reivindicaciones 1 a 6, aplicada como método de diagnóstico diferencial de la EM y de las fases CIS, RR, SP y PP de esta enfermedad.

8. Técnica ELISA semicuantitativa de alta sensibilidad para la detección de anticuerpos séricos IgM-PC en pacientes con EM, según reivindicaciones 1 a 6, aplicada como método de diagnóstico diferencial de la EM y de las fases tempranas CIS y RR de esta enfermedad.

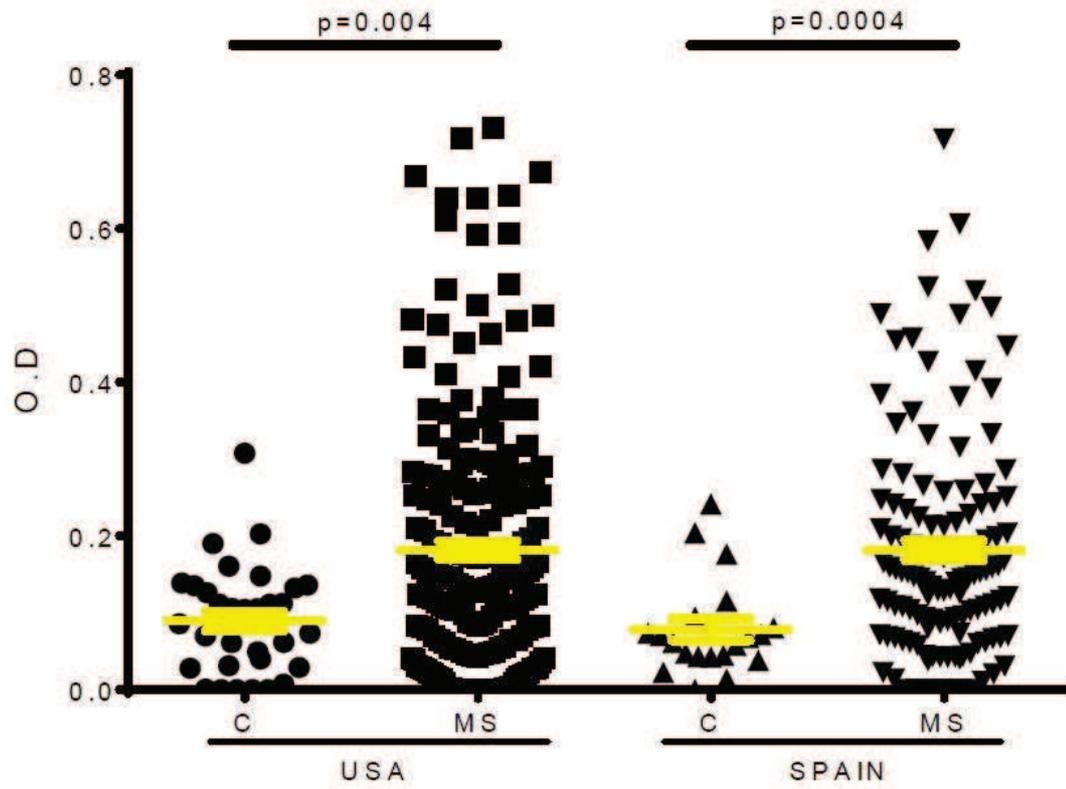


Figura 1

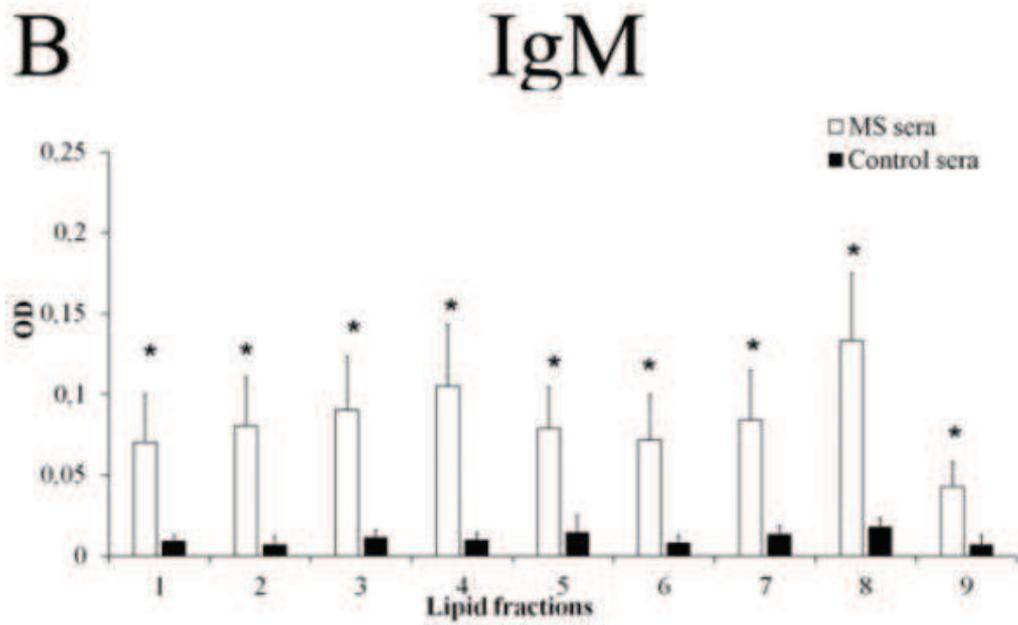


Figura 2

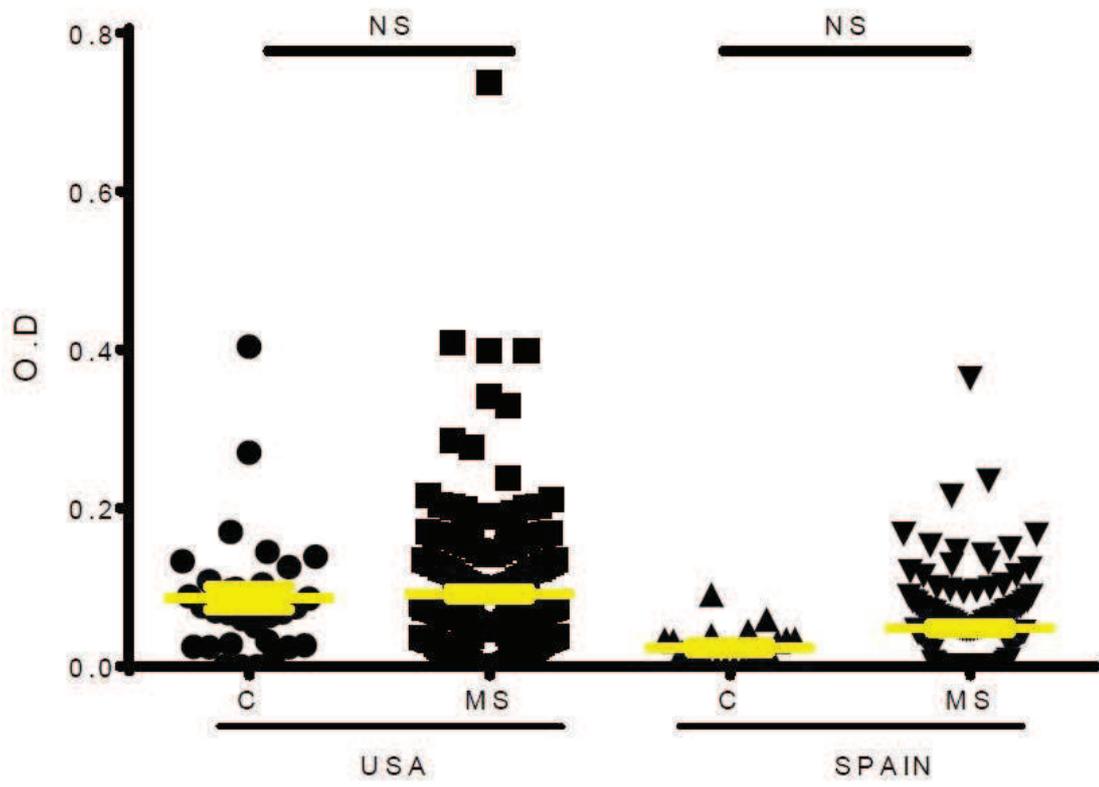


Figura 3

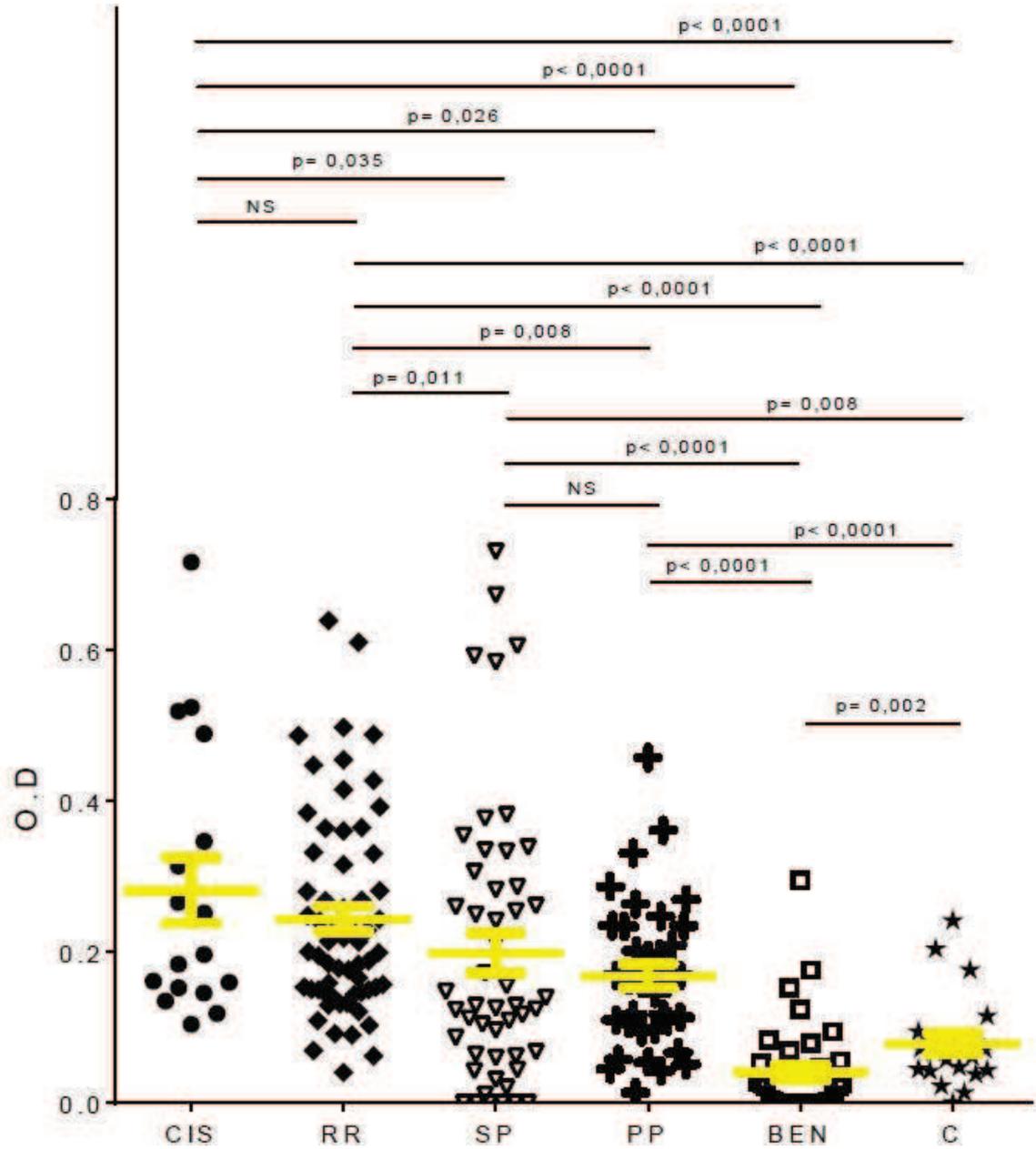


Figura 4

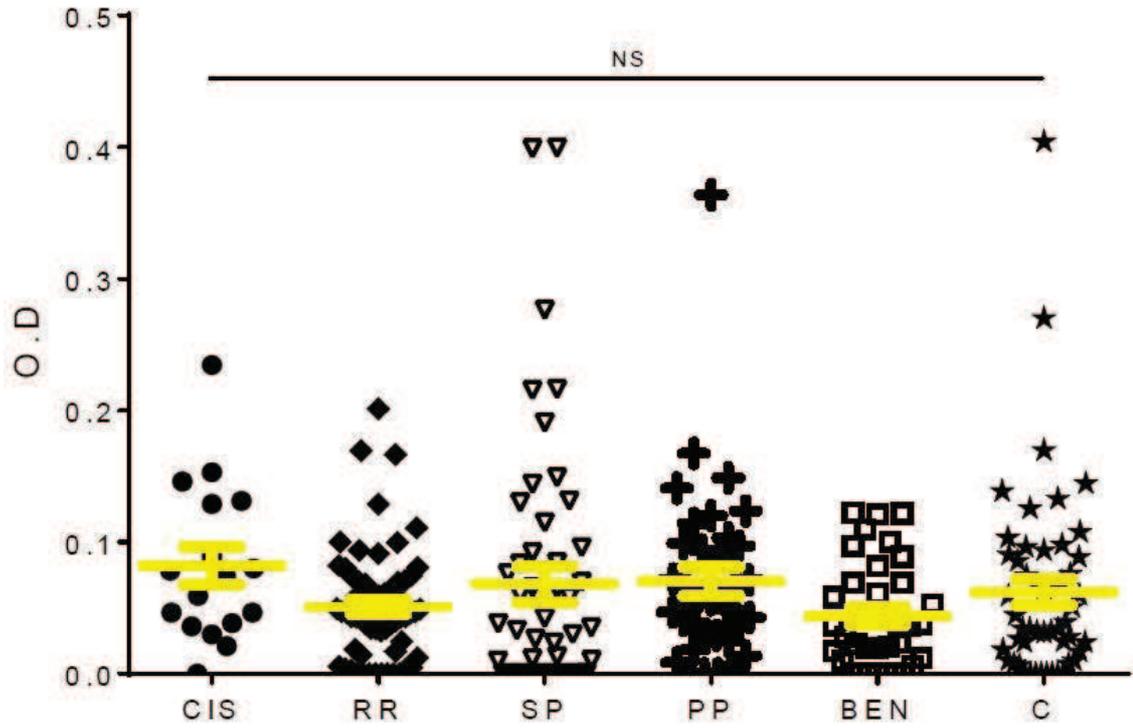


Figura 5



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 202030053  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 23.01.2020  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **G01N33/92** (2006.01)  
**G01N33/564** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HORSTMAN, L. L. et al. Antiphospholipid antibodies: paradigm in transition. Journal of Neuroinflammation. Enero 2009, Vol. 6, N° artículo 3, páginas 1 - 21. ISSN 1742-2094, <DOI:10.1186/1742-2094-6-3>. Especialmente: página 8, columna derecha - página 9, columna izquierda; página 11, último párrafo - página 12, primer párrafo.	1, 2, 6 - 8
A	SUGIYAMA, Y. et al. Characterization of serum anti-phospholipid antibodies in patients with multiple sclerosis. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. Marzo 1996, Vol. 178, N° 3, páginas 203 - 215. ISSN 0040-8727 (impreso), <DOI:10.1620/tjem.178.203>. Especialmente: página 206; página 209, primer párrafo; apartado "Discusión"; figura 4.	1, 2, 6 - 8
A	BIDOT, C. J. et al. Clinical and neuroimaging correlates of antiphospholipid antibodies in multiple sclerosis: a preliminary study. BMC Neurology. Octubre 2007, Vol. 7, N° artículo 36, páginas 1 - 7. ISSN 1471-2377 (electrónico), <DOI:10.1186/1471-2377-7-36 >. Especialmente: página 2, columna izquierda, último párrafo - columna derecha, segundo párrafo; página 4, columna izquierda, penúltimo párrafo; figura 1; tabla 2.	1, 2, 7, 8
A	McINTYRE, J. A. et al. Antiphospholipid antibodies: discovery, definitions, detection and disease. Progress in Lipid Research. Mayo 2003, Vol. 42, N° 3, páginas 176 - 237. ISSN 0163-7827. Especialmente: páginas 195, 196; página 216, último párrafo - página 217, primer párrafo.	6
A	WO 2010/121714 A1 (DIAMETRA S. R. L. et al.) 28/10/2010, ejemplo 3, ejemplo 5.	6
A	ROLLA, R. et al. Antiphospholipid antibodies associated with alcoholic liver disease specifically recognise oxidised phospholipids. Gut. Diciembre 2001, Vol. 49, N° 6, páginas 852 - 859. ISSN 0017-5749. Especialmente: página 853, columna derecha - página 854, columna izquierda.	6

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1, 2, 6-8

Fecha de realización del informe  
15.06.2020

Examinador  
E. Relaño Reyes

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, PATENW, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, XPES, TXPEU, TXPEY, TXPEPEA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC