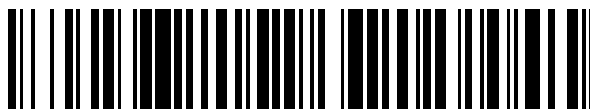


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 652**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/538 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2012 PCT/IB2012/054142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057599**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2012 E 12772445 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2769220**

54 Título: **Biomarcador de enfermedad autoinmunitaria**

30 Prioridad:

17.10.2011 GR 20110100593

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2021

73 Titular/es:

TZARTOS, SOCRATES (100.0%)

147 Formionos Street

116 21 Kaisariani, GR

72 Inventor/es:

TZARTOS, IOANNIS;

STERGIOU, CHRISTOS;

KILINDIREAS, KONSTANTINOS y

TZARTOS, SOCRATES

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 823 652 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

Biomarcador de enfermedad autoinmunitaria

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un nuevo marcador de autoanticuerpos contra la acuaporina-1 (AQP1) y métodos para diagnosticar y tratar enfermedades autoinmunitarias asociadas con la formación de lesiones desmielinizadas del sistema nervioso central.

10 Antecedentes de la invención

El uso de biomarcadores en el diagnóstico clínico y el desarrollo de fármacos es cada vez más importante. Sin embargo, la identificación de biomarcadores adecuados con frecuencia representa un desafío significativo. Por ejemplo, en la mayoría de los casos, no se conocen biomarcadores específicos de lesiones o mecanismos de formación de lesiones en el sistema nervioso central (SNC), proponiéndose virus o autoinmunidad contra antígenos desconocidos.

20 Las acuaporinas son un grupo de proteínas de canal, importante para el transporte rápido, principalmente de agua, en respuesta a la ósmosis (Pasantes-Morales y Cruz-Rangel (2010) Neuroscience 168(4): 871-884). Estas proteínas desempeñan un papel en el equilibrio hídrico en el SNC crucial para la integridad del parénquima del SNC (Amiry-Moghaddam y Ottersen (2003) Nat Rev Neurosci 4(12): 991-1001; Lukaszewicz et al. (2011) Curr Opin Anaesthesiol 24(2): 138-143).

25 La acuaporina 4 (AQP4) y la acuaporina 1 (AQP1) son las principales acuaporinas que se han detectado en el cerebro (Badaut et al. (2002) J Cereb Blood Flow Metab 22(4): 367-378; Satoh et al. (2007) Neuropathology 27(3): 245-256). En ratones, la ausencia de AQP4 previene el edema citotóxico durante la isquemia (Manley et al. (2000) Nat Med 6(2): 159-163; Amiry-Moghaddam y Ottersen (2003) Nat Rev Neurosci 4(12): 991-1001), pero inhibe la resolución del edema vasogénico (Papadopoulos et al. (2004) FASEB J 18(11): 1291-1293).

30 La AQP1 en ratones no se expresa en astrocitos, pero se detecta específicamente en el epitelio del plexo coroideo y en algunas neuronas y puede estar implicada en la formación de líquido cefalorraquídeo (LCR) sin un papel directo en el edema cerebral. En un modelo de cerebro de ratón isquémico, no se detectó ningún efecto de los niveles de AQP1 o los tipos de células que expresan AQP1 durante la isquemia cerebral (Ribeiro Mde et al. (2006) J Neurosci Res 83(7): 1231-1240).

35 Además del SNC, también se ha detectado AQP1 en el sistema nervioso periférico (Ma, T. H., H. W. Gao, et al. (2011) Acta Pharmacol Sin 32(6): 711-715) y en tejidos no neuronales como los glóbulos rojos, hígado, riñón, pulmones y glándulas sudoríparas.

40 La presencia de autoanticuerpos contra los pies terminales de los astrocitos de ratón se ha detectado de forma selectiva en sueros de pacientes con lesiones desmielinizadas en el SNC, generalmente con las características específicas de la neuromielitis óptica, NMO (Lennon et al. (2004) Lancet 364(9451): 2106-2112). La NMO (por sus siglas en inglés) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica del SNC, que afecta principalmente a los nervios ópticos y la médula espinal. Como la esclerosis múltiple (EM), la NMO habitualmente sigue un curso remitente-recurrente, pero con frecuencia conduce a una discapacidad más grave con deterioro de la visión funcional y/o pérdida de la deambulación. Su diferenciación de la EM y otras enfermedades similares del SNC es importante para poder aplicar el tratamiento adecuado. Sin embargo, tal diferenciación habitualmente es muy difícil debido a la presentación clínica superpuesta y los hallazgos de la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés).

50 Los autoanticuerpos contra los pies terminales de los astrocitos se han denominado NMO-IgG. Asimismo, se demostró que NMO-IgG se une selectivamente al canal de agua de AQP4 (Lennon et al. (2005) J Exp Med 202(4): 473-477), enlazando NMO con la pérdida regional de AQP4 de los astrocitos (Kale et al. (2009) Arch Neurol 66(10): 1298-1299). *In vitro*, se ha demostrado el papel patógeno de los anticuerpos anti-AQP4, con acumulaciones de glutamato, posiblemente causando un ambiente patógeno para oligodendrocitos y neuronas (Hinson et al. J Exp Med 205(11): 2473-2481).

60 Se han detectado otras varias AQP en diversas regiones y tipos de células del SNC de mamíferos (principalmente estudiadas en roedores), incluidos astrocitos, oligodendrocitos, neuronas y células endimarias. Más específicamente,

- a. se ha detectado Acuaporina-2 (AQP2) en varias regiones del SNC, incluida la capa de células endimarias, médula espinal, sustancia blanca subcortical e hipocampo (Mobasheri et al., 2005, J. Mol. Histol. 36, 1-14).
- 65 b. se ha detectado Acuaporina-5 (AQP5) en astrocitos y neuronas en cultivo (Yamamoto et al., 2001, Brain Res. Mol. Brain Res. 90, 26-38). Su expresión mostró una regulación positiva transitoria y una regulación negativa

posterior dentro de las 20 h posteriores a la reoxigenación después de hipoxia. Esto sugiere que AQP5 puede contribuir a la inducción del edema intracraneal en el SNC después de una lesión por isquemia (Albertini y Bianchi, 2010, Curr. Neuropharmacol. 2010 (8), 84-91).

c. se encontró Acuaporina-7 (AQP7) en el plexo coroideo, ependyma, pia y vasos sanguíneos del cerebro del ratón durante el desarrollo perinatal (Shin et al. 2006, Neurosci. Lett. 409, 106-111).

d. se encontró expresión de Acuaporina-8 (AQP8) en la médula espinal, especialmente en las células ependimarias que recubren su canal central, y posiblemente en astrocitos (Oshio et al. 2004, Neuroscience, 127, 685-693). Basándose en estos hallazgos, se sugirió que AQP8 puede facilitar el transporte de agua hacia el canal central de la médula espinal (Albertini y Bianchi, 2010, Curr. Neuropharmacol. 2010. (8), 84-91).

Además de su presencia y función en el cerebro, estas AQP también están presentes en otros órganos y tejidos del cuerpo (revisado en Verkman 2011, J Cell Sci. 2011 124:2107-12; Verkman 2012 Annu Rev Med. 63:303-16). Específicamente,

AQP2 es la única AQP regulada por vasopresina expresada en células renales para la reabsorción de agua. En seres humanos, las mutaciones genéticas en AQP2 dan como resultado diabetes insípida nefrogénica, caracterizada por poliuria e hipoosmolalidad urinaria.

AQP5, se expresa en el riñón, glándulas submucosas salivales y de las vías respiratorias, muestran secreción defectuosa de saliva y moco de las vías respiratorias y lágrimas.

AQP7 se expresa en adipocitos y facilita el glicerol para prevenir la acumulación de grasa. AQP8 se expresa en órganos del tracto gastrointestinal de mamíferos (glándula salival, hígado, páncreas, intestino delgado y colon) y en los testículos, corazón, riñón y vías respiratorias.

El documento US 5741671A describe que AQP1 o AQP5 pueden usarse en procedimientos de inmunoensayo para detectar autoanticuerpos como una herramienta de diagnóstico para ayudar en la identificación de individuos que padecen enfermedades autoinmunitarias que implican un ataque inmunitario a proteínas específicas de canales de agua, por ejemplo, síndrome de Sjögren.

Nikolov et al. (American College of Rheumatology, 2008 Annual Scientific Meeting (24-29 de Octubre); Presentación: Los autoanticuerpos contra las acuaporinas en el síndrome de Sjogren primario (SSp) muestran que los autoanticuerpos contra AQP1 y AQP5 no contribuyen al síndrome de Sjogren primario.

Smith et al. (J. Clin. Invest. 94,1043-1049, 1994) divulga la caracterización molecular de los antígenos de los grupos sanguíneos ABH y Colton.

Denker et al. (JBC 263, 15634-15642, 1998) divulga la identificación, purificación y caracterización parcial de una proteína de membrana integral de eritrocitos y túbulo renales.

Foglio et al. (Curr. Neuropharmacol. 8, 112-121, 2010) plantea la hipótesis de que las acuaporinas pueden expresarse de manera anormal en algunas afecciones patológicas, tal como las enfermedades neurodegenerativas.

La presente invención identifica anticuerpos anti-AQP1, acuaporina-2 (AQP2), acuaporina-5 (AQP5), acuaporina-7 (AQP7) y acuaporina-8 (AQP8) como nuevos biomarcadores de enfermedad.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto en donde el método comprende detectar autoanticuerpos de acuaporina-1 (AQP1) en una muestra obtenida de dicho sujeto. El método de acuerdo con este aspecto de la invención puede comprender además la detección de autoanticuerpos de acuaporina-4 (AQP4) en la misma muestra o en una muestra diferente obtenida de dicho sujeto.

El nivel de autoanticuerpos de AQP1 se puede comparar con el nivel correspondiente de autoanticuerpos de AQP1 en una muestra de un sujeto sano. Por un sujeto sano se entiende un sujeto correspondiente que no tiene una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la expresión del autoanticuerpo de AQP1.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para monitorizar el progreso de una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del SNC en un sujeto que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una primera muestra del sujeto,
- (ii) detectar autoanticuerpos de AQP1 en dicha primera muestra,
- (iii) proporcionar una segunda muestra del sujeto en donde dicha segunda muestra se obtiene del sujeto después de dicha primera muestra,

(iv) comparar el nivel de los autoanticuerpos de AQP1 en la segunda muestra con el nivel correspondiente de autoanticuerpos de AQP1 en la primera muestra, en donde un aumento en el nivel de autoanticuerpos de AQP1 en la segunda muestra con respecto a la primera muestra indica progresión de la enfermedad.

5 Un aumento en la expresión de autoanticuerpos de AQP1 en la segunda muestra en relación con la primera muestra puede indicar la progresión de la enfermedad. Una disminución en la expresión de autoanticuerpos de AQP1 en la segunda muestra con respecto a la primera muestra puede indicar una regresión de la enfermedad.

10 El método de acuerdo con este aspecto de la invención también puede implicar la detección de autoanticuerpos de AQP4 en dichas muestras primera y segunda o posteriores.

Los autoanticuerpos de AQP4 pueden detectarse en la misma o diferente primera muestra obtenida de dicho sujeto y la misma o diferente segunda muestra o posterior obtenida de dicho sujeto.

15 Preferentemente, la segunda muestra se obtiene del sujeto al menos 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 o 300 días después de la primera muestra.

20 El segundo aspecto de la invención se puede usar para monitorizar el progreso de una enfermedad autoinmunitaria en respuesta al tratamiento, por ejemplo, terapia inmunomoduladora (inmunosupresión, plasmaféresis, Ig-aféresis, IVIG, administración terapéutica de AQP1 en diversas formas, incluso en liposomas o nanopartículas, o por administración nasal u oral, terapia con linfocitos T, etc.). Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para evaluar la eficacia de un tratamiento. El tratamiento puede administrarse entre la toma de la primera muestra y la toma de la segunda muestra o una posterior del paciente.

25 Los autoanticuerpos de AQP1 pueden detectarse poniendo en contacto dicha muestra con la proteína AQP1 correspondiente, o una célula o tejido que comprenda dicho polipéptido, y detectando la presencia o ausencia de unión de dichos autoanticuerpos de AQP1 a dicho polipéptido, célula o tejido.

30 Por lo tanto, la proteína AQP1, o la célula o tejido que comprenden la misma se usa para unir autoanticuerpos de AQP1.

35 También se describe en el presente documento un método para detectar la presencia o ausencia de autoanticuerpos de AQP1 en una muestra obtenida de un sujeto que comprende poner en contacto dicha muestra con la proteína AQP1 correspondiente, o una célula o tejido que comprenda dicho polipéptido, y detectar la presencia o ausencia de unión de dichos autoanticuerpos de AQP1 contra dicho polipéptido, célula o tejido, (por ejemplo, células de riñón embrionario humano (HEK), secciones de cerebro de ratón, secciones de hígado o cualquier otro tejido que contenga AQP1).

40 La muestra utilizada en la presente invención puede ser, pero sin limitación, biopsia de tejido, tejido nervioso, sangre, células sanguíneas, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, inmunoglobulinas sanguíneas o líquido cefalorraquídeo.

45 Preferentemente, la detección de los autoanticuerpos de AQP1 descritos en el presente documento se logra usando un inmunoensayo tal como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de inmunofluorescencia (IFA, por sus siglas en inglés), ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIF, por sus siglas en inglés), ensayo ligado a enzimas (EIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo de luminiscencia (LIA, por sus siglas en inglés), ensayo de transferencia Western (WB, por sus siglas en inglés) o ensayo basado en células (CBA, por sus siglas en inglés).

50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido de AQP1, o una célula o tejido que comprende dicho polipéptido, para su uso en el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del SNC.

55 La enfermedad autoinmunitaria a la que se hace referencia en el presente documento es una enfermedad asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del SNC. La desmielinización es la destrucción/pérdida de la vaina de mielina de un área mielinizada del sistema nervioso. La enfermedad autoinmunitaria a la que se hace referencia en el presente documento puede ser un trastorno del espectro de Neuromielitis Óptica (NMO) o esclerosis múltiple. El trastorno del espectro de NMO puede ser:

1. NMO;
- 60 2. una forma limitada de NMO tal como:
 - a. Mielitis transversa longitudinal extensa
 - b. Neuritis óptica, bilateral recurrente o simultánea;
- 65 3. Esclerosis Múltiple Óptico-Espinal Asiática;
4. Neuritis Óptica o Mielitis Longitudinal Extensa asociada con Enfermedad Autoinmunitaria Sistémica; o

5. Neuritis Óptica o Mielitis Asociada con Lesiones Cerebrales Típicas de Neuromielitis Óptica (de Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, et al. The spectrum of neuromyelitis optica. Lancet Neurol 2007;6(9):805-815.)

5 Los métodos de acuerdo con la presente invención se refieren al diagnóstico, tratamiento, monitorización y pronóstico de una enfermedad autoinmunitaria asociada a la formación de lesiones desmielinizadas del SNC.

La enfermedad autoinmunitaria a la que se hace referencia en el presente documento puede caracterizarse por la presencia de o niveles elevados de autoanticuerpo de AQP1.

10 También se describe en el presente documento un método para tratar a un sujeto que comprende extraer un fluido corporal que contiene autoanticuerpos de AQP1; eliminar una parte sustancial de los autoanticuerpos del fluido corporal; y devolver el fluido corporal al sujeto.

15 El método de tratamiento puede comprender eliminar una parte sustancial de los autoanticuerpos de AQP1 así como de los autoanticuerpos de AQP4.

También se describe en el presente documento el uso de un polipéptido de AQP1, o una célula o tejido que comprende dicho polipéptido, en un método de inmunoabsorción de autoanticuerpos de AQP1 *ex vivo*.

20 También se describe en el presente documento un soporte sólido para su uso en un método de inmunoabsorción de autoanticuerpos de AQP1 que comprenden un polipéptido de AQP1, o una célula o tejido que comprende dicho polipéptido, en donde dicho polipéptido, célula o tejido está unido al soporte sólido.

25 El soporte sólido puede ser, por ejemplo, una membrana, una cuenta, cristal poroso, sílice, una matriz de resina o sintética.

También se describe en el presente documento el uso de un soporte sólido descrito en el presente documento en un método de inmunoabsorción de autoanticuerpos de AQP1 *ex vivo*.

30 También se describe en el presente documento un método para identificar compuestos capaces de aliviar o tratar una enfermedad caracterizada por niveles elevados de autoanticuerpo de AQP1, comprendiendo el método: poner en contacto un compuesto candidato en presencia de polipéptido de AQP1 y un anticuerpo capaz de unirse específicamente a AQP1 en donde un compuesto que previenen la unión del anticuerpo a AQP1 es un candidato para tratar un trastorno autoinmunitario.

35 También se describe en el presente documento un modelo animal para su uso en la exploración de compuestos que tratan o previenen una enfermedad caracterizada por niveles elevados de autoanticuerpos de AQP1 en donde dicho modelo animal expresa o contiene autoanticuerpos de AQP1.

40 Preferentemente, el modelo animal es un modelo animal de ratón, rata, cobaya, conejo o primate no humano.

El animal puede inyectarse con anticuerpos humanos anti-AQP1. En otra realización, el animal se inmuniza con AQP1.

45 También se describe en el presente documento un método de exploración de un agente que modula la unión de un anticuerpo de AQP1 al polipéptido de AQP1 correspondiente que comprende:

- (i) poner en contacto un polipéptido de AQP1 con el anticuerpo de AQP1 en presencia y ausencia de dicho agente;
- y
- (ii) determinar si la unión del polipéptido de AQP1 al anticuerpo de AQP1 está modulada en presencia de dicho agente.

50 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido de AQP1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la presencia de o niveles elevados de, autoanticuerpo de AQP1 en donde el polipéptido de AQP1 reduce o elimina los anticuerpos anti-AQP1 de la circulación, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del SNC. El péptido de AQP1 se puede incorporar a una partícula tal como una nanopartícula o un liposoma.

60 También se describe en el presente documento un polipéptido de AQP1 para su uso en inmunoterapia para tratar una enfermedad caracterizada por la presencia de o niveles elevados de, autoanticuerpo de AQP1 en donde el polipéptido de AQP1 modula la respuesta inmunitaria contra AQP1 en el sujeto. El polipéptido de AQP1 puede incorporarse en una partícula como una nanopartícula o un liposoma.

65 También se describe en el presente documento un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad caracterizada por la presencia de o niveles elevados de autoanticuerpo de AQP1 que comprende la administración a dicho sujeto de un agente que se une al AQP1 del sujeto y lo protege contra los autoanticuerpos de AQP1 patógenos. En una realización, el agente puede ser un fragmento de anticuerpo no patógeno.

También se describe en el presente documento el uso de polipéptido de AQP1 para la exploración de un agente que modula la interacción entre un polipéptido de AQP1 y un anticuerpo de AQP1.

- 5 También se describe en el presente documento el uso de anticuerpo de AQP1 para la exploración de un agente que modula la interacción entre un polipéptido de AQP1 y un anticuerpo de AQP1.

También se describe en el presente documento un método de diagnóstico o pronóstico de cáncer en un sujeto en donde el método comprende detectar autoanticuerpos de AQP1 en una muestra obtenida de dicho sujeto.

- 10 El método también puede implicar la detección de autoanticuerpos de AQP4 en la misma muestra o en una muestra diferente de dicho sujeto.

El cáncer puede ser nefroma, linfoma no de Hodgkin o cáncer de mama.

- 15 Descripción de figuras

Figura 1 - Detección de anticuerpos anti-AQP1 en los sueros de grupos de pacientes y controles sanos determinados por un ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA)

- 20 AQP1 se biotiniló y después se incubó con ¹²⁵I-estreptavidina para dar como resultado AQP1 radiomarcado indirectamente. Las cpm precipitadas representan el nivel de AQP1 unido a los anticuerpos del suero de prueba e indirectamente el nivel de los autoanticuerpos en el suero. Los números entre paréntesis en el eje X indican los números de sueros anti-AQP1 positivos frente al total de sueros probados para cada grupo de pacientes probados, mientras que a continuación se muestra el porcentaje de positivos. La línea horizontal discontinua indica los valores de corte para ambiguos y la línea horizontal continua indica los valores de corte para positividad. El eje x contiene, además de las cpm precipitadas, también la concentración de anticuerpo estimada en nM.

Figura 2. Efecto del tratamiento con polvo de hígado de los sueros sobre la detección de anticuerpos anti-AQP1 Se trataron previamente dos sueros anti-AQP1 positivos (sueros 1 y 2) y dos anti-AQP4 positivos (sueros 3 y 4) con polvo de hígado de cobaya; sus sobrenadantes se probaron en RIA con AQP1 y AQP4 marcados, respectivamente, y se compararon con los de los sueros no tratados. -, +: suero sin o con tratamiento previo con polvo de hígado de cobaya.

- 35 Figura 3 - Representación gráfica de los valores de cpm precipitadas (correspondientes a las concentraciones de anticuerpos) en sueros doble positivos, para anticuerpos anti-AQP1 frente a anti-AQP4 Se realizaron RIPA idénticas para los dos antígenos marcados. Solo un suero dio valores casi idénticos; 9 sueros dieron valores más altos con AQP1 y solo 5 sueros dieron valores más altos con AQP4.

Figura 4 - Búsqueda de reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-AQP1 y anti-AQP4 Se inmovilizaron AQP1 y AQP4 en pocillos ELISA. Las muestras de cada suero de prueba se incubaron con acuaporina inmovilizada, AQP1 (panel derecho) y AQP4 (panel izquierdo), para inmunoabsorber todos los anticuerpos unidos a AQP1 o AQP4, respectivamente. Los 14 sueros tratados se probaron por RIPA para determinar su unión a AQP1 marcado (2ª barra para cada suero) y AQP4 (4ª barra para cada suero), y se compararon con la unión de las muestras no tratadas de los mismos sueros (1ª y 3ª barras para cada suero, respectivamente).

Figura 5 - Detección de niveles bajos de anticuerpos anti-AQP1 por RIPA de dos etapas Se inmovilizó AQP1 en cada pocillo de la placa ELISA; se añadieron 150 µl de suero de prueba por pocillo y se incubaron. Después se lavaron los pocillos, los anticuerpos unidos se eluyeron a pH bajo; el pH de la muestra eluida se neutralizó inmediatamente y la solución de anticuerpos se sometió a RIPA normal. Se muestran seis sueros positivos bajos, 4 ambiguos y 2 de NHS de fondo alto. Δcpm: las cpm unidas por el suero de prueba menos el promedio de las cpm unidas por los sueros de NHS (256 cpm para RIPA directa y 330 cpm para RIPA de dos etapas). Las líneas horizontales discontinuas y continuas indican los cortes para valores ambiguos y positivos.

- 55 Figura 6 - Caracterización bioquímica del autoanticuerpo-diana A. Los sueros (uno NHS, marcado como N, y tres sueros de prueba AQP1+, marcados como 1, 2, 3) se incubaron con 0,1 µg de AQP1 biotinilada seguido de precipitación con perlas de Sepharose-proteína A. La AQP1 unida se liberó, se ejecutó en PAGE y se reveló mediante transferencia Western usando HRP-estreptavidina y su sustrato. M, patrones de PM. B. Se analizaron directamente 0,01 y 0,1 µg de AQP1 biotinilada mediante PAGE seguido de transferencia Western para semicuantificar la intensidad de las bandas de AQP1.

Figura 7 - Inmunoabsorción de anticuerpos anti-AQP1 de sueros de pacientes Se inmovilizó AQP1 en pocillo de placa ELISA (0,1 µg/pocillo); a los pocillos se añadió suero positivo anti-AQP1. Después de la incubación, el suero tratado se recogió y probó por RIPA con AQP1 ¹²⁵I-etiquetado indirectamente. En paralelo, se probó una cantidad igual de suero sin tratar mediante RIPA para determinar el porcentaje de

anticuerpos anti-AQP1 en suero que se eliminaron del suero tratado.

Figura 8 - Secuencia representativa de acuaporina-1 humana

Figura 9A - Secuencia de nucleótidos representativa de acuaporina-2 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: Z29491.

Figura 9B - Secuencia de aminoácidos representativa del polipéptido de acuaporina-2 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: AAD38692.1.

Figura 10A - Secuencia de nucleótidos representativa de acuaporina-5 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: U46569.

Figura 10B - Secuencia de aminoácidos representativa del polipéptido de acuaporina-5 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: AAH32946.1.

Figura 11A - Secuencia de nucleótidos representativa de acuaporina-7 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: AB006190.

Figura 11B - Secuencia de aminoácidos representativa del polipéptido de acuaporina-7 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: CAI13309.1.

Figura 12A - Secuencia de nucleótidos representativa de acuaporina-8 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: AB013456. T

Figura 12B - Secuencia de aminoácidos representativa del polipéptido de acuaporina-8 humana. Esta secuencia también se muestra en el número de registro de GenBank: AAF19050.1.

Descripción detallada

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto en la materia. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Libros 1-3, Col d Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; JM Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; y E. M. Shevach y W. Strober, 1992 and periodic supplements, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, NY.

Las proteínas acuaporina están formadas por seis hélices α transmembrana dispuestas en un paquete a la derecha, con los extremos amino y carboxilo ubicados en la superficie citoplásmica de la membrana (Gonen T, Walz T (2006) "The structure of aquaporins". *Q. Rev. Biophys.* 39 (4): 361-96; Fu D, Lu M (2007) "The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins", *Mol. Membr. Biol.* 24 (5-6): 366-74).

Las mitades amino y carboxilo de la secuencia muestran similitud entre sí, en lo que parece ser una repetición en tándem. También hay cinco regiones de bucle entre las hélices (A - E) que forman los vestíbulos extracelular y citoplasmático. Los bucles B y E son bucles hidrófobos que contienen el motivo, altamente aunque no completamente conservado, asparagina-prolina-alanina (NPA), que se solapan a la mitad de la bicapa lipídica de la membrana formando una estructura 3-D de 'reloj de arena' por donde fluye el agua. Este solapamiento forma uno de los dos sitios de constricción de canales bien conocidos en el péptido, el motivo NPA y una segunda constricción generalmente más estrecha conocida como "filtro de selectividad" o filtro de selectividad ar/R.

Las acuaporinas forman tetrámeros en la membrana celular, con cada monómero actuando como un canal de agua (Gonen T, Walz T (2006) *Q. Rev. Biophys.* 39 (4)). Las diferentes acuaporinas contienen diferencias en su secuencia peptídica, lo que permite que el tamaño del poro en la proteína difiera entre acuaporinas. El tamaño resultante del poro afecta directamente qué moléculas pueden pasar a través del poro, con tamaños de poro pequeños que solo permiten que pequeñas moléculas como el agua pasen a través del poro.

Se muestran ejemplos de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuaporina-4 humana en los números de registro de GenBank U63622 y U63623. Las secuencias de aminoácidos predichas de polipéptidos representativos de acuaporina-4 humana se muestran en los números de registro de GenBank AAG17964, AAB26957, AAB26958 y 139178. Las secuencias de los ácidos nucleicos y aminoácidos que codifican la acuaporina-4 de otros organismos se pueden encontrar buscando en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando

"acuaporina-4" como palabra de búsqueda.

Se muestra un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuaporina-1 humana en los números de registro de GenBank AAH22486. La secuencia de aminoácidos predicha del polipéptido representativo de acuaporina-1 humana se muestra en los números de registro de ProteinBank AAX24129.1. Las secuencias de los ácidos nucleicos y aminoácidos que codifican la acuaporina-1 de otros organismos se pueden encontrar buscando en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando "acuaporina-1" como palabra de búsqueda.

Ejemplos de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuaporinas -2, -5 -7-8 humanas se muestra en el número de registro de GenBank Z29491, U46569, AB006190 y AB013456, respectivamente. La secuencia de aminoácidos representativa del polipéptido de acuaporinas -2, -5 -7, -8 humanas se muestra en el número de registro de GenBank AAD38692.1, AAH32946.1, CAI13309.1 y AAF19050.1, respectivamente. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos que codifican acuaporinas -2, -5 -7, -8 de otros organismos se pueden encontrar buscando en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando "acuaporinas -2, -5 -7, -8" como palabras de búsqueda.

Se entiende que una "proteína" o "polipéptido" dentro del alcance de la invención incluye moléculas polipeptídicas monocatenarias, así como complejos de múltiples polipéptidos donde los polipéptidos constituyentes individuales están unidos por medios covalentes o no covalentes. Tal como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí mediante enlaces peptídicos o disulfuro. Las porciones del polipéptido pueden denominarse "subunidad" o "dominio" o "fragmento" según corresponda. El término polipéptido abarca polipéptidos que se han modificado. El término polipéptido también abarca variantes, derivados, análogos y homólogos.

El polipéptido de AQP1 al que se hace referencia en el presente documento abarca variantes, derivados, análogos y homólogos de AQP1 para los que los autoanticuerpos de AQP1 tienen afinidad específica. De manera similar, un fragmento de un polipéptido de AQP1 al que se hace referencia en el presente documento abarca fragmentos para los que los autoanticuerpos de AQP1 tienen afinidad específica.

De manera similar, los polipéptidos de acuaporina-2 (AQP2), acuaporina-5 (AQP5), acuaporina-7 (AQP7) y acuaporina-8 (AQP8) a los que se hace referencia en el presente documento abarcan variantes, derivados, análogos y homólogos de AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 para los que los autoanticuerpos de AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 tienen una afinidad específica. De manera similar, los fragmentos de polipéptidos de AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 a los que se hace referencia en el presente documento abarcan fragmentos para los que los autoanticuerpos de AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 tienen una afinidad específica.

Los autoanticuerpos de AQP1 pueden unirse (p. ej., a través de los sitios de unión específicos de antígeno o paratopos del anticuerpo, que están presentes dentro de las regiones variables) a un epítipo antigénico presente dentro del polipéptido de AQP1. De manera similar, los autoanticuerpos de AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 pueden unirse (p. ej., a través de los sitios de unión específicos de antígeno o paratopos del anticuerpo, que están presentes dentro de las regiones variables) a un epítipo antigénico presente dentro de los polipéptidos de AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 correspondientes. Normalmente, el anticuerpo puede unirse al polipéptido de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 o AQP8 o fragmento correspondientes con alta afinidad, por ejemplo, con una constante de disociación (K_d) de menos de 1 μ M, preferentemente menos de 10 nM, preferentemente menos de 1 nM. Preferentemente, el anticuerpo de AQP1 se une específicamente a AQP1 y no se une significativamente a antígenos no relacionados. Preferentemente, el anticuerpo de AQP2 se une específicamente a AQP2 y no se une significativamente a antígenos no relacionados. Preferentemente, el anticuerpo de AQP5 se une específicamente a AQP5 y no se une significativamente a antígenos no relacionados. Preferentemente, el anticuerpo de AQP7 se une específicamente a AQP7 y no se une significativamente a antígenos no relacionados. Preferentemente, el anticuerpo de AQP8 se une específicamente a AQP8 y no se une significativamente a antígenos no relacionados.

Los polipéptidos de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 o fragmentos de los mismos incluyen uno o más sitios epitópicos. Hay disponibles algoritmos informáticos para predecir epítipos de unión, p. ej., epítipos de unión a MHC-I y MHC-II. Véase, por ejemplo, http://bimas.dcrt.nih.gov:80/molbio/hla_bind/ (Parker et al., J. Immunol., 152:163 (1994); Southwood et al., J. Immunol., 160:3363 (1998)).

Los epítipos de linfocitos B de una proteína se localizan principalmente en su superficie. Para predecir epítipos de linfocitos B, se pueden utilizar dos métodos bien conocidos: predicción de estructura 2D y predicción de índice antigénico. La predicción de la estructura 2D se puede hacer usando el programa psipred (de David Jones, Brunel Bio-informatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). El índice antigénico puede calcularse basándose en el método descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4: 181-186 [1988]). Además, como se explica en la página 73, líneas 2 a 5, la predicción de epítipos de linfocitos T auxiliares útiles se puede realizar usando el método de epítipo T descrito por Sturniolo et al (Nature Biotech. 17: 555-561 [1999]). Hirschberg et al (APMIS Volume 99, Issue 1-6, páginas 515-520, Enero de 1991) demuestra el uso de estas técnicas para generar fragmentos de péptidos de la proteína P1 de *Mycoplasma pneumoniae* que fue reconocida por anticuerpos en el suero de los pacientes.

El sitio epitópico permite la detección inmunológica de autoanticuerpos de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 y AQP8 en sueros con seguridad razonable. Habitualmente, es deseable que el sitio epitópico sea antigénicamente distinto de otros antígenos estrechamente relacionados (p. ej., otros miembros de una familia de polipéptidos). Un fragmento antigénico representativo puede incluir, por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína unida a la membrana.

Se puede obtener una secuencia variante o derivada por adición, delección, sustitución, modificación, reemplazo y/o variación de al menos un resto presente en la proteína de origen natural.

El término "análogo" como se usa en el presente documento, en relación con los polipéptidos incluye cualquier mimético, es decir, un compuesto químico que posee al menos una de las funciones endógenas de los polipéptidos que imita.

Normalmente, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 o 3 a 10 o 20 sustituciones siempre que la secuencia modificada conserve la actividad o capacidad requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos de origen no natural.

Los polipéptidos para su uso en la presente invención también pueden tener delecciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan lugar a una proteína funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los restos, siempre que se conserve la función de transporte o modulación. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos de grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Se pueden realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y, preferentemente, de la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí.

ALIFÁTICOS	No polares	G A P I L V
	Polares - no cargados	C S T M N Q
	Polares - cargados	D E K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Dichas variantes se pueden preparar usando técnicas convencionales de ADN recombinante tales como mutagénesis dirigida al sitio. Cuando se van a hacer inserciones, el ADN sintético codifica la inserción junto con las regiones flanqueantes 5' y 3' correspondientes a la secuencia de origen natural a cada lado del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes correspondientes a sitios en la secuencia de origen natural de modo que la secuencia pueda cortarse con la enzima o enzimas apropiadas y el ADN sintético unirse en el corte. A continuación, el ADN se expresa de acuerdo con la invención para producir la proteína codificada. Estos métodos son solo ilustrativos de las numerosas técnicas convencionales conocidas en la técnica para la manipulación de secuencias de ADN y también pueden usarse otras técnicas conocidas.

Los polipéptidos y fragmentos de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 y/o AQP8 pueden marcarse directa o indirectamente con una segunda sustancia que proporcione una señal detectable. Ejemplos de marcadores incluyen, pero sin limitación, radioisótopos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares.

La presencia de autoanticuerpos de AQP1 puede usarse para diagnosticar enfermedades asociadas con la presencia o expresión elevada de dichos anticuerpos, tales como enfermedades caracterizadas por lesiones desmielinizadas, en particular lesiones desmielinizadas del SNC o del sistema nervioso periférico, en una etapa temprana de la enfermedad antes de que se cumplan todos los criterios clínicos, lo que justifica el inicio temprano de una terapia inmunosupresora adecuada. La presencia de autoanticuerpos de AQP1 también puede usarse para distinguir la enfermedad autoinmunitaria de otras enfermedades autoinmunitarias tales como, pero sin limitación, las clásicas EM y MG.

La detección de autoanticuerpos de AQP1 también puede proporcionar un biomarcador cuantificable para monitorizar la progresión de la enfermedad y la respuesta a la terapia. Además, la identificación de un anticuerpo asociado con AQP1 proporciona una herramienta valiosa para desarrollar modelos animales (p. ej., mediante transferencia pasiva de anticuerpos específicos de NMO o inmunización activa con polipéptidos antigénicos de AQP1 o vacunas de ADN que codifican dichos polipéptidos antigénicos) para investigar la patogénesis de enfermedades caracterizadas por expresión de autoanticuerpos de AQP1 y para probar posibles nuevas terapias.

La presente divulgación proporciona métodos para detectar autoanticuerpos específicos de AQP1 en un individuo. Los individuos para los que se pueden utilizar los métodos de la invención normalmente pueden presentar síntomas neurológicos anormales que incluyen, pero sin limitación, hormigueo, entumecimiento, debilidad, espasmos en las extremidades, parálisis de las extremidades, pérdida sensorial, dolor radicular, diplopía y nistagmo, discapacidad visual, pérdida del control de la vejiga y/o del intestino, u otros síntomas neurológicos de origen desconocido.

Además, la divulgación proporciona kits que contienen un polipéptido de AQP1 o un fragmento del mismo. El kit puede incluir además una segunda sustancia que proporcione una señal detectable. Un kit también incluye normalmente instrucciones para usar el polipéptido de AQP1 para detectar los autoanticuerpos específicos de AQP1 en una muestra biológica.

El método describe una asociación entre la presencia de niveles anormales o patrón de expresión de la AQP1, el autoanticuerpo o autoanticuerpos específicos de AQP1 producidos posteriormente, y el trastorno resultante en un sujeto.

Los anticuerpos pueden producirse mediante técnicas convencionales. En la presente invención pueden usarse fragmentos Fab policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, así como miméticos de los mismos. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que conservan su actividad de unión para una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab')₂ y F(ab), así como anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Asimismo, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados.

Si se desean anticuerpos policlonales, un mamífero seleccionado (p. ej., ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) se inmuniza con el antígeno adecuado. Dependiendo de la especie hospedadora, se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, De Freund, geles minerales tal como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tal como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. BCG (*Bacilos de Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes humanos potencialmente útiles que pueden emplearse si la sustancia polipeptídica purificada se administra a individuos inmunitariamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

El suero del animal inmunizado se recoge y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar mediante cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar antiseros policlonales se conocen en la técnica.

Los expertos en la materia también pueden producir fácilmente anticuerpos monoclonales. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Las líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales pueden crearse mediante fusión celular y también mediante otras técnicas como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o la transfección con el virus de Epstein-Barr. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra epítomos de la órbita pueden seleccionarse para varias propiedades; es decir, para la afinidad de isotipo y epítipo.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Koehler y Milstein (Koehler y Milstein, 1975), la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al., 1983; Cote et al., 1983) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., 1985). Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón con genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con la especificidad antigénica y la actividad biológica apropiadas (Morrison et al., 1984; Neuberger *et al.*, 1984; Takeda et al., 1985). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de EE.UU. N.º 4.946.779) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios específicos de sustancia.

En determinadas realizaciones, puede preferirse el uso de fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, que se puede preparar utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, digestión con papaína para producir fragmentos Fab y Fc que pueden separarse mediante cromatografía de afinidad.

Una "muestra" se entiende dentro del alcance de la invención que se refiere a una muestra que deriva de un sujeto. La muestra biológica puede obtenerse directamente del sujeto o puede derivar de células cultivadas obtenidas de dicho sujeto. Las muestras preferidas son las derivadas de sangre que pueden comprender plasma, suero o fracciones tal como una fracción de inmunoglobulina. La muestra biológica puede haber sido sometida a un tratamiento como dilución en un transportador.

Los ensayos usados en los métodos de diagnóstico o pronóstico descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, un inmunoensayo, un ensayo de unión a ligando, un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un

ensayo basado en microchip o cualquier otro ensayo comúnmente conocido en la técnica. Los detalles sobre dichos ensayos se pueden encontrar en la bibliografía conocida y en suplementos periódicos, tal como Current Protocols in Immunology, Copyright © 2010 por John Wiley and Sons, Inc, Última actualización: 08 de febrero de 2010, ISSN impreso: 1934-3671 (véanse, p. ej., los capítulos 2, 6 y 10).

Se entiende que un "inmunoensayo" dentro del alcance de la invención incluye un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de inmunofluorescencia (IFA, por sus siglas en inglés), ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIF, por sus siglas en inglés), ensayo ligado a enzimas (EIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo de luminiscencia (LIA, por sus siglas en inglés), Ensayo de transferencia Western (WB) y ensayo basado en células (CBA) o cualquier otro inmunoensayo comúnmente conocido en la técnica.

En el presente documento se describen además métodos para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad caracterizada por la presencia de o expresión elevada de, anticuerpos de AQP1. Los métodos para tratar un sujeto incluyen, pero sin limitación, aféresis e inmunoterapia basada en receptores de linfocitos T.

Son conocidos en la técnica métodos y sistemas extracorpóreos para aféresis (es decir, el proceso de extraer sangre de un individuo, eliminar componentes de la sangre y devolver la sangre, o la sangre sin uno o más componentes, al individuo) (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.708.713; 5.258.503; 5.386.734; y 6.409.696). La presente invención proporciona un método para eliminar autoanticuerpos específicos de AQP1 de un fluido corporal de un individuo. El método implica extraer un fluido corporal de un sujeto; eliminar una parte sustancial de los autoanticuerpos específicos de AQP1 del fluido; y devolver el fluido al sujeto. Los anticuerpos eliminados pueden ser de cualquier clase, p. ej., anticuerpos IgG (tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgD, IgA o IgE.

Tal como se usa en el presente documento, una "porción sustancial" significa eliminar al menos el 20%, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99%, o incluso 100% de los autoanticuerpos específicos de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 o AQP8 que estaban presentes en el fluido corporal antes de la extracción. El fluido corporal puede ser plasma sanguíneo o cualquier otro fluido corporal, p. ej., linfa o líquido cefalorraquídeo.

La eliminación de autoanticuerpos específicos de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 y/o AQP8 se pueden realizar poniendo en contacto un fluido corporal con un polipéptido de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 y/o AQP8 o fragmento de los mismos. El polipéptido o fragmento de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 y/o AQP8 puede unirse a un soporte sólido. Dichos soportes sólidos pueden ser, sin limitación, membranas, fibras, perlas esféricas o gránulos y se pueden hacer con un material insoluble en agua, preferentemente poroso, biocompatible, p. ej., polímeros orgánicos tal como agarosa, dextrano y poliácridamida, o materiales porosos inorgánicos tales como vidrio poroso o gel de sílice poroso. Dichos materiales son adecuados o pueden adaptarse (por ejemplo, derivatizarse con grupos químicos apropiados) para la unión de polipéptido de AQP1, AQP2, AQP5, AQP7 y/o AQP8 o fragmento del mismo.

Puede administrarse una cantidad eficaz de un polipéptido de AQP1 a un sujeto para modular la respuesta inmunitaria mediada por AQP1 del sujeto. Por tanto, el polipéptido de AQP1 puede usarse en inmunoterapia para tratar un trastorno caracterizado por la presencia de autoanticuerpos de AQP1.

Por lo tanto, en el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o fragmento de AQP1.

Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender opcionalmente un transportador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptables. La elección del transportador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además de) el transportador, excipiente o diluyente cualquier aglutinante o aglutinantes, lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s) y otros agentes transportadores farmacéuticos que pueden ayudar o aumentar la entrada viral en el sitio diana (como por ejemplo un sistema de suministro de lípidos).

Cuando sea adecuado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante uno o más de: inhalación, en forma de supositorio o pesario, tópicamente en forma de loción, solución, crema, ungüento o polvo para espolvorear, mediante el uso de un parche cutáneo, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, ya sea solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intracavernosa, vía intravenosa, vía intramuscular o vía subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones se pueden utilizar mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones se pueden administrar en forma de comprimidos o pastillas para chupar que se pueden formular de manera convencional.

Los métodos para suministrar una composición al cerebro se conocen en la técnica. Por ejemplo, una composición de la invención se puede modificar uniendo un ligando (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) que

reconoce un receptor específico de cerebro o específico de neurona. Además, se conocen métodos para potenciar el transporte de moléculas a través de la barrera hematoencefálica y se aprovechan de la difusión pasiva (p. ej., utilizando campos electromagnéticos, donantes de óxido nítrico o caprato de sodio) o endocitosis mediada por receptores (p. ej., unión de la partícula del virus a, por ejemplo, un anticuerpo anti transferrina o a putrescina). También se pueden usar promotores específicos de cerebro o específicos de neuronas y/o elementos reguladores de la transcripción (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 5.976.872 o 6.066.726).

Un "sujeto" se refiere a un animal humano o no humano. Ejemplos de animales no humanos incluyen vertebrados, p. ej., mamíferos, tal como primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (por ejemplo, ratones, ratas o cobayas), cerdos y gatos, etc. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

A continuación, se describirán otras características y realizaciones preferidas de la presente invención mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1- Métodos

Sueros de pacientes

Los sueros de 362 pacientes para quienes sus médicos solicitaron una prueba de anticuerpos anti-AQP4, se utilizaron después del consentimiento informado; La selección de estos sueros fue la siguiente: 297 sueros fueron de casi todos los pacientes que solicitaron en la unidad de diagnóstico de los presentes inventores pruebas de anticuerpos NMO, independientemente de su resultado anti-AQP4 (35 de estos sueros eran anti-AQP4 positivos y 5 ambiguos). Los 65 sueros restantes se seleccionaron como anti-AQP4 positivos (49 sueros) o anti-AQP4 ambiguos (16 sueros). 110 de los 362 sueros eran de pacientes evaluados clínicamente en el Hospital Universitario de Aiginiteion. Además de los 362 sueros anteriores, también se probaron 20 pacientes con EM clásica, 51 pacientes con MG (positivos para anticuerpos antirreceptor de acetilcolina) y 100 sueros de controles sanos para determinar la presencia de anticuerpos anti-AQP1. Análisis retrospectivo, de datos por MRI, clínicos, citológicos y estadísticos, de pacientes positivos para anticuerpos anti-AQP1 con los siguientes datos disponibles.

AQP1, AQP2, AQP5, AQP4, AQP7 y AQP8

Se expresó AQP4 humana recombinante con etiqueta 6-his en el sistema de expresión de *Pichia pastoris* y se purificó mediante cromatografía en columna de Ni y filtración en gel. La AQP1 humana recombinante con etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST) se adquirió de Novus Biologicals; se expresó en un sistema de expresión de proteínas sin células de germen de trigo y se purificó mediante purificación por afinidad con glutatión inmovilizado. Las proteínas AQP2, AQP7 y AQP8 humanas recombinantes con una etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST) expresadas en el sistema de expresión de proteínas sin células de germen de trigo y purificadas por cromatografía de afinidad se adquirieron de Novus Biologicals, Cambridge, RU. El clon de ADNc de AQP5 se adquirió de OriGene Technologies Inc, Rockville, MD, y se expresó transitoriamente en células HEK293.

Ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA)

El RIPA generalmente implica la incubación del suero de prueba con antígeno radiomarcado, seguido de la adición de un suero anti-Ig para hacer un precipitado Ig/anti-Ig; si el suero de prueba tiene anticuerpos contra el antígeno marcado, este último se precipitará conjuntamente con el complejo de Ig dando como resultado un precipitado radiactivo. En nuestro RIPA, AQP1 o AQP4 humanas recombinantes se marcaron con ¹²⁵I indirectamente de la siguiente manera: se incubaron 0,25 nmoles de AQP con 5 nmoles de biotina. La AQP biotinilada se marcó indirectamente mediante incubación con ¹²⁵I-estreptavidina en una relación: 0,1 µg de AQP biotinilada con 50.000 cpm de ¹²⁵I-estreptavidina, durante 1 hora en hielo. Para el RIPA, se incubaron 5 µl (o menos) de suero de prueba durante 2 h a 25 ° C con 50 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) - tampón Triton X-100 al 0,5 %, con 0,1 µg de la AQP marcada indirectamente. Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de antisuero de anti inmunoglobulina humana de cabra y después de la incubación durante 2 h a 25 °C, el sedimento formado se lavó dos veces con 1 ml de tampón de ensayo (Triton X-100 al 0,5 % en PBS). Se contó la radiactividad en el sedimento lavado en un contador γ.

El promedio de los valores de cpm para los sueros de control humanos sanos (256 cpm), más 3SD (3x35 cpm), total 361 cpm, multiplicado por 1,4 (total 361x1,4 = 505 cpm) se consideró el punto de corte para sueros positivos mientras que multiplicado por 1,1 (361x1,1 = 397 cpm) se consideró el punto de corte para sueros "ambiguos". Cada 100 cpm por encima del fondo corresponde a anticuerpo 1 nM cuando se utilizan 5 µl de suero en el ensayo, por lo tanto, los puntos de corte ambiguos y positivos corresponden a concentraciones de anticuerpos 1,4 nM (397 cpm = 256 cpm de fondo promedio + 141 cpm extra; 141/100 = ~ 1,4 nM) y 2,5 nM (505 cpm = 256 cpm de fondo promedio + 249 cpm adicionales; 249/100 = ~ 2,5 nM).

También se probaron diez sueros positivos en este ensayo para determinar la unión a la misma cantidad de ¹²⁵I-estreptavidina en ausencia de acuaporina biotinilada. Precipitaron valores de cpm de fondo, similares a los de los controles de NHS, confirmando que los anticuerpos de hecho se unen a la AQP1-GST en lugar de a la estreptavidina

marcada. Para excluir la posibilidad de que algunos anticuerpos se unan al resto GST de la proteína de fusión AQP1-GST, se incubaron previamente 9 sueros anti-AQP1 y 4 anti-AQP4 durante 3 h con exceso de GST inmovilizado en perlas de sefarosa-glutatin (10 µl de suero con 1,6 µg de GST inmovilizado); después, se probaron 5 µl de los sueros tratados en RIPA con AQP1 o AQP4 marcadas. No se observó ninguna disminución en las cpm unidas, lo que confirma que los anticuerpos de los pacientes se unen realmente a la parte AQP1 de la proteína de fusión.

Por último, para verificar la razón por la que los sueros AQP1 positivos tratados previamente con polvo de hígado no pueden dar un resultado positivo en la IIF, se trataron previamente dos muestras de suero anti-AQP1 y dos anti-AQP4 (5 µl cada una diluida en 100 µl de tampón) con polvo de hígado de cobaya (20 mg cada una) durante 1 h. Después de la centrifugación, los sobrenadantes se probaron con AQP1 y AQP4 marcadas, respectivamente, y las cpm precipitadas se compararon con las de los sueros no tratados (diluidos de manera similar).

RIPA de dos etapas

En casos seleccionados también se utilizó, un radioinmunoensayo más sensible, basado en un método de inmunoensayo general muy sensible que desarrollaron los presentes inventores, como se describe en el documento PCT/IB2011/001014, que implica dos etapas (RIPA de dos etapas):

Etapa 1: Las placas de ELISA se sembraron con 50 µl de tampón de carbonato pH 9,6 que contenían 0,1 µg de AQP1 o AQP4 por pocillo, se incubaron durante 2 horas a 25 ° C, seguido de saturación con PBS-albúmina de suero bovino (PBS-BSA) al 1% durante 1 h a 25 °C. Después, se añadieron 0,15 ml de suero de prueba a cada pocillo y la muestra se incubó durante la noche a 4 °C con rotación constante. Los pocillos se lavaron secuencialmente 3 veces con PBS y una vez con glicina-HCl 0,1 M, pH 6. Después, se añadieron 50 µl de tampón de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5, a los pocillos lavados y se agitó durante 1 min. El líquido, que contenía los autoanticuerpos liberados se transfirió después a tubos de ensayo que contenían 10 µl de tampón Tris 0,375 M, pH 8,8, para neutralizar inmediatamente el pH.

Etapa 2: A la mezcla anterior, se añadieron 20 µl de tampón que contiene 0,1 µg de AQP biotinilada y 50.000 cpm marcadas con ¹²⁵I estreptavidina y 2 µl de transportador de NHS. Después de 6 horas de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de antisuero de cabra anti inmunoglobulina humana. Después de incubación durante 2 h, el sedimento formado se lavó dos veces con 1 ml de PBS-Triton X-100 al 0,5 % y la radiactividad del sedimento lavado se contó en un contador γ.

Caracterización del autoantígeno por inmunoprecipitación y ensayo de transferencia Western

Se incubaron sueros positivos anti-AQP1 y anti-AQP4 y NHS con 0,1 µg de preparación de AQP1 o AQP4 biotiniladas sin marcar, respectivamente. Después, las mezclas se incubaron con 10 µl de perlas de Sepharose con proteína A inmovilizada. Posteriormente se lavaron las perlas, se trataron con tampón de muestra para PAGE que contenía SDS al 2%, Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol al 10 %, azul de bromofenol al 0,1 % y β-mercaptoetanol al 2 % para liberar los anticuerpos unidos con cualquier AQP biotinilada unida y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en gradiente de 4-12 % y posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La detección se logró incubando las membranas con una dilución 1/500 de HRP-estreptavidina durante 16 h a 4 °C seguido de saturación con PBS-BSA al 3 % durante 1 h a 25 °C.

En paralelo, 0,01 y 1 µg de AQP1 biotinilada se ejecutaron directamente en PAGE, se transfirieron y se detectaron como anteriormente con HRP-estreptavidina para semicuantificar la proteína.

Inmunofluorescencia indirecta

Se realiza microscopía de inmunofluorescencia en secciones sagitales congeladas de cerebro entero de ratón no patológico en portaobjetos. Específicamente, las secciones se incuban con formalina al 10 % en PBS durante 4 min para la fijación, seguido de tres lavados en PBS. A continuación, se realiza el bloqueo, usando suero de caballo normal al 10 % en PBS durante 1 hora. Después, las secciones se incuban con sueros de pacientes y de control (1:60) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la sección tres veces con PBS, se aplica el anticuerpo secundario, Alexa-488 anti-IgG humana de cabra (dilución 1/200) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lava con PBS tres veces y se observa en un microscopio confocal. La seropositividad se indica cuando la IgG se une selectivamente a tejidos ricos en AQP1. A diferencia del método previamente normalizado para detectar anti-IgG de NMO (Lennon et al. (2004) Lancet 364(9451): 2106-2112), el suero no se absorbe previamente con polvo de hígado para evitar la eliminación de los anticuerpos anti-AQP1. Para superar el problema de fondo, los anticuerpos anti-AQP1 preferentemente, pero no necesariamente, se purifican parcialmente por cromatografía de afinidad en placas ELISA con AQP1 en placa.

Análisis retrospectivo de los datos de MRI y clínicos disponibles

Para 20 sueros anti-AQP1 positivos (5 anti-AQP4 positivos y 15 anti-AQP4 negativos) y 9 anti-AQP1 ambiguos (los 8 de los cuales eran anti-AQP4 negativos) se pudieron obtener datos clínicos detallados de los pacientes

correspondientes. Estos incluían: Estudio de MRI(cerebro, médula espinal y nervios ópticos), clínico (SNC, periferia, etc.) y citológico (albúmina plasmática y LCR).

Ejemplo 2 - Los anticuerpos específicos para AQP1 están presentes en pacientes con sospecha de NMO o síntomas similares a NMO

Se examinaron sueros de 362 pacientes, sospechosos de NMO, con RIPA para determinar anticuerpos anti-AQP1. Previamente, estos sueros se examinaron para determinar anticuerpos anti-AQP4 con RIPA de dos etapas más sensible y se habían identificado 84 de ellos como anti-AQP4 positivos. Se encontraron en total 70 sueros positivos para anticuerpos de AQP1 (Fig. 1). Se encontraron 44 sueros AQP1 positivos de los 278 AQP4 negativos o ambiguos (AQP1+/AQP4-; 16 %) y 26 sueros AQP1 positivos de los 84 AQP4 positivos (AQP1+/AQP4+; 31 %). Las relaciones M/F fueron 1:2,4 (13/31) para los pacientes AQP1+/AQP4-, 1:4,2 (5/21) para los pacientes AQP1+/AQP4+ y 1:4,3 (11/47) para los pacientes AQP1-/AQP4+. Es decir, los varones son considerablemente más frecuentes en el grupo de pacientes exclusivamente AQP1+ que en el grupo AQP4+ (con o sin anticuerpos anti-AQP1), aunque las mujeres siguen siendo más frecuentes en ambos grupos de enfermedad.

La Fig. 1 también muestra que 20 sueros de pacientes con EM clásica, 51 sueros de pacientes con MG, positivos para anticuerpos anti-AChR, y 100 sueros de controles sanos fueron todos negativos para anticuerpos anti-AQP1 (con 0, 3 y 1 sueros caracterizados como ambiguos, respectivamente). Estos datos sugieren que los anticuerpos anti-AQP1 son un biomarcador específico para una población de pacientes con lesiones desmielinizadas.

Se trataron previamente dos sueros anti-AQP1 positivos y dos anti-AQP4 positivos con polvo de hígado de cobaya; sus sobrenadantes se probaron con AQP1 y AQP4 marcadas, respectivamente, y se compararon con los de los sueros no tratados. Se encontró que el polvo de hígado prácticamente completamente (en un 99-100 %) adsorbía los anticuerpos anti-AQP1 mientras que no adsorbía en absoluto los anticuerpos anti-AQP4 (Fig. 2). Este hallazgo se basa en el hecho conocido de que el polvo de hígado contiene AQP1, pero no AQP4, y muestra claramente por qué los sueros AQP1 positivos tratados previamente con polvo de hígado no pueden dar fácilmente un resultado positivo en IIF. Por lo tanto, los autoanticuerpos para AQP1 por lo general podrían no detectarse con el ensayo de IIF habitual en tejidos de ratón utilizados para determinar anticuerpos NMO-IgG debido a que este ensayo, para reducir el fondo, generalmente implica el tratamiento del suero de prueba con polvo de hígado de cobaya, que circunstancialmente contiene AQP1 (Talbot et al. (2003) Cells Tissues Organs 174(3): 117-128) y, por lo tanto, cualquier autoanticuerpo para AQP1 en el suero de prueba se eliminaría y no se detectaría.

Ejemplo 3 - No existe correlación entre las concentraciones de anti-AQP1 y anti-AQP4 en sueros doble positivos (anti-AQP1 +/anti-AQP4 +)

Después se probó si, en el suero doble positivo, existe alguna correlación de concentraciones de anticuerpos entre los dos grupos de autoanticuerpos, lo que sería una indicación de una respuesta inmunitaria vinculada. La Fig. 3 representa gráficamente los niveles de anticuerpos anti-AQP1 frente a los niveles de anticuerpos anti-AQP4 de acuerdo con lo probado por RIPA normal. Está claro que no existe correlación entre los niveles de los dos grupos de anticuerpos en los sueros doble positivos. Asimismo, en la mayoría de los casos (9 frente a 5) los niveles de anti-AQP1 fueron más altos que los niveles de anticuerpos anti-AQP4. Esto sugiere que las dos respuestas inmunitarias son independientes en lugar de que una sea un subproducto/consecuencia de la otra.

Ejemplo 4 - Búsqueda de reactividad cruzada entre los dos grupos de anticuerpos (anti-AQP1 y anti-AQP4)

AQP1 y AQP4 pertenecen a la misma familia de proteínas y tienen una amplia homología de secuencia de aminoácidos. La presencia de sueros con anticuerpos anti-AQP1 solamente o anti-AQP4 solamente muestra que los dos grupos de anticuerpos (contra AQP1 o AQP4) difieren considerablemente y la unión a los dos antígenos no se debe únicamente a anticuerpos con reactividad cruzada. Para realizar pruebas de anticuerpos con reactividad cruzada, se agotaron los sueros seleccionados a partir de sus anticuerpos que se unen a un antígeno y se probaron los sueros agotados para determinar su unión a cualquiera de los antígenos. Específicamente, los sueros de prueba se trataron con AQP1 o AQP4 inmovilizadas (para inmunoabsorber todos los anticuerpos que se unen a AQP1 o AQP4 respectivamente) y posteriormente los sueros tratados se probaron mediante RIPA utilizando AQP1 y AQP4 marcadas con ¹²⁵I. La Fig. 4 muestra que la AQP1 inmovilizada eliminó prácticamente por completo los anticuerpos anti-AQP1 pero no redujo los valores anti-AQP4, y viceversa. Por lo tanto, no se pudo detectar una reactividad cruzada significativa de anticuerpos en los sueros probados.

Ejemplo 5 - Verificación de los anticuerpos anti-AQP1 en sueros de título bajo mediante el ensayo de dos etapas

Para explorar fácilmente los varios cientos de sueros para determinar anticuerpos anti-AQP1, en los experimentos descritos anteriormente, se utilizó RIPA normal en lugar de RIPA de dos etapas más sensible que los presentes inventores desarrollaron recientemente como se describe en el documento PCT/IB2011/001014. El RIPA de dos pasos se utilizó anteriormente para la detección de anticuerpos anti-AQP4 en estos sueros. Por tanto, es probable que algunos sueros con niveles bajos de anticuerpos anti-AQP1 escaparan a la detección. En este caso, los presentes inventores utilizaron la potencia del RIPA de dos etapas para la verificación de la positividad de algunos sueros

positivos bajos, como se detecta con el RIPA normal. La Fig. 5 confirma la positividad de algunos sueros positivos bajos (n.º 1,3,4,5,7,8) o ambiguos (n.º 2,6,9), mientras que el valor de Δcpm de dos NHS de "cpm altas" (el segundo tuvo la cpm precipitada más alta entre los 100 NHS probados) no aumentó, lo que sugiere que sus valores por encima del promedio probablemente se deben a factores no específicos (por ejemplo, posiblemente unión a una impureza menor en la preparación de AQP1) en lugar de a la presencia de autoanticuerpos anti-AQP1. También un suero ambiguo (n.º 10) permaneció ambiguo mediante el RIPA de dos etapas, lo que sugiere que puede no ser realmente positivo.

Ejemplo 6 - Caracterización bioquímica del autoanticuerpo-diana de los sueros anti-AQP1

Para caracterizar bioquímicamente además la diana de los sueros anti-AQP1, utilizando tres sueros anti-AQP1 positivos se inmunoprecipitaron los complejos anticuerpo-antígeno y se identificó el antígeno unido mediante PAGE seguido de transferencia Western. Específicamente, los sueros se incubaron con AQP1 biotinilada seguido de precipitación con perlas de Sepharose-proteína A. Se liberó la AQP1 unida indirectamente a las perlas (a través de los autoanticuerpos unidos), se ejecutó en PAGE y se revelaron mediante transferencia Western usando HRP-estreptavidina y su sustrato. La semicuantificación de la AQP1 precipitada se logró mediante la comparación de la intensidad de las bandas mediante las del análisis en paralelo de cantidades específicas de AQP1 biotinilada sometidas directamente a PAGE y análisis de transferencia Western.

La Fig. 6 muestra que el antígeno tiene el peso molecular aparente de la proteína de fusión AQP1-GST (~ 55 KD) y de su dímero (aparentemente debido a la dimerización de GST), y que los anticuerpos del suero (especialmente los del suero 1) se unieron al menos a una gran fracción de la proteína usada (en comparación con la intensidad de las bandas del marcador de AQP1) excluyendo así la posibilidad de que su antígeno sea una impureza en la preparación de AQP1 con PM similar con AQP1.

Ejemplo 7 - Identificación del patrón de unión de anticuerpos de AQP1 en cerebro de ratón con IIF

Curiosamente, en seres humanos (pero no en ratones), AQP1 tiene una distribución de tipo celular similar con AQP4 en los astrocitos (Sato, Tabunoki et al. 2007; Moftakhar, Lynch et al. 2010). Sin embargo, los autoanticuerpos para AQP1 pueden no detectarse con el ensayo de IIF habitual en tejidos de ratón utilizados para determinar anticuerpos NMO-IgG debido a que a. este ensayo, para reducir el fondo, generalmente implica el tratamiento del suero de prueba con polvo de hígado de cobaya, que circunstancialmente contiene AQP1 (Talbot, Garrett et al. 2003) y, por lo tanto, cualquier autoanticuerpo para AQP1 en el suero de prueba se eliminaría y no se detectaría; y b. incluso si se supera este problema, los astrocitos de ratón no expresan AQP1.

No se prefiere la eliminación de la etapa de polvo de hígado cuando se utilizan sueros intactos, ya que daría como resultado un fondo relativamente alto. Sin embargo, el aislamiento de anticuerpos anti-AQP1 y anti-AQP4 mediante cromatografía de afinidad puede permitir la omisión de la etapa de polvo de hígado.

Se aislaron anticuerpos anti-AQP1 de sueros de pacientes AQP1+ (y de AQP4+ y NHS, como controles negativos) mediante cromatografía de afinidad utilizando AQP1 inmovilizada. Con muestras purificadas de sueros positivos para anticuerpos AQP1, se detectó un nuevo patrón específico correspondiente a la expresión de AQP1 en el plexo coroideo en el cerebro de ratón. Las muestras correspondientes "purificadas" de sueros AQP4+ y de NHS no dieron como resultado una tinción significativa. Cuando se utilizaron sueros completos sin tratar con anticuerpos anti-AQP1 (sin tratamiento con polvo de hígado) se observó un patrón de tinción similar, pero el fondo (por el uso de NHS) fue relativamente alto.

Ejemplo 8 - Hallazgos clínicos/de MRI y citológicos en pacientes positivos para anticuerpos anti-AQP1

La mayoría de los sueros de prueba se obtuvieron de pacientes durante el diagnóstico habitual de anticuerpos anti-AQP4, con datos clínicos mínimos disponibles. Se estudiaron en detalle los datos clínicos de 15 pacientes con anticuerpos anti-AQP1 (anti-AQP1+) solamente. Un análisis retrospectivo de MRI mostró que 3 de ellos tenían NMO (mielitis transversa longitudinal extensa con neuritis óptica), 7 tenían mielitis transversa longitudinal extensa solamente con lesiones cerebrales atípicas para EM, uno tenía mielitis transversa solamente, mientras que 4 tenían EM (sin embargo, con lesiones predominantemente de la médula espinal, las dos que tenían mielitis transversa longitudinal extensa). De manera importante, tres de los 15 pacientes también tenían neoplasias (nefoma, linfoma no de Hodgkin o cáncer de mama), sugiriendo los autoanticuerpos anti-AQP1 como un posible marcador paraneoplásico novedoso.

Los hallazgos de los presentes inventores sugieren la identificación de un grupo específico de trastornos desmielinizados, distintos de EM clásica y probablemente distintos de NMO "clásica" con anticuerpos anti-AQP4 solamente. AQP4 y AQP1 tienen una distribución diferente en el SNC, con AQP4 expresada predominantemente en la sustancia gris (cerebro y médula espinal) y AQP1 en la sustancia blanca solamente. Debido a que los pacientes positivos para anticuerpos AQP1 solamente pueden tener desmielinización en la sustancia blanca solamente, los presentes inventores creen que el nuevo marcador, anticuerpos anti-AQP1, es específico para un nuevo trastorno autoinmunitario desmielinizado, probablemente cercano al anti-AQP4 que contiene NMO ("NMO clásico").

Además del SNC, también se ha detectado AQP1 en el sistema nervioso periférico (Ma, T. H., H. W. Gao, et al. (2011) Acta Pharmacol Sin 32(6): 711-715) y en tejidos no neuronales como los glóbulos rojos, hígado, riñón y pulmones. Por lo tanto, los autoanticuerpos para AQP1 pueden estar implicados y servir como marcadores en enfermedades relevantes, incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria idiopática (por ejemplo, algunos pacientes mejoran con cortisona o incluso rituximab), enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neuropatías periféricas autoinmunitarias.

Ejemplo 9 - Inmunoabsorción de anticuerpos anti-AQP1 de sueros de pacientes - indicaciones terapéuticas

Después los presentes inventores probaron si el autoantígeno, AQP1, cuando se inmoviliza, podría usarse para la eliminación de los autoanticuerpos anti-AQP1 del suero de los pacientes. AQP1 se inmovilizó en placas ELISA; a las placas se añadió suero anti-AQP1 positivo y se incubó. Después, se probó el suero tratado por RIPA para determinar si el suero estaba agotado de los autoanticuerpos. La Fig. 7 muestra que el suero estaba prácticamente agotado de todos los autoanticuerpos anti-AQP1. Este experimento sugiere que es posible utilizar AQP1 inmovilizada o sus fragmentos y mutantes, para eliminar específicamente los anticuerpos del paciente de la circulación, durante el procedimiento de inmunoabsorción *ex vivo* con fines terapéuticos.

Ejemplo 10 - Detección de anticuerpos para AQP-2, -5, -7 y -8 en sueros de pacientes sospechosos de tener NMO/NMOsd

Los presentes inventores examinaron sueros de 362 pacientes (descritos en el Ejemplo 1), sospechosos de NMO, para determinar la presencia de anticuerpos para AQP2, -5, -7 y -8. Los anticuerpos para AQP5 se detectaron mediante el procedimiento de ensayo basado en células establecido en Waters, P. et al. (2008). "Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis." Arch Neurol 65(7): 913-919. Los anticuerpos para AQP2, -7 y -8 se detectaron mediante RIPA simple (no RIPA de dos etapas) descrito en el Ejemplo 1.

La Tabla 1 muestra que se detectaron anticuerpos para la mayoría de estas AQP en algunos sueros de prueba, aunque con menor frecuencia que los anticuerpos anti-AQP1/4, pero no en sueros de controles sanos. La mayoría de los sueros positivos tenían anticuerpos para una sola AQP (11 sueros), pero 5 sueros tenían anticuerpos para más de una AQP: Un suero fue positivo para tres AQP (AQP 1, 2 y 8), dos sueros dieron positivo para AQP 1 y 8, uno para AQP 4 y 8, y un suero fue positivo para AQP 1 y 5.

Tabla 1. Detección de anticuerpos para AQP-2, -5, -7 y -8 en sueros de pacientes con sospecha de síntomas similares a los de NMO

	Detección de anticuerpos para:			
	AQP2	AQP5	AQP7	AQP8
Sueros probados de:	Positivo/total probado			
Pacientes con sospecha de síntomas similares a NMO	3/86 (3,5 %)	2/22 (9 %)	4/65 (6,2 %)	8/138 (5,8 %)
Controles sanos	0/28	0/9	0/12	0/55

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia sin apartarse del alcance I de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en bioquímica, inmunología y la biotecnología o campos relacionados están destinadas a estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tzartos, Sócrates

<120> Biomarcador

<130> P045457PCT

<150> GR 20110100593

<151> 17/10/2011

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 850

<212> ADN

ES 2 823 652 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gtacaaaaaa gcaggctcca ccatggccag cgagttcaag aagaagctct tctggagggc      60
agtggtggcc gagttcctgg ccacgaccct ctttgtcttc atcagcatcg gttctgccct      120
gggcttcaaa taccggtgg ggaacaacca gacgacggtc caggacaacg tgaaggtgtc      180
gctggccttc gggctgagca tcgccacgct ggcgcagagt gtgggccaca tcagcggcgc      240
ccacctcaac ccggctgtca cactggggct gctgctcagc tgccagatca gcattctccg      300
tgccctcatg tacatcatcg ccagtgcggt gggggccatc gtgccaccg ccattctctc      360
aggcatcacc tcctccctga ctgggaactc gcttggccgc aatgacctgg ctgatggtgt      420
gaactcgggc cagggcctgg gcacgcagat catcgggacc ctccagctgg tgctatgcgt      480
gctggctact accgaccgga ggcgccgtga ccttgggtggc tcagccccc ttgccatcgg      540
cctctctgta gcccttggac acctcctggc tattgactac actggctgtg ggattaaccc      600
tgctcgggtcc tttggctccg cggatgatcac acacaacttc agcaaccact ggattttctg      660
ggtggggcca ttcacgggg gagccctggc tgtactcatc tacgacttca tcctggcccc      720
acgcagcagt gacctcacag accgcgtgaa ggtgtggacc agcggccagg tggaggagta      780
tgacctggat gccgacgaca tcaactccag ggtggagatg aagcccaaat tggaccacgc      840
tttcttgtac                                     850

```

5

<210> 2

<211> 269

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Ser Glu Phe Lys Lys Lys Leu Phe Trp Arg Ala Val Val Ala
1           5           10           15

```

15

ES 2 823 652 T3

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

ES 2 823 652 T3

<211> 995
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <400> 3

```

agtgcgagag cgagtgcccg gagcatcctg gccctgagac agctggggcca gccccgcagg      60
gctctgcagc atgtgggagc tccgctccat agccttctcc agggctgtgt tcgcagagtt      120
cctggccaca ctctctctcg tcttcttttg cctcggtctt gccctcaact ggccacaggc      180
cctgccctct gtgctacaga ttgccatggc gtttggttg ggtattggca ccctggtaca      240
ggctctgggc cacataagcg gggcccat caaccctgcc gtgactgtgg cctgcctggg      300
gggctgccac gtctccgttc tccgagccgc cttctacgtg gctgcccagc tgctgggggc      360
tgtggccgga gccgctctgc tccatgagat cacgccagca gacatccgcg gggacctggc      420
tgtcaatgct gtgagtagcc acaactttgc tcttctctgt cccagctca gcaacagcac      480
gacggctggc caggcgggtga ctgtggagct cttcctgaca ctgcagctgg tgctctgcat      540
cttcgcctcc accgatgagc gccgcggaga gaaccggggc acccctgctc tctccatagg      600
cttctccgtg gccctgggce acctccttgg ggtaggatcat ggccatgcc tctcccact      660
gcagatccat tacaccggt gctctatgaa tcctgcccgc tccctggctc cagctgtcgt      720
cactggcaaa tttgatgacc actgggtaat ggctgaatcc gctcgcccc aggtcttctg      780
gatcggaccc ctggtgggcg ccatacctggg ctcctcctc tacaactacg tgctgtttcc      840
gccagccaag agcctgtcgg agcgcctggc agtgctgaag ggcctggagc cggacaccga      900
ttgggaggag cgcgaggtgc gacggcgcca gtcggtggag ctgcactcgc cgcagagcct      960
gccacggggg accaaggcct gagggccgcc agcgg      995

```

<210> 4
<211> 271
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 4

15

```

Met Trp Glu Leu Arg Ser Ile Ala Phe Ser Arg Ala Val Phe Ala Glu
1           5           10           15

Phe Leu Ala Thr Leu Leu Phe Val Phe Phe Gly Leu Gly Ser Ala Leu
20           25           30

Asn Trp Pro Gln Ala Leu Pro Ser Val Leu Gln Ile Ala Met Ala Phe
35           40           45

Gly Leu Gly Ile Gly Thr Leu Val Gln Ala Leu Gly His Ile Ser Gly
50           55           60

```

ES 2 823 652 T3

Ala	His	Ile	Asn	Pro	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Cys	Leu	Val	Gly	Cys	His	65	70	75	80
Val	Ser	Val	Leu	Arg	Ala	Ala	Phe	Tyr	Val	Ala	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	85	90	95	
Ala	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	His	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Asp	Ile	100	105	110	
Arg	Gly	Asp	Leu	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Thr	Thr	Ala	Gly	115	120	125	
Gln	Ala	Val	Thr	Val	Glu	Leu	Phe	Leu	Thr	Leu	Gln	Leu	Val	Leu	Cys	130	135	140	
Ile	Phe	Ala	Ser	Thr	Asp	Glu	Arg	Arg	Gly	Glu	Asn	Pro	Gly	Thr	Pro	145	150	155	160
Ala	Leu	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	His	Leu	Leu	Gly	Ile	165	170	175	
His	Tyr	Thr	Gly	Cys	Ser	Met	Asn	Pro	Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Pro	Ala	180	185	190	
Val	Val	Thr	Gly	Lys	Phe	Asp	Asp	His	Trp	Val	Phe	Trp	Ile	Gly	Pro	195	200	205	
Leu	Val	Gly	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn	Tyr	Val	Leu	Phe	210	215	220	
Pro	Pro	Ala	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	Arg	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Gly	Leu	225	230	235	240
Glu	Pro	Asp	Thr	Asp	Trp	Glu	Glu	Arg	Glu	Val	Arg	Arg	Arg	Gln	Ser	245	250	255	
Val	Glu	Leu	His	Ser	Pro	Gln	Ser	Leu	Pro	Arg	Gly	Thr	Lys	Ala		260	265	270	

<210> 5
 <211> 848
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 823 652 T3

```

gggtccgtgg gtctgtcctc tgtgggggtgg ggggcaggtc ttcaaggtct gggctcagcg      60
ccctgactcg tgccctgtct ccaccaggtt ttctgggtag ggcccatcgt gggggcggtc      120

ctggctgcca tcctttactt ctacctgctc tcccccaact ccctgagcct gagtgagcgt      180
gtggccatca tcaaaggcac gtatgagcct gacgaggact gggaggagca gcgggaagag      240
cggaagaaga ccatggagct gaccacccgc tgaccagtgt caggcagggg ccagcccctc      300
agcccctgag ccaaggggga aaagaagaaa aagatcctaa cacaagcttc ctttttgcac      360
aaccggtcct cttggctgag gaggaggagc tggtcaccct ggctgcacag ttagagaggg      420
gagaaggaac ccatgatggg actcctgggg taggggccag gggctggggg ctgctgggga      480
caggtctctc tgggacagac ctcaagatt ctcaatgcag tgccaagctc acaggctgca      540
agggccaggc cagaaaaggg tgggcctgca gcctgcaccc cccaccttcc ccaacccttc      600
ctcaagagct gaagggatcc cagaccctag gtgggcagag gcagaccctc cccagagctc      660
cttaggaaga agacagactg gttcattgaa tgccgcctta tttatttctg gtgaggatgc      720
atgcgtgggg ctgctggtct ttagagtggg ggctacccaa taaatcactg atactcacat      780
tccgcctctg tctctcctca gagtgccttg agacactctg cccattgcc tctcctcttt      840
gtcatccc      848

```

5 <210> 6
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

ES 2 823 652 T3

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

ES 2 823 652 T3

Ala	Arg	Gly	Asn	Leu	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Asn	Thr	Thr	Gln
		115					120					125			
Gly	Gln	Ala	Met	Val	Val	Glu	Leu	Ile	Leu	Thr	Phe	Gln	Leu	Ala	Leu
		130					135					140			
Cys	Ile	Phe	Ala	Ser	Thr	Asp	Ser	Arg	Arg	Thr	Ser	Pro	Val	Gly	Ser
145						150				155					160
Pro	Ala	Leu	Ser	Ile	Gly	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	His	Leu	Val	Gly
					165					170					175
Ile	Tyr	Phe	Thr	Gly	Cys	Ser	Met	Asn	Pro	Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Pro
			180						185					190	
Ala	Val	Val	Met	Asn	Arg	Phe	Ser	Pro	Ala	His	Trp	Val	Phe	Trp	Val
			195					200					205		
Gly	Pro	Ile	Val	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	Tyr	Phe	Tyr	Leu
	210					215					220				
Leu	Phe	Pro	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Arg	Val	Ala	Ile	Ile	Lys
225					230					235					240
Gly	Thr	Tyr	Glu	Pro	Asp	Glu	Asp	Trp	Glu	Glu	Gln	Arg	Glu	Glu	Arg
				245					250					255	
Lys	Lys	Thr	Met	Glu	Leu	Thr	Thr	Arg							
			260					265							

<210> 7
 <211> 1258
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7

ggctctggac tggggacaca gggatagctg agccccagct ggggggtggaa gctgagccag	60
ggacagtcac ggaggaacaa gatcaagatg cgctgtaact gagaagcccc caaggcggag	120
gctgagaatc agagacattt cagcagacat ctacaaatct gaaagacaaa acatgggttca	180
agcatccggg cacaggcggg ccacccgtgg ctccaaaatg gtctcctggg ccgtgatagc	240
aaagatccag gaaataactgc agaggaagat ggtgcgagag ttcctggccg agttcatgag	300
cacatatgtc atgatgggat tccggccttgg ttccgtggcc catatgggtc taaataaaaa	360
atatgggagc taccttgggtg tcaacttggg ttttggcttc ggagtcacca tgggagtgca	420
cgtggcaggc cgcattctctg gagcccacat gaacgcagct gtgaccttg ctaactgtgc	480
gctgggccgc gtgccctgga ggaagtttcc ggtctatgtg ctggggcagt tcctgggctc	540
cttctggcg gctgccacca tctacagtct cttctacacg gccattctcc acttttcggg	600
tggacagctg atggtgaccg gtcccgtcgc tacagctggc atttttgcca cctaccttcc	660
tgatcacatg acattgtggc ggggcttcct gaatgaggcg tggtgaccg ggatgctcca	720
gctgtgtctc ttcccatca cggaccagga gaacaacca gcactgccag gaacagaggc	780
gctggtgata ggcatcctcg tggatcatcat cggggtgtcc cttggcatga acacaggata	840
tgccatcaac ccgtcccggg acctgcccc ccgcattctc accttcattg ctggttgggg	900
caaacaggtc ttcagcaatg gggagaactg gtggtgggtg ccagtgggtg caccattct	960
gggtgcctat ctaggtggca tcatctacct ggtcttcatt ggctccacca tcccacggga	1020
gcccctgaaa ttggaggatt ctgtggcgta tgaagaccac gggataaccg tattgcccga	1080
gatgggatct catgaacca cgatctctcc cctcaccccc gtctctgtga gccctgcccga	1140
cagatcttca gtccaccctg cccacacctt acatgaatcc atggccctag agcacttcta	1200
agcagagatt atttgtgatc ccatccattc cccaataaag caaggcttgt ccgacaaa	1258

<210> 8
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 823 652 T3

Met Val Gln Ala Ser Gly His Arg Arg Ser Thr Arg Gly Ser Lys Met
1 5 10 15

Val Ser Trp Ser Val Ile Ala Lys Ile Gln Glu Ile Leu Gln Arg Lys
20 25 30

Met Val Arg Glu Phe Leu Ala Glu Phe Met Ser Thr Tyr Val Met Met
35 40 45

Val Phe Gly Leu Gly Ser Val Ala His Met Val Leu Asn Lys Lys Tyr
50 55 60

Gly Ser Tyr Leu Gly Val Asn Leu Gly Phe Gly Phe Gly Val Thr Met
65 70 75 80

Gly Val His Val Ala Gly Arg Ile Ser Gly Ala His Met Asn Ala Ala
85 90 95

Val Thr Phe Ala Asn Cys Ala Leu Gly Arg Val Pro Trp Arg Lys Phe
100 105 110

Pro Val Tyr Val Leu Gly Gln Phe Leu Gly Ser Phe Leu Ala Ala Ala
115 120 125

ES 2 823 652 T3

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

<210> 9
 <211> 1309
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

ES 2 823 652 T3

taggagataa	gagtatcttg	cacagcaggt	gcaggtttcc	cagcagctca	ggcaagagtc	60
cgatgtttgt	gccatctgat	cctgatgtct	ggagagatag	ccatgtgtga	gcctgaatth	120
ggcaatgaca	aggccagggg	gccgagcgtg	ggtggcaggt	ggcgagtgtc	ctggtacgaa	180
cggtttgtgc	agccatgtct	ggtcgaactg	ctgggctctg	ctctcttcat	cttcatcggg	240
tgcctgtcgg	tcattgagaa	tgggacggac	actgggctgc	tgcagccggc	cctggcccac	300
gggctggctt	tggggctcgt	gattgccacg	ctgggggaata	tcagtgggtg	acacttcaac	360
cctgcgggtg	ccctggcagc	catgctgata	ggaggcctca	acctgggtgat	gctcctcccg	420
tactgggtct	cacagctgct	cgggggggatg	ctcggggctg	ccttggccaa	ggtgggtgagt	480
cctgaggaga	ggttctggaa	tgcatactggg	gcggcctttg	tgacagtcca	ggagcagggg	540
caggtggcag	gggcgttggt	ggcagagata	atcctgacga	cgctgctggc	cctggctgta	600
tgcatagggtg	ccatcaatga	gaagacaaaag	ggccctctgg	ccccgttctc	catcggtctt	660
gccgtcaccg	tggatatcct	ggctggggggc	cctgtgtctg	gaggctgcat	gaatcccgcc	720
cgtgcttttg	gacctgcggg	ggtggccaac	cactggaact	tccactggat	ctactggctg	780
ggcccaactcc	tggctggcct	gcttggttga	ctgctcatta	ggtgcttcat	tggagatggg	840
aagaccgcgc	tcatactgaa	ggctcgggtga	gcagagctcg	tgggattcct	gctgctccag	900
gtgtcctcag	ctcacctgtc	ccagactgag	gacaggggag	ttcctgcatt	tcctgccagg	960
gcagaggccc	agaggagcga	ccccctgctt	ccactgcttg	ggcctgcttt	ctcagataga	1020
ctgactgctg	aggaggctct	aggttcttgg	aattcctttg	tgctcatcag	agaccccagc	1080
ctggggaaca	cgctgcccgc	actgcccaga	gagcagtgca	aacaccacaa	cacgagcgtg	1140
tttcttgaga	ggaatgtccc	cgagttggac	aaggaggctg	tttctgcaca	tcagctcatt	1200
tcccgacccc	catttcttgc	ttgattgctt	tgttggggggc	ctggccactt	ccttgcttct	1260
caagctgaca	attctcactt	tgcaataaat	agtccagtgt	ttccttcat		1309

<210> 10
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 823 652 T3

Met Ser Gly Glu Ile Ala Met Cys Glu Pro Glu Phe Gly Asn Asp Lys
1 5 10 15

Ala Arg Glu Pro Ser Val Gly Gly Arg Trp Arg Val Ser Trp Tyr Glu
20 25 30

Arg Phe Val Gln Pro Cys Leu Val Glu Leu Leu Gly Ser Ala Leu Phe
35 40 45

ES 2 823 652 T3

Ile	Phe	Ile	Gly	Cys	Leu	Ser	Val	Ile	Glu	Asn	Gly	Thr	Asp	Thr	Gly	50	55	60	
Leu	Leu	Gln	Pro	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Ile	65	70	75	80
Ala	Thr	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Gly	Gly	His	Phe	Asn	Pro	Ala	Val	Ser	85	90	95	
Leu	Ala	Ala	Met	Leu	Ile	Gly	Gly	Leu	Asn	Leu	Val	Met	Leu	Leu	Pro	100	105	110	
Tyr	Trp	Val	Ser	Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Met	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	115	120	125	
Lys	Ala	Val	Ser	Pro	Glu	Glu	Arg	Phe	Trp	Asn	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	130	135	140	
Phe	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Gln	Gly	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Ala	145	150	155	160
Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Cys	Met	Gly	Ala	165	170	175	
Ile	Asn	Glu	Lys	Thr	Lys	Gly	Pro	Leu	Ala	Pro	Phe	Ser	Ile	Gly	Phe	180	185	190	
Ala	Val	Thr	Val	Asp	Ile	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Gly	Gly	Cys	195	200	205	
Met	Asn	Pro	Ala	Arg	Ala	Phe	Gly	Pro	Ala	Val	Val	Ala	Asn	His	Trp	210	215	220	
Asn	Phe	His	Trp	Ile	Tyr	Trp	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	225	230	235	240
Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Phe	Ile	Gly	Asp	Gly	Lys	Thr	Arg	Leu	245	250	255	
Ile	Leu	Lys	Ala	Arg												260			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto en donde el método comprende detectar autoanticuerpos de acuaporina-1 (AQP1) en una muestra obtenida de dicho sujeto.
- 10 2. Un método para monitorizar el progreso de una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del SNC en un sujeto que comprende las etapas de:
 - (i) proporcionar una primera muestra obtenida del sujeto,
 - (ii) detectar autoanticuerpos de AQP1 en dicha primera muestra,
 - (iii) proporcionar una segunda muestra del sujeto en donde dicha segunda muestra se obtiene del sujeto después de dicha primera muestra,
 - (iv) comparar el nivel de los autoanticuerpos de AQP1 en la segunda muestra con el nivel correspondiente de autoanticuerpos de AQP1 en la primera muestra, en donde un aumento en el nivel de autoanticuerpos de AQP1 en la segunda muestra con respecto a la primera muestra indica progresión de la enfermedad.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la segunda muestra se obtiene del sujeto al menos 10, 20, 50, 100, 200 o 300 días después de la primera muestra y/o en donde el método es para monitorizar la progresión de la enfermedad en respuesta al tratamiento de dicha enfermedad.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde los autoanticuerpos de AQP1 se detectan poniendo en contacto dicha muestra con el polipéptido de AQP1, o con una célula o tejido que comprende dicho polipéptido, y detectando la presencia o ausencia de unión de dichos autoanticuerpos de AQP1 a dicho polipéptido de AQP1, célula o tejido.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra es tejido nervioso, sangre, células sanguíneas, plasma sanguíneo, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde los autoanticuerpos de AQP1 se detectan mediante un inmunoensayo.
- 35 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el inmunoensayo se selecciona de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de inmunofluorescencia (IFA), ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIF) ensayo ligado a enzimas (EIA), inmunoensayo de luminiscencia (LIA), ensayo de transferencia Western (WB) y ensayo basado en células (CBA).
- 40 8. Un polipéptido de AQP1 o una célula o tejido que comprende dicho polipéptido, para su uso en el diagnóstico de una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del SNC.
- 45 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el método comprende además detectar autoanticuerpos de acuaporina-4 (AQP4).
- 50 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 9, o un polipéptido de AQP1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la enfermedad autoinmunitaria es Neuromielitis Óptica (NMO).
11. Un polipéptido de AQP1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la presencia de o niveles elevados de, autoanticuerpo de AQP1 en donde dicha enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria asociada con la formación de lesiones desmielinizadas del SNC.
12. Un polipéptido de AQP1 de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el polipéptido de AQP1 se incorpora a una partícula tal como una nanopartícula o un liposoma.

Fig. 1. Detección de anticuerpos anti-AQP1 en los sueros de los grupos de pacientes y controles sanos determinados mediante ensayo RIPA

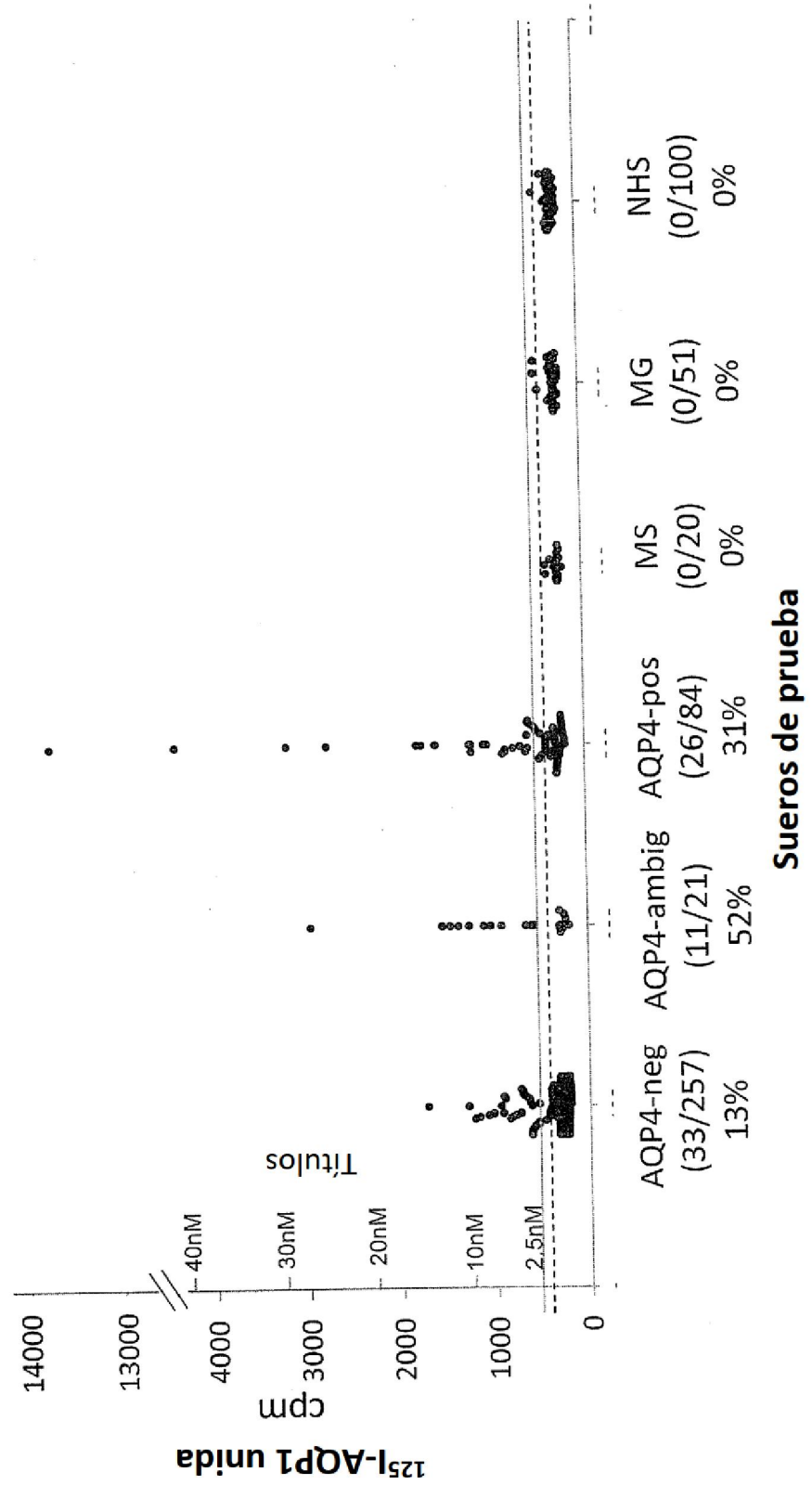


Fig. 2. Efecto del tratamiento con polvo de hígado de los sueros en la detección de anticuerpos anti-AQP1

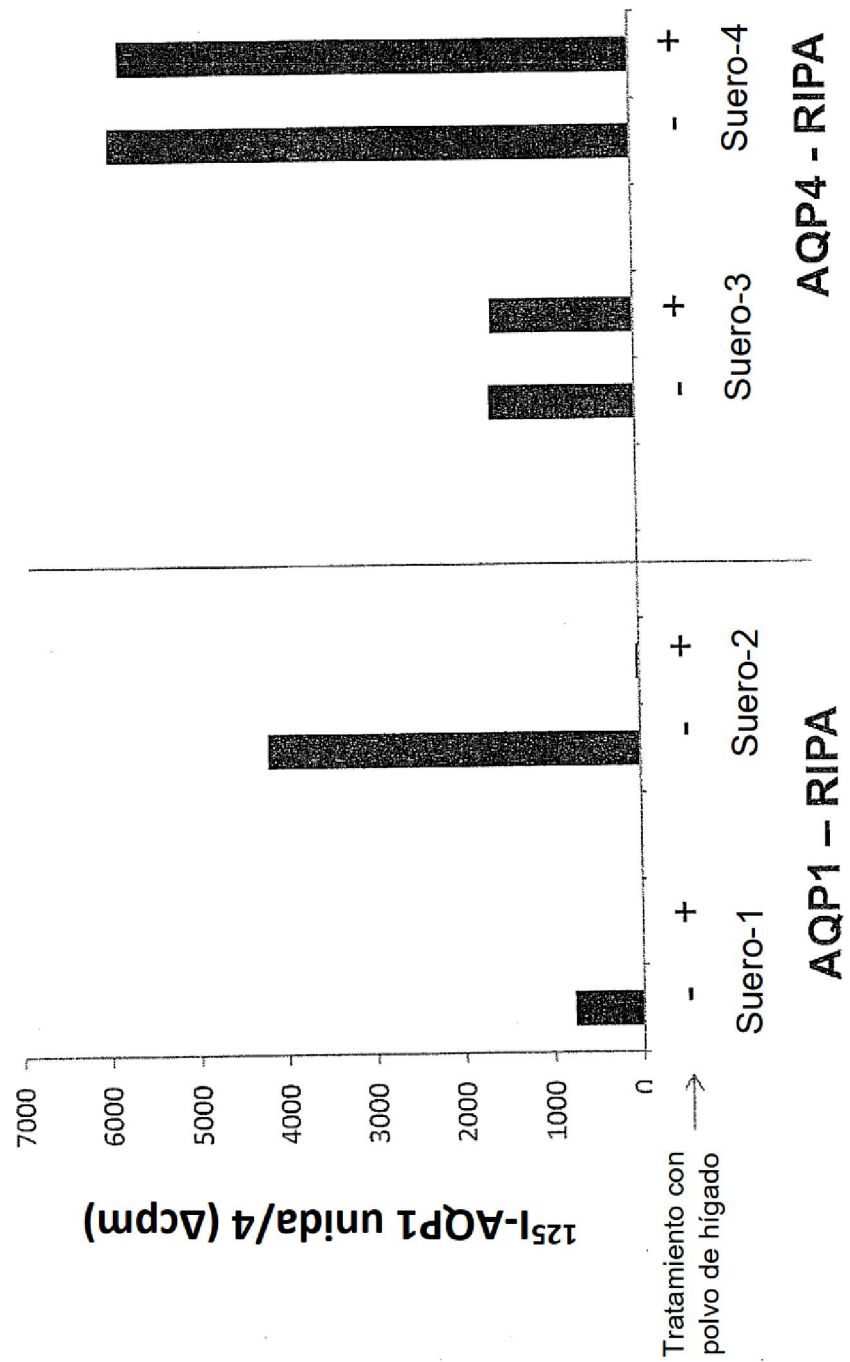


Fig.3. Representación gráfica de los valores de Δcpm precipitadas en sueros doble positivos, para anticuerpos anti-AQP1 frente a anti-AQP4

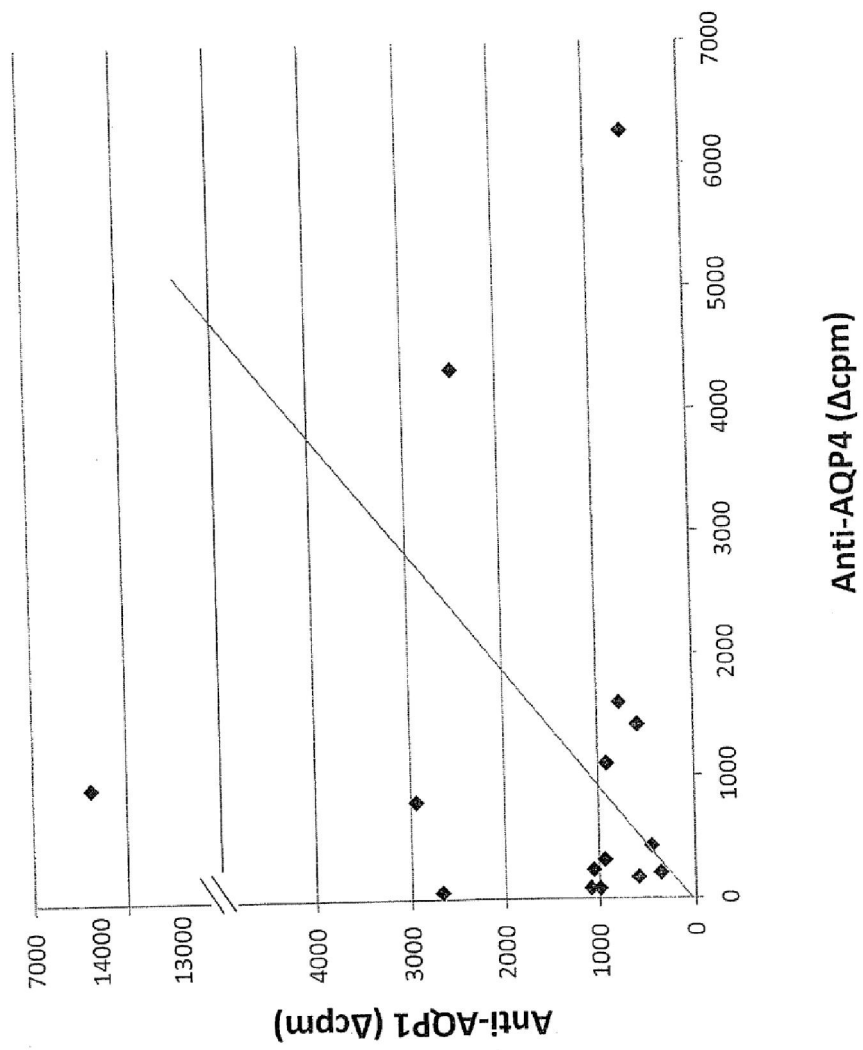


Fig. 4 - Búsqueda de reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-AQP1 y anti-AQP4

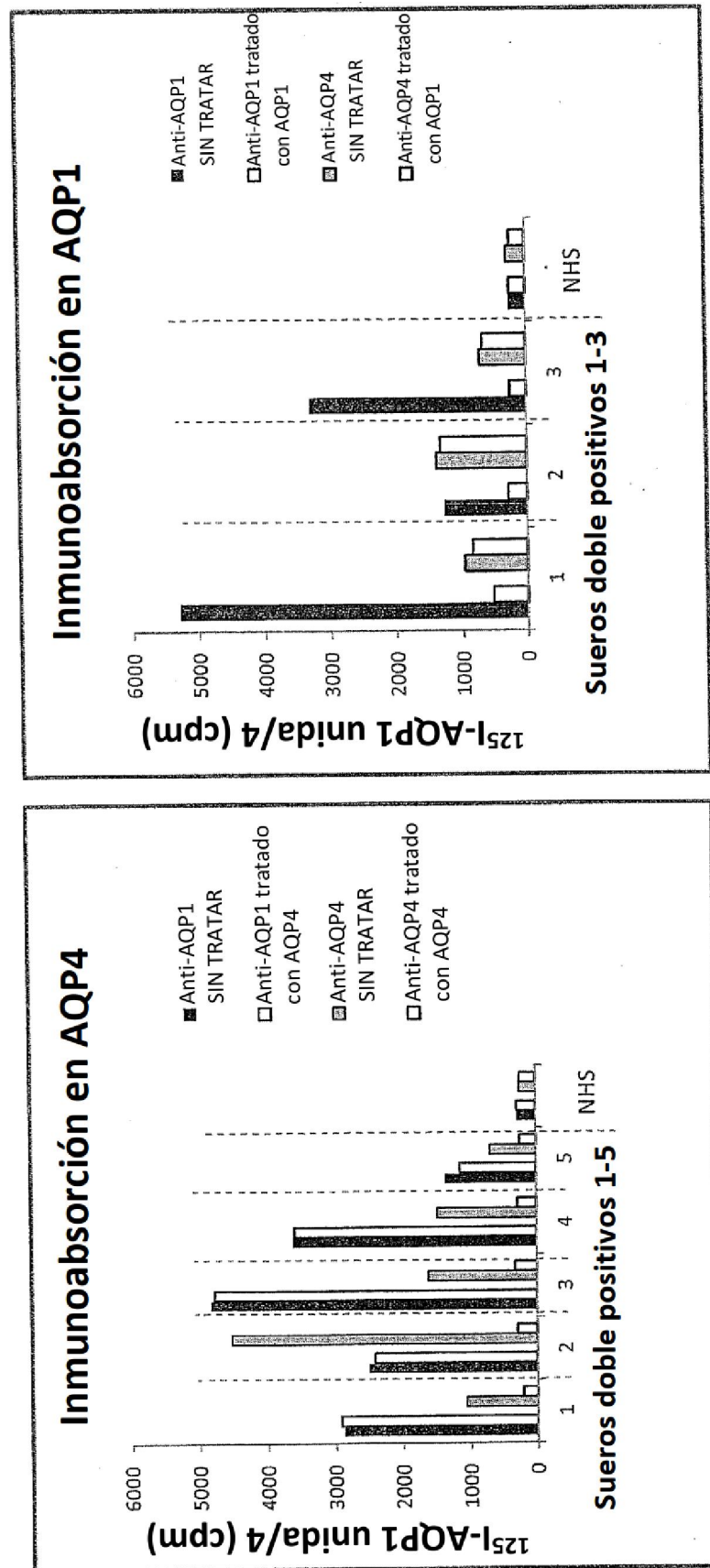


Fig. 5 - Detección de niveles bajos de anticuerpos anti-AQP1 por RIPA de dos etapas

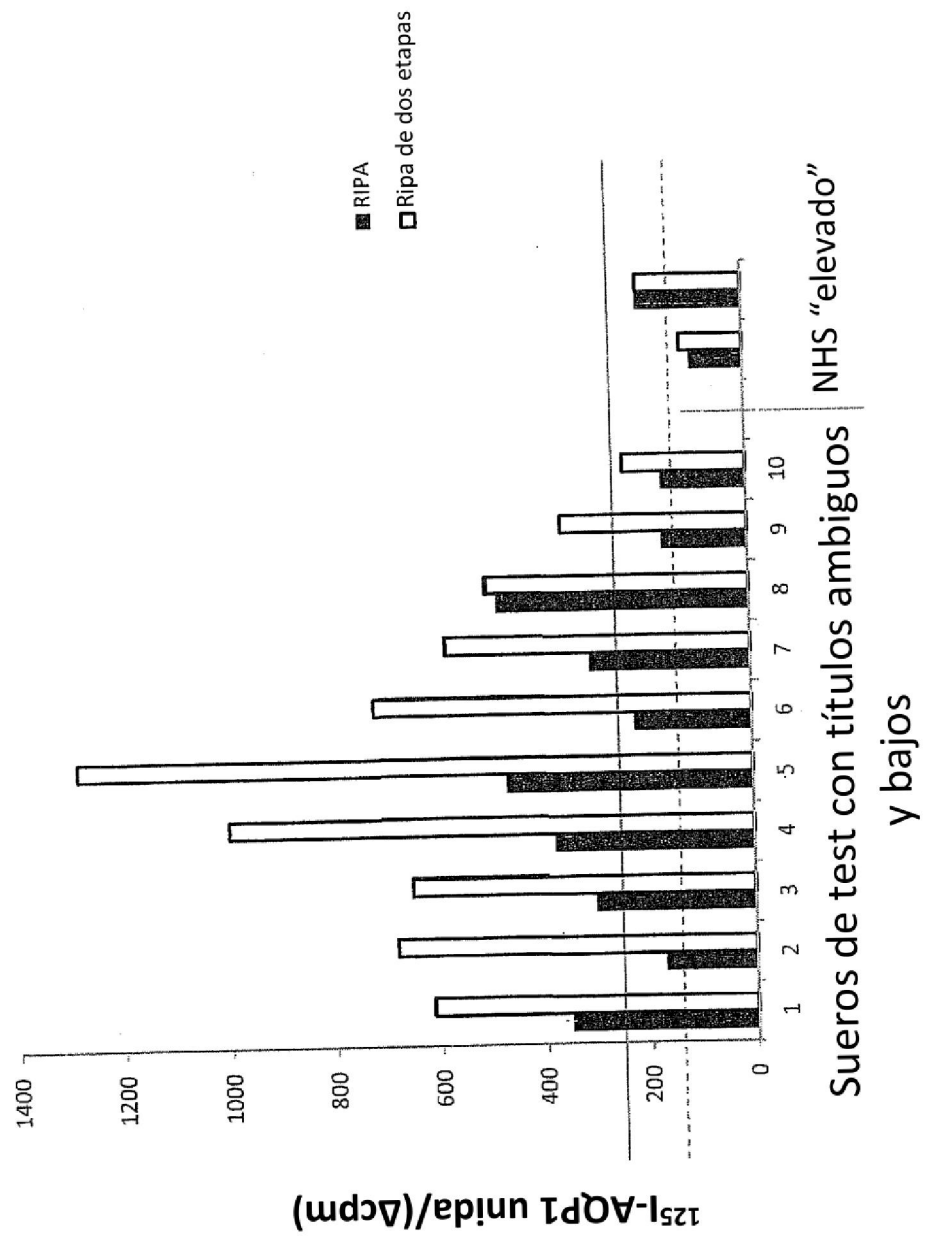


Fig. 6 - Caracterización bioquímica del autoanticuerpo-diana

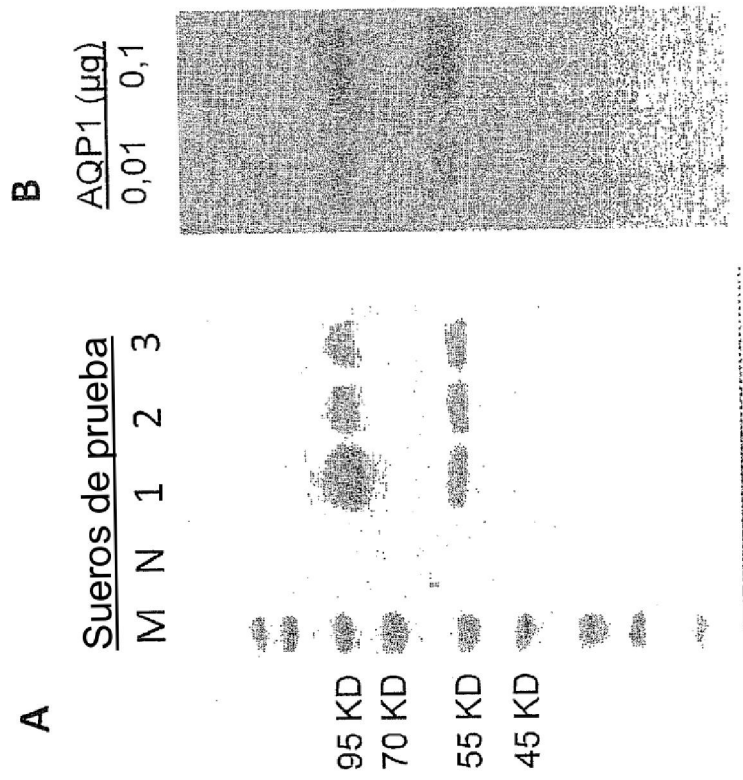


Fig. 7 - Inmunoabsorción de anticuerpos anti-AQP1 de sueros de pacientes

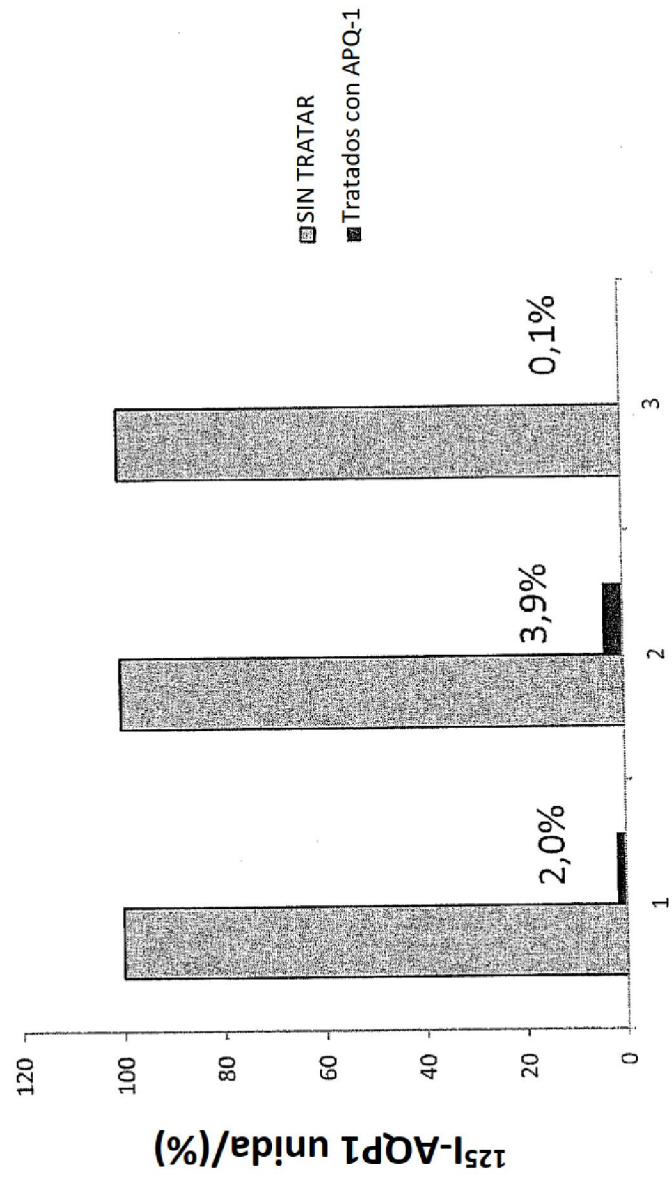


Figura 8A - Secuencia de nucleótidos representativa (SEQ ID NO 1) de acuaporina-1 humana

GTACAAAAGCAGGCTCCACCATGGCCAGCGAGTTCAAGAAAGCTCTTCTGAGGGCAGTGTGGC
CGAGTTCCTGGCCACGACCTCTTTGTCTTCATCAGCATCGGTTCTGCCCTGGCTTCAATACCCGGTGG
GGAACAAACGACGACGGTCCAGGACACGTGAAGGTGTCGCTGGCCTTCGGGCTGAGCATGCCACGC
TGGCGCAGAGTGTGGGCCACATCAGCGGCCACCTCAACCCGGCTGTACACTGGGGCTGCTGCTCA
GCTGCCAGATCATCTTCGTCGCCCTCATGTACATCATGCCAGTGGGGGCCCATCGTCGCCACC
GCCATCCTCTCAGGCATCACCTCCCTGACTGGAACTCGCTTGGCCGAATGACCTGGCTGATGTGT
GAACTCGGGCCAGGCCCTGGGCATCGAGATCATCGGACCCCTCCAGCTGGTGCTATGCTGGCTACT
ACCGACCGGAGGCCCGTGACCTTGGTGCTCAGCCCCCTTGCCATCGGCCTCTCTAGCCCTTGGAC
ACCTCCTGGCTATTGACTACACTGGCTGTGGGATTAACCCCTGCTCGTCTTGGCTCCGCGGTGATCACAC
ACAACTTCAGCAACCACTGGATTTCTGGTGGGGCCATTATCAGGGGAGCCCTGGCTGACTCATCTAC
GACTTCATCCTGGCCCCACGACGAGTGACCTCACAGACCGCGTGAGGTGTGGACCAAGCGGCCAGGTG
GAGGAGTATGACCTGGATGCCGACGACATCAACTCCAGGGTGGAGATGAAGCCCAATTGGACCCAGCT
TTCTTGATC.

Figura 8B - Secuencia de aminoácidos predicha (SEQ ID NO 2) del polipéptido de acuaporina-1 humana representativo

MASEFKKLFWRVVAEFLATTLFVFISGALGFKYPVGNNQTAVQDNVKVSLAFLGLSIATLAQSVGHISGAH
LNPAVTLGLLSCQISIFRALMYIIAQCVGAIVATAILSGITSSLTGNSLGRNDLADGVNSGQGLGIEIIGTLQLVLC
VLATTDRRRRDLGGSAPLAIGLSVALGHLLAIDYTGCGINPARSFGSAVITHNFSNHWIFWVGPFIGGALAVLIY
DFILAPRSSDLTDRVKVWTSQGQVEEYDLDDADDINSRVEMKPK.

Figura 9A - Secuencia de nucleótidos representativa (SEQ ID NO 3) de acuaporina-2 humana

AGTGCAGAGCGAGTGCCCGGAGCATCCTGGCCCTGAGACAGCTGGGCCAGCCCCGAGG
 GCTCTGCAGCATGTGGAGCTCCGCTCCATAGCCTTCTCCAGGGCTGTGTTCCAGAGTT
 CCTGGCCACACTCCTCTTCGTCTTCTTTGGCCTCGGCTCTGCCCTCAACTGGCCACAGGC
 CCTGCCCTCTGTGCTACAGATTGCCATGGCGTTTGGCTTGGTATTGGCACCCCTGGTACA
 GGCTCTGGCCACATAAGCGGGGCCACATCAACCCTGCCGTGACTGTGGCCTGCCTGGT
 GGGCTGCCACGTCTCCGTTCTCCGAGCCGCTTCTACGTGGCTGCCAGCTGCTGGGGC
 TGTGGCCGGAGCCGCTCTGCTCCATGAGATCAGCCAGCAGACATCCGCGGGACCTGGC
 TGTC AATGCTGTGAGTAGCCACAAC TTTGCTCTTCTGTCCCCAGCTCAGCAACAGCAC
 GACGGCTGGCCAGCGGTGACTGTGGAGCTTTCCTGACACTGCAGCTGGTGTCTGCAT
 CTTCCGCTCCACCGATGAGCGCCGCGGAGAGAACCCGGCACCCCTGCTCTCCATAGG
 CTTCTCCGTGGCCCTGGGCCACCTCCTTGGGGTAGGTGATGGCCATGCCCTCCTCCCACT
 GCAGATCCATTACACCGGCTGCTCTATGAATCCTGCCCGCTCCCTGGCTCCAGCTGTCGT
 CACTGGCAAAATTTGATGACCACTGGGTAATGGCTGAATCCGCTCGCCCCCAGGTCTTCTG
 GATCGGACCCCTGGTGGCGCCATCCTGGGCTCCCTCCTCTACAAC TACGTGCTGTTTCC
 GCCAGCCAAGAGCCTGTGCGAGCGCCTGGCAGTGTGCTGAAGGGCCTGGAGCCGGACACCGA
 TTGGGAGGAGCGGAGGTGCCGACGGCGCAGTCCGTGGAGCTGCACTCGCCGCAGAGCCT
 GCCACGGGTACCAAGGCCTGAGGGGCCCGCAGCGG

Figura 9B - Secuencia de aminoácidos representativa (SEQ ID NO 4) del polipéptido de acuaporina-2 humana

MWELRSIAFSRAVFAEFLATLLFVFFGLGSALNWPQALPSVLQIAMAFGLGIGTLVQALG
HISGAHINPAVTVACLVGCHVSVLRAAFYVAAQLLGAVAGAALLHEITPADIRGDLAVNA
LSNSTTAGQAVTVVELFLTQLVLCIFASTDERRGENPGTPALSIGFSVALGHLLGIHYTG
CSMNPARSLAPAVVTGKFDDHWVFWIGPLVGAILGSLLYNYVLFPPAKSLSERLAVLKGL
EPD TDWEEREVRRRQSVELHSPQSLPRGTKA

Figura 10A - Secuencia de nucleótidos representativa (SEQ ID NO 5) de acuaporina-5 humana

```

GGGTCCGTGGGTCTGTCTCTGTGGGTGGGGGCAGGTCTTCAAGGTCTGGGCTCAGCG
CCCTGACTCGTGCCCTGTCTCCACCAGGTTTTCTGGGTAGGGCCCATCGTGGGGCGGTC
CTGGCTGCCATCCTTTACTTCTACCTGTCTTCCCCAACTCCCTGAGCCTGAGTGAGCGT
GTGGCCATCATCAAAGGCACGTATGAGCCTGACGAGGACTGGAGGAGCAGCGGGAAGAG
CGGAAGAAGACCATGGAGCTGACCACCCGCTGACCAGTGTCAAGGAGGGCCAGCCCTC
AGCCCCTGAGCCAGGGGAAAGAAAGAAAGATCCTAACACAAGCTTCCTTTTGCAC
AACCGGTCCTCTTGGCTGAGGAGGAGGAGCTGGTCAACCCTGGCTGCACAGTTAGAGAGGG
GAGAAGGAACCCATGATGGGACTCCTGGGGTAGGGGCCAGGGGCTGGGTCTGTGGGGA
CAGGTCTCTCTGGACAGACCTCAGAGATTCTCAATGCAGTGCCAAAGCTCACAGGCTGCA
AGGGCCAGGCCAGAAAGGGTGGGCTGCAGCCTGCACCCCCCACCTTCCCCAACCCCTTC
CTCAAGAGCTGAAGGATCCAGACCCTAGGTGGGCAGAGGCAGACCCCTCCCCAGAGCTC
CTTAGGAAGAAGACAGACTGGTTCAATTGAATGCCGCCCTATTATTTCTGGTGAGGATGC
ATGCGTGGGGCTGTGCTTTAGAGTGGGGGTACCCCAATAAATCACTGATACTACAT
TCCGCCTCTGTCTCTCAGAGTGCCTTGAGACACTCTGCCCCCATTTGCCTCTCCTCTT
GTCATCCC

```

Figura 10B - Secuencia de aminoácidos representativa (SEQ ID NO 4) del polipéptido de acuaporina-5 humana

MIKKEVCSVAFLKAVFAEFLATLIFVFFGLGSALKWPSALPTILQIALAFGLAIGTLAQAL
GPVSGGHINPAITLALLVGNQISLLRAFFYVAAQLVGAAGAGILYGVAPLNARGNLAVN
ALNNNTTQGQAMVVELILTFQLALCIFASTDSRRTSPVGSPALSIGLSVTLGHLVGIFYFT
GCSMNPARSFGPAVVMNRFSPAHHWVFWVGPIVGAVLAAILYFYLLFPNLSLSERVAIIK
GTYPEDWEEQREERKKTMTTR

Figura 11A - Secuencia de nucleótidos representativa (SEQ ID NO 7) de acuaporina-7 humana

GGCTCTGGACTGGGACACAGGGATAGCTGAGCCCCAGCTGGGGTGGAAGCTGAGCCAG
 GGACAGTCACGGAGGAACAAGATCAAGATGCGCTGTAAGTGAAGAGCCCCCAAGCGGAG
 GCTGAGAAATCAGAGACATTTAGCAGACATCTACAAATCTGAAAGACAAACATGTTCA
 AGCATCCGGGCACAGGCGGTCCACCCGTGGCTCCAAATGGTCTCCTGGTCCGTGATAGC
 AAAGATCCAGGAAATACTGCAGAGGAAGATGGTGCAGAGATTCTGCGCCGAGTTCATGAG
 CACATATGTCATGATGGTATTCGGCCTTGGTTCCGTGGCCCATATGGTTCTAAATAAAA
 ATATGGGAGCTACCTTGGTGTCAACTTGGTTTTGGCTTCGGAGTCACCATGGGAGTGCA
 CGTGGCAGGCCGATCTCTGGAGCCACATGAACGCAGCTGTGACCTTTGCTAACTGTGC
 GCTGGCCCGCTGCCCTGGAGGAAGTTCCGGTCTATGTGCTGGGCGAGTTCCTGGGCTC
 CTTCTGGCGGCTGCCACCATCTACAGTCTCTTCTACACGGCCATTCTCCACTTTTCGGG
 TGGACAGCTGATGTTGACCGGTCCCGTCGCTACAGCTGGCATTTTGCCACCTACCTTCC
 TGATCACATGACATTGTGGCGGGCTTCCTGAATGAGGCGTGGCTGACCGGGATGCTCCA
 GCTGTGCTCTTCGCCATCACGGACCAAGGAGAAACACCCAGCACTGCCAGGAACAGAGGC
 GCTGGTGATAGGCATCCTCGTGTCTATCATCGGGGTGTCCTTGCCATGAACACAGGATA
 TGCCATCAACCCGTCCCGGACCTGCCCCCGCATCTTCACCTTCATTGCTGGTGGG
 CAACAGGTCTTCAGCAATGGGAGAACTGGTGGTGCCAGTGGTGCCACCACTTCT
 GGGTGCCTATCTAGGTGGCATCATCTACCTGGTCTTCATTGGCTCCACCATCCACGGGA
 GCCCTGAAATTGGAGGATTCTGTGGCGTATGAAGACCACGGGATAACCGTATTGCCCAA
 GATGGGATCTCATGAACCCACGATCTCTCCCTCACCCCGTCTCTGTAGCCCTGCCAA
 CAGATCTTCAGTCCACCCTGCCCCACCCTTACATGAATCCATGGCCCTAGAGCACTTCTA
 AGCAGAGATTATTGTGATCCCATCCATTCCCCAATAAAGCAAGGCTGTCCGACAAA

Figura 11B - Secuencia de aminoácidos representativa (SEQ ID NO 8) del polipéptido de acuaporina-7 humana

MVQASGHRSTRGSKMVSWSVIAKIQEILQRKMVREFLAEFMSTYVMMVFGLGSVAHMLV
 NKKYGSYLGVNIGFGVTMGVHVAGRISGAHMNAAVTFANCALGRVPWRKFPVYVLGQF
 LGSFLAAATIYSLFYTAILHFSGGQLMVTGPVATAGIFATYLPDHMTLWRGFLNEAWLTG
 MLQLCLFAITDQENNPALPGTEALVIGILVVIIGVSLGMNTGYAINPSRDLPPRIFTFIA
 GWGKQVFSNGENWWVPV/APLLGAYLGIIYLVFIGSTIPREPLKLEDSVAYEDHGITY
 LPKMGSHEPTISPLTPVSVSPANRSSVHPAPPLHESMALEHF

Figure 12A - Secuencia de nucleótidos representativa (SEQ ID NO 9) de acuaporina-8 humana

TAGGAGATAAGAGTATCTTGACAGCAGGTGCAGGTTTCCAGCAGCTCAGGCAAGAGTC
CGATGTTTGTGCCATCTGATCCTGATGTCTGGAGAGATAGCCATGTGTGAGCCTGAATTT
GGCAATGACAAGGCCAGGGAGCCGAGCGTGGTGCGAGGTGGCGAGTGTCTGGTACGAA
CGGTTTGTGCAGCCATGTCTGGTCGAACTGCTGGCTCTGCTCTCTTCATCTTCATCGGG
TGCCTGTCGGTCATTGAGAAATGGACGGACACTGGCTGCTGCAGCCGCCCTGGCCAC
GGCTGGCTTTGGGGCTCGTGATTGCCACGCTGGGAATATCAGTGGTGGACACTTCAAC
CCTGCGGTGTCCTGGCAGCCATGCTGATCGGAGGCCCTCAACCTGGTGATGCTCTCTCCG
TACTGGGTCTCACAGCTGCTCGGGGATGCTCGGGCTGCCCTTGGCCAAAGTGGTGAGT
CCTGAGGAGAGGTTCTGGAATGCATCTGGGGCGCCTTTGTGACAGTCCAGGAGCAGGGG
CAGGTGGCAGGGCGTTGGTGGCAGAGATCATCTGACGACGCTGCTGGCCCTGGCTGTGTA
TGCATGGGTGCCATCAATGAGAAAGACAAGGGCCCTCTGCCCCCTTCTCCATCGGCTTT
GCCGTCAACCGTGATATCCTGGCTGGGGCCCTGTGCTGGAGGCTGCATGAATCCCGCC
CGTGCTTTTGGACCTGCGGTGGTGCCAAACCACTGGAATCCACTGGATCTACTGGCTG
GGCCACTCCTGGCTGGCTGCTTGTGGACTGCTCATTAGGTGCTTCATTGGAGATGGG
AAGACCCGCTCATCTGAAGGCTCGGTGAGCAGAGCTCGTGGGATTCCTGCTCCTCCAG
GTGTCCTCAGCTCACCTGTCCAGACTGAGGACAGGGGAGTTCTTGCAATTCCTGCCAGG
GCAGAGGCCCAGAGGAGCGACCCCTGCTTCCACTGCTTGGCCCTGCTTCTCAGATAGA
CTGACTGCTGAGGAGGCTCTAGGTTCTTGGAATTCCTTTGTGCTCATCAGAGACCCAGC
CTGGGGAACACGCTGCCCGCACTGCCCAGAGAGCAGTGCAACACCAACACAGCGGTG
TTTCTTGAGAGGAATGTCCCCGAGTTGGACAAGGAGGCTGTTTCTGCACATCAGCTCAT
TCCCGCACCCCATTTCTTGCTTGATTGCTTTGTTGGGGCCCTGGCCACTTCTTGCTTCT
CAAGCTGACAAATCTCACTTTGCAATAAATAGTCCAGTGTTTCTTCAT

Figura 12B - Secuencia de aminoácidos representativa (SEQ ID NO 10) del polipéptido de acuaporina-8 humana

MSGEIAMCEPEFGNDKAREPSVGGRWRVSWYERFVQPCLVLLGSALFIFIGCLSVIENG
TDTGLLQPALAHGLGLVIATLGNISGGHFNPAVSLAAMLIGGLNLVMLLPYWVSQLLG
GMILGAALAKAVSPEERFWNASGAAFVTVQEQQVAGALVAEIIITLLALAVCMGAIN EK
TKGPLAPFSIGFAVTVDILAGGPVSGGCMNPARAFGPVAVVANHWNFHWIYWLGPLLAGLL
VGLLIRCFIGDGKTRLIKAR