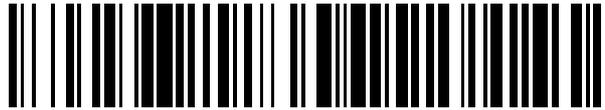


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 790**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2005 E 05717480 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1709082**

54 Título: **Composición para el tratamiento de una patología asociada a MSRV/HERV-W**

30 Prioridad:

23.01.2004 FR 0400675

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

11.06.2014

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (50.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'Etoile, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (I.N.S.E.R.M.) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARCHE, PATRICE;
ROLLAND, ALEXANDRE;
JOUVIN-MARCHE, EVELYNE y
PERRON, HERVÉ**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 466 790 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

Composición para el tratamiento de una patología asociada a MSR/HERV-W.

5 Desde hace varios años, numerosos estudios han puesto en evidencia la importante expresión de diversos retrovirus, en particular endógenos (HERV), en patologías tales como la diabetes [1], la esclerosis múltiple (SEP) [2] y la esquizofrenia (SCZ) [3]. Los HERV poseen unas homologías con los retrovirus animales conocidos y provienen probablemente de su integración dentro de la línea germinal humana. Las secuencias de estos HERV en el genoma humano son en general incompletas, incluso si ya se han identificado unas secuencias provirales enteras.

10 Ya se han aislado unas partículas retrovirales en cultivos de células leptomeníngeas de pacientes que padecen SEP [4]. El estudio de estas partículas ha mostrado que poseían unas secuencias genéticas homólogas al ADN humano que definen una nueva familia de retrovirus endógenos (HERV-W) [2, 5, 6]. La presencia de MSR/HERV-W en el suero y/o el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes se ha confirmado ahora mediante diferentes equipos [7-9] y se ha puesto en evidencia una correlación entre la carga viral y la evolución de la enfermedad [10]. Se ha demostrado después que MSR/HERV-W y su proteína de la envoltura poseían unas propiedades proinflamatorias mediadas por los linfocitos T, de tipo superantígeno (SAg) [11]. Se desarrolló un modelo animal (ratones SCID humanizados), lo que confirma *in vivo* el potencial inmunopatogénico de dichas partículas y en particular su capacidad para inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias, mediada por los linfocitos T [12].

20 A continuación en la descripción, los virus de la familia MSR/HERV-W se denominarán indistintamente MSR/HERV-W.

25 Otras patologías presentan, como la SEP, un perfil de activación del sistema inmunitario, caracterizado por la presencia de grandes cantidades de IL-6. Entre ellas, la esquizofrenia (SCZ), enfermedad neuropsiquiátrica relacionada con factores genéticos y ambientales, presenta según los casos unas cantidades séricas de IL-6 ampliamente superiores a la normal [13]. Por otra parte, se han identificado unas secuencias retrovirales similares a las de MSR/HERV-W en unos pacientes SCZ [3]. Además, más recientemente, se ha demostrado que el LCR de pacientes SCZ nuevamente diagnosticados presenta unas secuencias retrovirales de la familia MSR/HERV-W asociadas a partículas circulantes [14].

30 Dicha expresión es compatible con un papel para MSR/HERV-W en diferentes patologías neurológicas por medio de los efectos proinflamatorios de su proteína de envoltura y de la vía de activación implicada. Este elemento retroviral (en sí mismo bajo la dependencia de cofactores de activación) y sus efectos asociados son muy pertinentes en el caso de enfermedades desmielinizantes inflamatorias [15]. En el caso de la esquizofrenia, dicha inflamación revelada a nivel sistémico por la sobreexpresión de IL-6, es asimismo pertinente, localmente a nivel de la sustancia gris del cerebro, frente a efectos neurotóxicos y excitotóxicos conocidos de la inflamación mediada por los microglíocitos/macrófagos del cerebro [16-30].

40 La expresión diferencial de secuencias ARN MSR/HERV-W también se ha detallado en el tejido corticofrontal de pacientes esquizofrénicos, y no en los controles, que incluyen en particular unas psicosis maniaco-depresivas (trastornos bipolares) [31]. Además, el reflejo sistémico de este diferencial retroviral "MSR/HERV-W" se ha puesto en evidencia en la sangre de gemelos homocigotos discordantes para la patología esquizofrénica, lo que corrobora así la existencia de una réplica "sistémica" que puede desempeñar en particular un papel en la hiperexpresión de IL-6 circulante anteriormente detallada [3].

50 Los efectos de la proteína de la envoltura de MSR/HERV-W en pacientes esquizofrénicos tienen su sitio en la cascada patogénica de la esquizofrenia, a nivel del papel de factores inflamatorios específicos en la génesis de señales neurotóxicas y/o excitotóxicas corticales o subcorticales.

Existe hoy día unas publicaciones concordantes de diferentes equipos independientes que muestran una asociación de los elementos de la familia MSR/HERV-W con unas patologías tales como la SEP y la SCZ, pero otras enfermedades podrían también mostrarse relevantes.

55 Los presentes inventores han mostrado ahora de manera inesperada que la proteína Env de MSR/HERV-W tiene otra actividad proinflamatoria, independiente de la mediada por los linfocitos T, esta nueva actividad proinflamatoria que pasa por células diferentes de las células T y por un receptor distinto del receptor de las células T (TCR) y que resulta de la activación de una vía proinflamatoria distinta de la que resulta de la activación de TCR por un superantígeno. Esta nueva actividad proinflamatoria es por lo tanto diferente de la activación proinflamatoria causada por una función superantigénica que, por definición, pasa por una unión al TCR de los linfocitos T. Los inventores han encontrado que es precisamente el dominio de la fracción soluble (Env-SU) de la proteína de la envoltura de MSR/HERV-W que es responsable de estos nuevos efectos proinflamatorios mediados por unas células presentadoras de antígenos (macrófagos, monocitos, células dendríticas y microglíocitos) y un receptor no identificado, hasta hoy día, por su papel en la activación de los efectos proinflamatorios mediados por Env-SU MSR/HERV-W. Así, Env-SU, naturalmente presente en la superficie de las partículas retrovirales, tiene como objetivo las células presentadoras de antígenos (APC), las activan e inducen a la secreción de grandes cantidades

de TNF- α , de IL-1 β y de IL-6. Estos efectos proinflamatorios se han estudiado en pacientes que padecen SEP y después se han comparado con los obtenidos de donantes. Los inventores han mostrado así que la producción de IL-6 inducida por Env-SU estaba aumentada en los pacientes SEP y estaba correlacionada con su resultado clínico (EDSS). Se supone que la presencia elevada de IL-6 en el suero, el LCR y las lesiones de pacientes SEP [32-37] desempeña un papel importante en el desarrollo y la persistencia de las lesiones observadas a nivel del sistema nervioso central de los pacientes SEP.

Los presentes inventores han encontrado por lo tanto, de manera sorprendente, que el receptor de Env-SU implicado en estos nuevos efectos proinflamatorios es la proteína TLR4 humana (Toll-like Receptor 4). El gen que codifica para TLR4 está localizado en el cromosoma 9 (9q32-q33). La proteína está constituida de 839 aminoácidos y presenta un peso molecular de 95679 Da. Se conocía que TLR4 cooperaba con otra molécula denominada MD-2 y que junto con CD14, este complejo está implicado en el reconocimiento de los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos que llevan a la activación del factor NF-kappa-b, a la secreción de citoquinas y a la respuesta inflamatoria, pero su papel de receptor de la fracción soluble de la proteína de la envoltura (Env-SU) de MSRV/HERV-W no era conocido antes de la presente invención. Al no estar expresada la proteína TLR4 sobre los linfocitos T, estos últimos no son las dianas primarias de los efectos puestos en evidencia en este caso con el receptor TLR4. Los inventores han demostrado también que las partículas retrovirales MSRV asociadas al ARN circulante detectado en los fluidos biológicos de pacientes son, fuera de cualquier replicación retroviral, inductoras de esta nueva vía de activación proinflamatoria precoz que pasa por el receptor TLR4 presente en células presentadoras de antígenos, tales como macrófagos, monocitos, células dendríticas y microglíocitos. Para ello, han activado los viriones MSRV purificados a partir de sobrenadantes de cultivo productores [4] y ensayado su actividad relacionada con la presencia de la proteína Env de MSRV/HERV-W. Los resultados presentados en la parte experimental confirman que la vía precoz de activación de la inmunidad innata por el receptor TLR4 está dirigida por la proteína de la envoltura en forma soluble Env-SU y en forma membranaria por la superficie de los viriones MSRV.

Los resultados obtenidos en el ámbito de la presente invención permiten por lo tanto establecer unas estrategias de inmunoterapia en patologías, en particular neurológicas, tales como la SEP y la SCZ y han permitido en particular identificar los vectores capaces de transportar uno o más agentes terapéuticos a través de la barrera hematoencefálica. Uno de los aspectos primordiales de los resultados de la invención, en el ámbito de la terapia, es que han permitido tener como objetivo un componente inflamatorio relacionado con la activación de los microglíocitos/macrófagos cerebrales, con una especificidad única en este dominio gracias a la identificación del sistema ligando/receptor "Env-SU MSRV/HERV-W y TLR4" implicado en la génesis de las señales inflamatorias precoces que, por ejemplo, inician una cascada desmielinizante cuando provienen de los microglíocitos/macrófagos localizados en la sustancia blanca (SEP) o una cascada excitotóxica/neurotóxica cuando están producidos por estas mismas células en la sustancia gris (SCZ).

Así, una utilización de estos resultados es un método para tratar un individuo que presenta una patología asociada a la presencia de MSRV/HERV-W que comprende la administración al individuo de una composición terapéutica o un medicamento que comprende por lo menos un anticuerpo seleccionado de entre el grupo (i) de los anticuerpos anti-Env-SU MSRV/HERV-W capaces de unirse específicamente (enlazándose específicamente) a la fracción soluble de la proteína Env de MSRV/HERV-W o en el grupo (ii) de los anticuerpos capaces de unirse específicamente (enlazándose específicamente) al receptor TLR4 de la fracción soluble de la proteína Env-SU MSRV/HERV-W para inhibir la cascada proinflamatoria inducida por la activación de MSRV/HERV-W, y un vehículo más, si es necesario, un vector farmacéuticamente aceptable. Dichos anticuerpos inhiben la cascada proinflamatoria inducida por la activación de Env-SU MSRV/HERV-W. Dicho método se utiliza, en particular, para el tratamiento de la SEP y la SCZ, pero se puede aplicar al tratamiento de otras enfermedades si están asociadas a una expresión de la proteína proinflamatoria de MSRV/HERV-W en un contexto en el que esta última inicia una cascada patológica.

Dichos anticuerpos anti-Env-SU son en particular capaces de unirse a una región que corresponde a los aminoácidos 122-131 (inclusive) y/o a una región que corresponde a los aminoácidos 312-316 (inclusive) y/o a una región que corresponde a los aminoácidos 181-186 (inclusive) de la secuencia identificada en SEC ID n° 1.

Según el método de tratamiento anterior, se puede administrar al paciente una composición o un medicamento que comprende por lo menos un anticuerpo anti-Env-SU MSRV/HERV-W o por lo menos un anticuerpo anti-TLR4. En un modo de realización de este método, se administra al paciente una composición o un medicamento que comprende por lo menos un anticuerpo anti-Env-SU MSRV/HERV-W y por lo menos un anticuerpo anti-TLR4.

Preferentemente, en el método anterior, el anticuerpo anti-Env-SU se selecciona de entre los anticuerpos siguientes: anticuerpos monoclonales anti-Env-SU MSRV/HERV-W (anticuerpos 3B2H4, 13H5A5 y 3H10F10 (bioMérieux)) y el anticuerpo anti-TLR4 es el anticuerpo anti-TLR4 humano HTA125 (comercializado por la compañía eBioscience). El modo de obtención de los anticuerpos monoclonales de bioMérieux se describe en la descripción siguiente. Los anticuerpos antes citados tienen como característica original, y hasta ahora desconocida, de ser neutralizantes frente a la actividad proinflamatoria nuevamente demostrada sobre las células presentadoras de antígenos a través del receptor TLR4.

Los anticuerpos anti-TLR4 o anti-Env-SU son administrados al individuo con la ayuda de un vehículo

farmacéuticamente aceptable, asociado si es necesario a un vector farmacéuticamente aceptable para transportarlos a través de la barrera hemato-encefálica (BHE). Si, como es el caso para la SEP, en una cierta fase de la evolución de la patología, hay apertura de la barrera hematoencefálica, no es necesario utilizar vectores de este tipo, pero cuando no hay apertura de la barrera hematoencefálica, que es también el caso para SCZ, dichos vectores son necesarios. Estos vectores son bien conocidos [38-45]. La conducta terapéutica dirige un componente inflamatorio relacionado con la activación de los microglíocitos/macrófagos cerebrales, con una especificidad única en este campo. Esta especificidad está relacionada con la identificación del sistema ligando-receptor "Env-SU MSR/V y TLR4" implicado en la génesis de las señales inflamatorias precoces que, por ejemplo, inician una cascada desmielinizante cuando provienen de los microglíocitos/macrófagos localizados en la sustancia blanca (SEP), o una cascada excitotóxica/neurotóxica cuando están producidos por estas mismas células en la sustancia gris (SCZ).

La utilidad de los anticuerpos anti-Env-SU MSR/V o anti-TLR4 es bloquear "en la fuente" la cascada proinflamatoria inducida por la expresión de MSR/V/HERV-W (en sí misma inducida por unos cofactores infecciosos de tipo herpesvirus, por unas señales hormonales o por unas citoquinas particulares, variables según las patologías) en las diferentes enfermedades asociadas a una expresión patológica de MSR/V/HERV-W.

La invención tiene por objeto la utilización de por lo menos un anticuerpo seleccionado de entre el grupo (i) de los anticuerpos anti-Env-SU MSR/V/HERV-W capaces de unirse específicamente a la fracción soluble de la proteína Env de MSR/V/HERV-W o del grupo (ii) de los anticuerpos anti-TLR4 capaces de unirse específicamente al receptor TLR4 de la fracción soluble de la proteína Env de MSR/V/HERV-W para la preparación de un medicamento; inhibiendo dichos anticuerpos la cascada proinflamatoria que implica dicha fracción soluble de Env de MSR/V/HERV-W y dicho receptor, y teniendo los anticuerpos (i) un efecto inhibidor equivalente al de los anticuerpos (ii). Esta utilización se hace para el tratamiento de la esclerosis múltiple y la esquizofrenia. En particular, se utiliza por lo menos un anticuerpo anti-Env-SU MSR/V/HERV-W (i) y por lo menos un anticuerpo anti-TLR4 (ii). El anticuerpo anti-Env-SU HERV-W se selecciona de entre los anticuerpos 3B2H4, 13H5A5 y 3H10F10, y el anticuerpo anti-TLR4 es el anticuerpo HTA125.

Los anticuerpos preferidos en esta composición son los anticuerpos anti-Env-SU MSR/V/HERV-W (3B2H4, 13H5A5 y 3H10F10) y el anticuerpo anti-TLR4 HTA125. Los anticuerpos antes citados son unos anticuerpos monoclonales "neutralizantes" frente a la actividad proinflamatoria nuevamente demostrada sobre las células presentadoras de antígeno a través del receptor TLR4. Dichos anticuerpos anti-Env-SU son en particular capaces de unirse a una región que corresponde a los aminoácidos 122-131 (inclusive) y/o a una región que corresponde a los aminoácidos 312-316 (inclusive) y/o a una región que corresponde a los aminoácidos 181-186 (inclusive) de la secuencia identificada en SEC ID nº 1.

Según la invención, se describen unos anticuerpos seleccionados de entre los anticuerpos anti-Env-SU MSR/V/HERV-W y anti-TLR4 capaces de unirse específicamente (enlazándose específicamente) a la fracción soluble de la proteína Env de MSR/V/HERV-W o capaces de unirse específicamente (enlazándose específicamente) al receptor TLR4 de la fracción soluble de la proteína Env de MSR/V/HERV-W para inhibir la cascada pro-inflamatoria inducida por la activación de MSR/V/HERV-W, en particular los anticuerpos 3B2H4, 13H5A5 y 3H10F10. Pero, está al alcance del experto en la materia producir y seleccionar otros anticuerpos, siendo la condición para la selección que los anticuerpos seleccionados sean capaces de inhibir el efecto proinflamatorio de Env-SU en el ensayo *in vitro* descrito en la parte experimental siguiente.

El término "anticuerpo" utilizado en la presente invención incluye los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos recombinantes y los fragmentos de dichos anticuerpos que están caracterizados por una afinidad elevada para la fracción soluble de la proteína de la envoltura de MSR/V/HERV-W y que no presentan ninguna toxicidad o una toxicidad muy baja. En particular, es preferible utilizar un anticuerpo cuya región variable y/o la región constante es poco inmunógena para el individuo al que se le administra. Los anticuerpos de la presente invención están caracterizados por su capacidad para tratar unos pacientes que presentan unas patologías asociadas a MSR/V/HERV-W y no presentar al mismo tiempo ninguna toxicidad o una toxicidad muy baja. La baja inmunogenicidad y/o la afinidad elevada de estos anticuerpos puede contribuir a los resultados terapéuticos alcanzados.

Por fragmento de anticuerpos, se entienden los fragmentos F(ab)₂, Fab, Fab', sFv (Blazar *et al.*, 1997, Journal of Immunology 159: 5821-5833 y Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423-426) de un anticuerpo nativo, y por anticuerpo quimérico se entiende, entre otros, un derivado quimérico de un anticuerpo nativo (véase por ejemplo Arakawa *et al.*, 1996, J. Biochem 120: 657-662 y Chaudray *et al.*, 1989, Nature 339: 394-397).

La producción de anticuerpos monoclonales pertenece a los conocimientos generales del experto en la materia. Se puede citar, a título de referencia, Köhler G. y Milstein C. (1975): Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256: 495-497 y Galfre G. *et al.* (1977) Nature, 266: 522-550. El inmunógeno puede ser acoplado a la hemocianina de Lymphet Keyhole (péptido KLH) como soporte para la inmunización o a la albúmina sérica (péptido SA). Los animales son sometidos a una inyección de inmunógeno utilizando el adyuvante de Freund. Los sueros y los sobrenadantes de cultivo de hibridoma procedente de los animales inmunizados se analizan por su especificidad y su selectividad utilizando unas técnicas clásicas, tales como, por ejemplo, unos

ensayos ELISA o de transferencia western. Se seleccionan los hibridomas que producen los anticuerpos más específicos y más sensibles. Unos anticuerpos monoclonales pueden también ser producidos *in vitro* por cultivo celular de los hibridomas producidos o por recuperación de líquido de ascitis, después de la inyección intraperitoneal de los hibridomas en el ratón. Sea cual sea el modo de producción, en sobrenadante o en ascitis, los anticuerpos se purifican a continuación. Los métodos de purificación utilizados son esencialmente la filtración sobre gel intercambiador de iones y la cromatografía de exclusión o la cromatografía de afinidad (proteína A o G). Los anticuerpos se criban en unos ensayos funcionales para seleccionar los anticuerpos más eficaces. La producción *in vitro* de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos y de anticuerpos quiméricos producidos por ingeniería genética es bien conocida por el experto en la materia. A título de ejemplo, se pueden producir unos anticuerpos por clonación del ADNc obtenido a partir de ARN que codifica para el fragmento variable (scFv) del anticuerpo. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos, por ejemplo murinos, son unos anticuerpos quiméricos que comprenden una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son unas inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que unos residuos de una región hipervariable de receptor son sustituidos por unos residuos de una región hipervariable de una especie donante (anticuerpo donante) no humana, tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos (FR) de la región Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por unos residuos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender unos residuos que no se han encontrado en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden ser efectuadas para mejorar los rendimientos del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá por lo menos uno y preferentemente dos campos variables, en los que todos o más o menos todos los bucles hipervariables corresponden a una inmunoglobulina no humana y todas o más o menos todas regiones Fr serán las de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados facultativamente podrán asimismo comprender por lo menos una parte de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, tal como una inmunoglobulina humana. En general, la región variable se deriva de un anticuerpo de mamífero no humano y la región constante se deriva de una inmunoglobulina humana. Preferentemente, la región variable seleccionada presenta una baja inmunogenicidad y está asociada a una región constante que presenta asimismo una baja inmunogenicidad.

Estos anticuerpos son preferentemente los anticuerpos "neutralizantes" siguientes:

- Anticuerpos monoclonales anti-Env-Su MSRV/HERV-W: anticuerpos 3B2H4, 13H5A5 y 3H10F10 (bioMérieux),
- Anticuerpos anti-TLR4: anticuerpo monoclonal anti-TLR4 humano HTA125 (comercializado por la compañía eBioscience).

Los anticuerpos anti-Env-SU MSRV/HERV-W se producen según los protocolos descritos a continuación.

- Producción del anticuerpo 3B2H4:

Los ratones son inmunizados según el protocolo siguiente: en el día D0, inyección intraperitoneal de 20 µg de inmunógeno, que consiste en proteína recombinante purificada Env/MSERV tales como se las describió anteriormente [11] en presencia de adyuvante de Freund completo. A días D14 y D28, nueva inyección intraperitoneal de la misma cantidad de inmunógeno en presencia de adyuvante de Freund incompleto. Cuatro, tres y dos días antes de la fusión, se realiza una inyección intraperitoneal de 100 µg de inmunógeno diluido en agua fisiológica.

Se han cribado 400 sobrenadantes mediante la técnica de ELISA indirecta. Las placas se "recubren" con 100 µl de antígeno a 1 µg/ml de tampón bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Las placas "recubiertas" se incubaron una noche a la temperatura de 18-22°C. Las placas se saturaron con 200 µl de PBS-leche al 1% y se sometieron a una incubación de 1 hora a 37°C +/-2°C. Se añadieron 100 µl de sobrenadantes o de líquido de ascitis diluidos en tampón PBS-Tween 20 0,05%, y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C +/-2°C. Se añadieron 100 µl de anticuerpo policlonal de cabra anti-IG (H+L) de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (PAL) (Jackson ImmunoResearch ref.: 115-055-062), diluido en tampón PBS-BSA 1% a 1/2000, y las placas se incubaron después durante 1 hora a 37°C +/-2°C. Se añadieron 100 µl de PNPP (Biomérieux ref. 60002990) a la concentración de 2 mg/ml en la DEA-HCL (Biomérieux ref. 60002989), pH=9,8. Después, las placas se sometieron después a una incubación durante 30 minutos a la temperatura de 37°C +/-2°C. La reacción se bloqueó por adición de 100 µl de NaOH, 1N. Se efectuaron tres lavados entre cada etapa con 300 µl de PBS-Tween 20, al 0,05%. Se efectuó un lavado suplementario en agua destilada antes de añadir el PNPP.

Se revelaron 22 sobrenadantes positivos en ELISA indirecto con una DO > a 0,2 que corresponde a cuatro veces el ruido de fondo. Después de los ensayos de especificidad, sólo se produce un anticuerpo.

- Producción de los anticuerpos 13H5A5 y 3H10F10:

Se inmunizan los ratones según el protocolo siguiente: en el día D0, inyección intraperitoneal de 40 µg de

inmunógeno, que consiste en proteína recombinante purificada Env/MSRV tal como se ha descrito anteriormente [11], en presencia de adyuvante de Freund completo. En los días D14, D28 y D78, se realiza una nueva inyección intraperitoneal de la misma cantidad de inmunógeno en presencia de adyuvante de Freund incompleto. Cuatro, tres y dos días antes de la fusión se realiza una inyección intraperitoneal de 50 µg de inmunógeno diluido en agua fisiológica.

Se han cribado 1350 sobrenadantes mediante la técnica de ELISA indirecta, como se ha descrito anteriormente.

Se revelaron positivos 39 sobrenadantes en ELISA indirecta con una DO > a 0,4 que corresponde a cuatro veces el ruido de fondo. Después de los ensayos de especificidad, se producen dos anticuerpos.

Los anticuerpos anti-Env-SU y anti-TLR4 antes citados se utilizan para la preparación de un medicamento o de una composición terapéutica para el tratamiento de patologías asociadas a MSRV/HERV-W, tal como se ha descrito anteriormente. En la utilización con objetivo terapéutico de la presente invención, el anticuerpo o el ingrediente activo está asociado a un vehículo farmacéuticamente aceptable y eventualmente a un vector farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan y se seleccionan en función del modo de administración seleccionado y de la práctica estándar en el campo farmacéutico. Debido a que las proteínas son sometidas a digestión cuando se administran por vía oral, una administración parenteral, tal como la intravenosa, subcutánea o intramuscular, debería ordinariamente ser utilizada para optimizar la absorción. Los vehículos farmacéuticamente aceptables están descritos por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª ed., Mack Publishing Co. Por ejemplo, una composición parenteral apropiada para una administración por inyección se prepara disolviendo el 1,5% en peso del ingrediente activo en una solución de cloruro de sodio al 0,9%. Puede ser necesario asociar el anticuerpo a un vector seleccionado que permite el paso del anticuerpo a través de la BHE. El anticuerpo no transportable puede así ser acoplado a un vector transportable, tal como la albúmina cationizada, la transferina, la insulina y el factor de crecimiento insulina-like o a un fragmento de dichas proteínas. Se ha demostrado ya, en particular, que unos anticuerpos monoclonales no transportables (IgG3), unidos a un vector de transporte, tal como la transferina o el factor de crecimiento insulina-like, no sólo era capaz de atravesar la BHE, sino también que se conservaban las propiedades funcionales de estos anticuerpos. Otros estudios han mostrado ya que unos productos neuro-farmacéuticos podrían ser suministrados a nivel del cerebro por medio de liposomas. Este enfoque es asimismo importante ya que ofrece un mecanismo mediante el cual cualquier molécula que puede ser encapsulada en un liposoma puede ser dirigida hasta el cerebro.

Los anticuerpos pueden ser administrados bien como unos agentes terapéuticos individuales, o bien en combinación con otros agentes terapéuticos para aumentar y mejorar el tratamiento. La dosificación dependerá por supuesto de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y de su vía de administración, pero también de factores tales como la edad, el peso, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado y esperado. Habitualmente, una dosis diaria para un ingrediente activo está comprendida entre 0,01 a 100 miligramos por kilogramo para un ser humano. Corrientemente, de 1 a 40 miligramos por kilogramo por día, administrados en una o varias dosis diarias, es una cantidad eficaz para obtener el efecto buscado.

En la utilización de la invención, la cascada proinflamatoria induce la formación de citoquinas seleccionadas de entre IL-6, IL-1β y TNF-α.

En la presente memoria, se describe la utilización de Env-SU MSRV/HERV-W para determinar el estado de reactividad de las células mononucleadas sanguíneas de pacientes que padecen esclerosis múltiple o esquizofrenia por dosificación de citoquinas, seleccionadas de entre IL-6, IL12-p40 y TNF-α.

Figuras

La figura 1 representa las estructuras de la envoltura Env-pV14, del péptido señal y de la fracción soluble de la envoltura Env-SU y de la secuencia en aminoácidos del péptido señal y de la fracción soluble de la envoltura Env-SU. La figura 1 (a) corresponde a la estructura de Env-Pv14 (la proteína de envoltura completa de MSRV) y la estructura del péptido señal y de la fracción soluble de la envoltura Env-SU. La fracción soluble de la envoltura (Env-SU) corresponde a una fracción de 287 aminoácidos que representan la unidad soluble extracelular escindida en la posición K316 de la proteína completa Env pV14. La figura 1 (b) representa la secuencia en aminoácidos del péptido señal y de EnvSU. En la figura 1 (b), la secuencia en aminoácidos del péptido señal está encuadrada y la fracción soluble de la envoltura (Env-SU) se indica en negrita. La secuencia de Env-SU está referenciada en el identificador de secuencias en SEC ID nº 1. La secuencia completa de la envoltura Env pV14 está disponible en GenBank bajo el número de acceso AF331500. Las diferentes partes de la proteína Env pV14 se definen generalmente como se describe ahora, en referencia a la figura 1(a):

- el péptido señal empieza en el aminoácido 1 y termina en el aminoácido 29 (inclusive),
- Env-SU empieza en el aminoácido 30 y termina en el aminoácido 316 (inclusive), y
- el campo transmembranario empieza en el aminoácido 317 y termina en el aminoácido 542 (inclusive).

La masa molecular media calculada de Env-SU es igual a 32061.59. Su pI estimado es igual a 9,61. Su composición

en aminoácidos es la siguiente:

Aminoácidos no polares:

	Nombre	Porcentaje
A	9	3,14
V	16	5,57
L	25	8,71
I	13	4,53
P	21	7,32
M	7	2,44
F	11	3,83
W	6	2,09

5

Aminoácidos polares:

	Nombre	Porcentaje
G	16	5,57
S	31	10,80
T	34	11,85
C	12	4,18
Y	10	3,48
N	18	6,27
Q	9	3,14

10

Aminoácidos ácidos:

	Nombre	Porcentaje
D	4	1,39
E	10	3,48

Aminoácidos básicos:

	Nombre	Porcentaje
K	9	3,14
R	12	4,18
H	14	4,88

15 Figura 2: Env-SU induce la producción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de PBMC (células mononucleadas)
humanas. La figura 2A representa la secreción de TNF- α , de IL-1 β y de IL-6, analizada por el ensayo ELISA
(enzyme-linked immunosorbent assay) de los sobrenadantes de cultivo de PBMC de donantes sanos, estimulados
durante 24 horas con unas dosis crecientes de Env-SU. Los resultados corresponden a tres experimentos
independientes. Las dosis de Env-SU están representadas en las abscisas (en $\mu\text{g/ml}$). El eje de las ordenadas
20 corresponde a las cantidades de citoquinas (en ng/ml). En las curvas, el símbolo ■ corresponde a la secreción de IL-
6, el símbolo ● corresponde a la secreción de IL-1 β y el símbolo ▲ corresponde a la secreción del TNF- α . En la
figura 1B, los PBMC se estimularon con 1 $\mu\text{g/ml}$ de control autólogo, de Env-SU, de LPS o de SEB, y se incubaron
durante 24, 48 y 72 horas antes del análisis de la secreción de las citoquinas por ELISA. Los ejes de las abscisas
corresponden al tiempo en horas y los ejes de las ordenadas corresponden a la producción de citoquinas IFN γ ,
25 TNF α , IL-6 e IL-1 β en ng/ml para IFN γ e IL-6 (figuras 1B (a) y 1B (c)) y en pg/ml para TNF α e IL-1 β (figuras 1B(b) y
1B (d)). En esta figura -●- corresponde a Env-SU, -x- corresponde a LPS, -▲- corresponde al control autólogo y...■...
corresponde a SEB.

30 Figura 3: las actividades que estimulan las citoquinas de Env-SU no se deben a una contaminación por endotoxinas.
Los PBMC se estimularon durante 24 horas con el control autólogo (MOCK), Env-SU, LPS o SEB. Cuando se indica,
las células se han tratado con 10 $\mu\text{g/ml}$ de polimixina B (pdyB) antes de la estimulación (representado en negro en la
figura). En paralelo, las células también se incubaron con unas proteínas y unas toxinas hervidas (100°C) durante 30
minutos (representado en gris en la figura). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y ensayaron para la
35 liberación del TNF- α por ELISA. Los resultados presentados en esta figura corresponden a la media de tres
experimentos. El eje de las ordenadas corresponde a las cantidades de TNF- α liberado, en pg/ml.

40 Figura 4: el anticuerpo monoclonal anti-Env-SU (13H5A5) bloquea la actividad que estimulan las citoquinas de Env-
SU. Los PBMC se estimularon durante 24 horas con 1 $\mu\text{g/ml}$ del control autólogo CK2, Env-CU y LPS, y se
preincubaron o no con 30 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal anti-Env-SU y de anticuerpo monoclonal anti-Gag
(3H1H6). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y ensayaron para la secreción del TNF- α . Los resultados
presentados en esta figura corresponden a la media de tres experimentos. El eje de las ordenadas corresponde a
las cantidades de TNF- α liberado, en pg/ml.

Figura 5: Env-SU activa directamente los monocitos humanos purificados. Se purificaron unos monocitos humanos a partir de PBMC humanos (pureza superior al 95%) y después se estimulan con el control autólogo (Mock), Env-SU o LPS, a una concentración de 1 µg/ml, durante 24 horas. La figura 5a representa la expresión de los marcadores de activación CD80 (figura de la izquierda) y CD86 (figura de la derecha) analizada por citometría de flujo. En las abscisas se representa el número de células contadas y en las ordenadas la intensidad de fluorescencia por célula ("counts"). El resultado representa el número de células contadas para cada intensidad de fluorescencia. La zona definida por las curvas representa el número de células totales para cada condición ensayada. La distribución de las células en función de la intensidad de fluorescencia se muestra mediante el aspecto de la curva. La zona blanca representa los resultados obtenidos con el control (Mock), la zona gris, contorno de trazos finos, representa los resultados obtenidos con Env-SU y la zona gris, contorno muy grueso, representa los resultados obtenidos con el LPS. La figura 5b representa las secreciones de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12p40, analizadas por ELISA. En blanco se representan los resultados obtenidos después de la estimulación por el control autólogo. Los resultados obtenidos después de la estimulación por Env-SU y LPS están representados respectivamente en negro y gris. El eje de las ordenadas corresponde a las cantidades de citoquinas segregadas, en ng/ml. Los resultados representan la media de tres experimentos.

Figura 6: Env-SU activa las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC). Los MDDC se han generado a partir de monocitos purificados y después se estimularon con el control autólogo, Env-SU, o LPS, a una concentración de 1 µg/ml, durante 24 horas. La figura 6a representa la expresión de los marcadores de activación CD80, CD86, CD40 y HLA-DR, analizada por citometría de flujo. En las abscisas se representa el número de células contadas y en las ordenadas la intensidad de fluorescencia por célula ("counts"). La imagen superior izquierda representa el análisis del CD80, la imagen superior derecha el del CD86, la imagen inferior izquierda representa el del CD40 y la imagen inferior derecha el del HLA-DR. El resultado representa el número de células contadas para cada intensidad de fluorescencia. La zona definida por las curvas representa el número de células totales para cada condición ensayada. La distribución de las células en función de la intensidad de fluorescencia se muestra por el aspecto de la curva. La zona blanca de la izquierda representa los resultados obtenidos con el control testigo (Mock), la zona blanca de la derecha, contornos de trazos más grueso, representa los resultados obtenidos con Env-SU y la zona gris representa los resultados obtenidos con LPS. La figura 6b representa la secreción de TNF-α, IL-6, IL-12p40 e IL-12p70, analizado por ELISA, en los sobrenadantes de cultivo. El eje de las ordenadas corresponde a las cantidades de citoquinas segregada, en ng/ml. En los histogramas representados en la figura 6b, Mock corresponde a los resultados obtenidos después de la estimulación con el control autólogo, Env-SU (en negro) corresponde a los resultados obtenidos después de la estimulación con Env-SU y LPS (en gris) corresponde a los resultados obtenidos después de la estimulación con LPS. La figura 6c representa la proliferación alométrica de las células T por las células dendríticas previamente estimuladas por: Env-SU -■-, LPS --▲--, control CK2 -●-. El eje de las abscisas representa el número de células dendríticas (respectivamente 0, 1000, 5000 y 10000). El eje de las ordenadas representa el número de conteos por minuto emitido por las células que han incorporado ³H-timidina.

Figura 7: CD14 y TLR4 están implicados en las propiedades proinflamatorias de Env-SU. Los PBMC se preincubaron durante una hora con o sin anticuerpos neutralizantes anti-CD14 ((rhCD14, ref.: AB383, R&D Systems - UK) (figura 7a) y anti-TLR4 (figura 7b), a una concentración de 20 µg/ml y 5 µg/ml. Las células se estimularon después durante 24 horas con el control CK2, Env-SU(ENV1), LPS y SEB, a una concentración de 1 µg/ml. La liberación de TNF-α se analizó en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los resultados se muestran en los histogramas de las figuras 7a y 7b. El eje de las ordenadas corresponde a la cantidad de TNF-α liberado, en ng/ml. Los histogramas en negro corresponden a los resultados obtenidos sin adición de anticuerpos, los histogramas en blanco corresponden a los resultados obtenidos en presencia de anticuerpo anti-CD14 y anti-TLR4, a 20 µg/ml, y los histogramas en gris corresponden a los resultados obtenidos en presencia de anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4, a 5 µg/ml. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos.

Figura 8: Cascada de amplificación inmunológica consecutiva a la activación de la vía TLR4. Ejemplo de las dianas terapéuticas en esta cascada.

La figura 8 representa esquemáticamente la cascada de activación que resulta de la expresión patológica de una proteína de la envoltura MSR/HERV-W. Esta estimula inicialmente el receptor TLR-4, asociando eventualmente el co-receptor CD14. Antes de esta interacción hay sólo un agonista, la proteína MSR-ENV. Después de esta activación, las células de la inmunidad innata se activan y aparecen decenas de efectores moleculares (citoquinas, enzimas, lípidos, compuestos radicalarios o redox, etc.) y células activadas. En el caso de la esclerosis múltiple, se activa un segundo componente después de la destrucción de la sustancia blanca del cerebro y de la presentación de antígenos de mielina en los linfocitos T, a saber el componente autoinmune relacionado con las células T-autorreactivas de la inmunidad adaptativa. En esta fase, centenares, incluso miles de moléculas y células diferentes están implicadas en la mediación de los efectos inmunopatológicos. Se obtiene típicamente una cascada de amplificación inmunopatológica cuyo potencial no es comparable con los estímulos iniciales (ENV MSR/HERV-W).

Los tratamientos disponibles o propuestos hoy día dirigen "aguas abajo" unos agonistas proinflamatorios o patogénicos entre otros numerosos agonistas presentes en la fase de la cascada de amplificación en la que han aparecido (ejemplos dados con los anticuerpos anti-TNF-alfa, el interferón beta y una molécula antirradicalar como el

ácido ferúlico). En este contexto, no pueden inhibir el efecto de otros efectores muy numerosos (moléculas y células) que no son sensibles a sus efectos farmacológicos. Esto explica el efecto parcial y relativo de muchos tratamientos actuales en una enfermedad como la SEP.

5 Además, estos no impiden que otras células que expresan (bajo el efecto de cofactores del entorno iterativos, como por ejemplo las *Herpesviridae*) una copia patógena MSR/V/HERV-W produzcan una envoltura proinflamatoria en el mismo sitio de lesión, o en otro sitio cerebral, en el mismo periodo o en un periodo diferente (principio de los padecimientos multifocales y de las recaídas/remisiones que definen la SEP en el espacio cerebral y en el tiempo de evolución de la enfermedad).

10 Así, un tratamiento que inhibe el efecto inicial de una fase de la cascada en la que no se producen todos los efectores aguas abajo inducibles por la proteína diana, presentan una pertinencia y una eficacia potencial muy superior a los enfoques comúnmente concebidos y utilizados en estas patologías asociadas a los efectos proinflamatorios de esta proteína de la envoltura MSR/V/HERV-W. En efecto, incluso si la cascada está activada, será agotada aguas arriba por esta estrategia terapéutica, mientras que la estimulación aguas arriba continuará en los otros enfoques terapéuticos "aguas abajo". Finalmente, en un enfoque preventivo de las nuevas recaídas durante los periodos de remisión de la enfermedad, estos anticuerpos pueden neutralizar las proteínas "ENV MSR/V/HERV-W" antes de que inicien la cascada descrita en la presente memoria, mientras que las otras terapias que dirigen las moléculas o las células "aguas abajo" pueden intervenir sólo después de la activación de esta cascada inflamatoria.

20 Figura 9: cuatro etapas claves para llegar a dos enfermedades a partir del efecto proinflamatorio de la proteína ENV MSR/V/HERV-W:

- 25 (i) dos etapas "aguas arriba" comunes: I- Activación de los receptores TLR4 y II- inflamación local.
- (ii) dos etapas "aguas abajo" diferentes: III- desmielinización o excitotoxicidad neuronal y IV- esclerosis múltiple o esquizofrenia.

30 La proteína de la envoltura (Env) está producida por una copia retroviral de la familia MSR/V/HERV-W, en un contexto de activación patológico como, por ejemplo, después de la transactivación por un cofactor infeccioso de la familia de las *Herpesviridae* [46-49] en un territorio tisular determinado por el tropismo de este cofactor y por la presencia de células en el tejido diana que aloja por lo menos una copia proviral MSR/V/HERV-W activable por este cofactor y que codifica para una proteína de la envoltura.

35 Esta proteína ENV así producida se une al receptor TLR4 y, según el contexto, a los co-receptores de TLR4 como el CD14, unas células de tipo macrófago o microglíocito presente en el tejido cerebral cerca de la célula productora de ENV MSR/V/HERV-W y/o de viriones MSR/V. Si esta última es un macrófago o un microglíocito, es posible el efecto autocrino sobre los receptores TLR4 de esta misma célula.

40 Después de esta etapa de interacción con el receptor TLR4, la cascada de amplificación inmunopatológica crea, con la producción de decenas de moléculas proinflamatorias y mediadoras de destrucción tisular, una inflamación local en el tejido en cuestión, alrededor del sitio de reactivación MSR/V/HERV-W.

45 Después de esta fase, la situación diverge según si los cofactores de reactivación MSR/V/HERV-W y la localización de las células que alojan estos provirus "respondedores" han confluído hacia una expresión en la sustancia blanca o en la sustancia gris.

50 En el primer caso, que determina la vía patológica que llega a una patología como la esquizofrenia, la reactivación o la sobreexpresión inducida de un elemento MSR/V/HERV-W cerca de las estructuras neuronales del córtex frontal induce una inflamación local que, en el contexto tisular de la sustancia gris, no permitirá una actividad pro-lesional mayor y un reclutamiento inmunitario específico. Esta inflamación local no permitirá una infiltración de linfocitos T a este nivel. Por el contrario, los mediadores proinflamatorios producidos cerca de las células neuronales responsables de las actividades "intelectuales" y cognitivas, provocan una excitotoxicidad neuronal focal que determina una disfunción de las redes neuronales asociadas en el espacio cerebral afectado y en el tiempo que dura esta producción pro-inflamatoria [17, 20, 22-26, 29, 50, 51]. Según los territorios afectados, los trastornos "psíquicos" que resultan de las activaciones neuronales excitotóxicas se traducen por unas manifestaciones alucinatorias y delirantes que caracterizan los accesos clinicopatológicos de la esquizofrenia. Al final, se conoce que esta excitotoxicidad neuronal puede llevar a una muerte celular (neurotoxicidad), lo que está objetivado por el ensanchamiento ventricular medido en IRM en el cerebro de los pacientes que padecen esquizofrenia [52].

60 En el segundo caso, que determina la vía patológica que lleva a la esclerosis múltiple, la mielina de la sustancia blanca es extremadamente sensible a los agentes radicalarios y proinflamatorios que generan una desmielinización primaria con presentación de auto-antígenos en los linfocitos reclutados por la inflamación previa. En estas condiciones, unos sesgos de reactividad de los linfocitos están condicionados por las citoquinas segregadas previamente por las células de tipo microglíocito/macrófago (sesgo Th1) que pueden ser suficientes para generar una respuesta autoinmune frente a "auto" antígenos presentados en estas condiciones. Pero, además, se ha

demostrado que la proteína de la envoltura MSR_V entera o los viriones MSR_V podían ejercer una actividad diferente a nivel de los linfocitos T, a saber una actividad de superantigénico, caracterizada por una interacción con el receptor "TCR". Esta última propiedad viene, en este contexto "aguas abajo" en el que unos linfocitos T reclutados por la inflamación primaria infiltran el tejido, a añadir *in fine* una activación policlonal de los linfocitos T que favorece aún más la respuesta linfocitaria T autoinmune específica de los antígenos de mielina expuestos en el tejido previamente lesionado por la inflamación primaria. En este contexto, una segunda dimensión de la reacción inmunopatológica interviene entonces con los efectos de la autoinmunidad y de la inflamación mediada por los linfocitos T activados.

Figura 10: producción de citoquinas inducidas por ENV-SU sobre PBMC de pacientes que padecen esclerosis múltiple (SEP) y de donantes sanos (DS): TNF-alfa, IL-1beta e IL-10.

La figura 10 representa la producción de citoquinas inducida por la proteína ENV-SU MSR_V en las células mononucleadas sanguíneas (PBMC) extraídas *ex vivo*, por un lado, de pacientes que padecen esclerosis múltiple (SEP), y por otro lado, en donantes sanos (DS). La indicación "n=" al lado de DS o de SEP da el número de personas sometidas a ensayo para cada población frente a la citoquina representada.

El eje de las abscisas representa la dosificación de las citoquinas en el sobrenadante de los cultivos de PBMC estimulados en ng/ml. Cada gráfico compara los resultados para cada individuo sometido a ensayo, representado por un punto (circular) en cada población (DS y SEP). Los tres gráficos representan, de izquierda a derecha, la producción de "tumour necrosis factor" (TNF)-alfa, de interleucina (IL)-1beta y de interleucina (IL)-10. Como se ha calculado, los resultados comparados de las poblaciones DS y SEP no son significativamente diferentes para estas tres citoquinas (no significativas, NS). El análisis estadístico se efectuó con el ensayo t de Student.

Figura 11: producción de citoquinas inducidas por ENV-SU sobre PBMC de pacientes que padecen esclerosis múltiple (SEP) y de donantes sanos (DS): IL-12p40 e IL-6.

La figura 11 representa la producción de citoquinas inducidas por la proteína ENV-SU MSR_V en las células mononucleadas sanguíneas (PBMC) extraídas *ex vivo*, por un lado en pacientes que padecen esclerosis múltiple (SEP) y, por otro lado, en donantes sanos (DS). La indicación "n=" al lado de DS y SEP da el número de personas sometidas a ensayo para cada población frente a la citoquina representada.

El eje de las abscisas representa la dosificación de las citoquinas en el sobrenadante de los cultivos de PBMC estimulados en ng/ml. Cada gráfico compara los resultados para cada individuo sometido a ensayo, representado por un punto (circular) en cada población (DS y SEP). Los dos gráficos representan, de izquierda a derecha, la producción de interleucina (IL)-12p40 y de interleucina (IL)-6. Como se ha calculado, los resultados comparados de las poblaciones DS y SEP son significativamente muy elevados en la población SEP para estas dos citoquinas ($p=0,003$ para IL-12p40 y $p=0,006$ para IL-6). El análisis estadístico se efectuó con el ensayo t de Student.

Figura 12: correlaciones entre las producciones de citoquinas y los parámetros clínicos de los pacientes.

La figura 12 representa los resultados gráficos del análisis de correlación entre unos parámetros clínicos de la población SEP estudiada (en las abscisas) y los porcentajes de ciertas citoquinas (en las ordenadas) producidas en respuesta a la estimulación de su PBMC por la proteína ENV MSR_V-SU. Para cada gráfico, el valor de "r" representa el cálculo estadístico de distribución de los puntos con respecto a la recta de correlación. El valor "p" representa que la probabilidad estadística de que esta correlación se obtiene al azar; Así, cualquier valor de p superior a 0,05 es "no significativo" y cualquier valor inferior a 0,05 es significativo de una correlación que existe entre los factores analizados.

Los dos gráficos de arriba muestran los parámetros que se han encontrado con una correlación significativa entre el resultado clínico de los pacientes SEP, EDSS [53] medido en una escala de gravedad de 1 a 10, e IL-6 (a la izquierda) o IL12p40 (a la derecha).

Los dos gráficos de abajo muestran dos ejemplos de los parámetros que no se han encontrado significativamente correlacionados: la duración de la enfermedad y la IL-6 (a la izquierda) o el interferón gamma y el resultado clínico EDSS (a la derecha).

Figura 13: producción espontánea (a) o inducida por ENV-SU (b) de citoquinas en PBMC de pacientes que padecen esquizofrenia (SCZ) y de donantes sanos (DS): IL-10.

La figura 13 representa la producción de citoquinas inducida por la proteína ENV-SU MSR_V en las células mononucleadas sanguíneas (PBMC) extraídas *ex vivo* por un lado en pacientes que padecen esquizofrenia (SCZ), y por otro lado, en donantes sanos (DS).

El eje de las abscisas representa la dosificación de las citoquinas en el sobrenadante de los cultivos de PBMC estimulados en ng/ml. Cada gráfico compara los resultados para cada individuo sometido a ensayo, representado por un punto en cada población (DS y SEP). Los dos gráficos representan, de izquierda a derecha, la producción de

interleucina (IL)-10 espontánea en cultivo y de interleucina (IL)-10 inducida después de la estimulación por ENV-SU.

Figura 14: producción espontánea (a) o inducida por ENV-SU (b) de citoquinas en PBMC de pacientes que padecen esquizofrenia (SCZ) y de donantes sanos (DS), con cálculo del incremento relativo (c): IL-12p40.

5 La figura 14 representa la producción de citoquinas inducida por la proteína ENV-SU MSR/V en las células mononucleadas sanguíneas (PBMC) extraídas *ex vivo* por un lado de pacientes que padecen esquizofrenia (SCZ) y por otro lado de donantes sanos (DS).

10 El eje de las abscisas representa la dosificación de las citoquinas en el sobrenadante de los cultivos de PBMC estimulados en ng/ml. Cada gráfico compara los resultados para cada individuo sometido a ensayo, representado por un punto en cada población (DS y SEP). Los tres gráficos representan, de izquierda a derecha, a) la producción de interleucina (IL)-12p40 espontánea en cultivo, b) de interleucina (IL)-10 inducida después de la estimulación por ENV-SU, y c) el incremento relativo de producción de IL12p40 calculado según la fórmula: (cantidad después de la estimulación ENV-SU - cantidad espontánea/cantidad espontánea).

15
20 Figura 15: identificación y selección de los anticuerpos monoclonales anti-ENV MSR/V/HERV-W inhibidores de la activación proinflamatoria de los monocitos macrófagos inducida por la proteína ENV-SU, en cultivos de PBMC humanos que provienen de donantes sanos. a) análisis con dos anticuerpos anti-ENV y un anticuerpo control, b) verificación de las condiciones de especificidad del análisis, c) ejemplo de experiencia independiente, d) otro ejemplo de experimento independiente.

25 La figura 15a representa, en las ordenadas, la secreción de TNF-alfa (ng/ml) inducida por (en las abscisas) la proteína control "Mock" (1 microgramo/ml), ENV-SU (1 microgramo/ml) y LPS (1 microgramo/ml), en un cultivo de PBMC de un donante sano. De izquierda a derecha, para cada condición de estimulación: la barra blanca representa el resultado en ausencia de anticuerpos, la barra negra representa el resultado en presencia de anticuerpos anti-ENV MSR/V 3B2H4 (30 microgramos/ml), la barra rayada representa el resultado en presencia de anticuerpos anti-ENV MSR/V 13H5A5 (30 microgramos/ml) y la barra gris representa el resultado en presencia de anticuerpos anti-GAG MSR/V 3H1H6 (30 microgramos/ml).

30 La figura 15b representa, en las ordenadas, la secreción de TNF-alfa (ng/ml) inducida por (en las abscisas) la proteína control "Mock" (1 microgramo/ml), ENV-SU (1 microgramo/ml) y LPS (1 microgramo/ml), en un cultivo de PBMC del mismo donante sano que en 15a. De izquierda a derecha, para cada condición de estimulación: la barra blanca representa el resultado en ausencia de anticuerpo, la barra negra representa el resultado en presencia de polimixina B (25 microgramos/ml) y la barra gris representa el resultado obtenido con MOCK, ENV-SU o LPS calentado a 100°C durante 30 minutos, previamente a su adición en el cultivo de PBMC.

35 La figura 15c representa, en las ordenadas, la secreción de TNF-alfa (pg/ml) inducida por la proteína control «Mock» ilustrada por una barra blanca (1 microgramo/ml), ENV-SU ilustrada por una barra negra (1 microgramo/ml) y LPS ilustrado por una barra rayada (1 microgramo/ml), en un cultivo de PBMC de un donante sano. De izquierda a derecha, para cada condición de estimulación, los resultados se proporcionan para los anticuerpos indicados en las abscisas: anticuerpo «X» anti-toxoplasma de mismo isotipo que 3B2H4 (30 microgramos/ml), anticuerpo anti-ENV MSR/V 3B2H4 (30 microgramos/ml), anticuerpo anti-ENV MSR/V 13H5A5 (30 microgramos/ml), anticuerpo anti-ENV MSR/V 3H10F10 (30 microgramos/ml) anticuerpo anti-GAG MSR/V 3H1H6 (30 microgramos/ml).

40 La figura 15d representa, en las ordenadas, la secreción de TNF-alfa (pg/ml) inducida por la proteína control «Mock CK2» ilustrada por una barra blanca (1 microgramo/ml) y ENV-SU ilustrada por una barra negra (1 microgramo/ml), en un cultivo de PBMC de un donante sano. De izquierda a derecha, para cada condición de estimulación, los resultados se dan para los anticuerpos indicados en las abscisas: anticuerpo «X» anti-toxoplasma de mismo isotipo que 3B2H4 (30 microgramos/ml), anticuerpo anti-ENV MSR/V 3B2H4 (30 microgramos/ml), anticuerpo anti-ENV MSR/V 6A2B2 (30 microgramos/ml), anticuerpo anti-ENV MSR/V 3H10F10 (30 microgramos/ml) y anticuerpo anti-ENV MSR/V 13H5A5 (30 microgramos/ml).

45
50
55 Figura 16: cinética de producción del TNF- α sobre PBMC.

Unos PBMC de donantes sanos se estimularon con 5 μ l de tampón (curva en línea discontinua y círculos), 1 μ g/ml de ENV-SU (curva en trazo grueso con cuadrados) o 1 μ g/ml de LPS (curva en trazo fina con triángulos) y se incubaron durante 2h, 24h o 48h (eje de las abscisas), antes del análisis de la producción de TNF- α por ELISA (eje de las ordenadas en pg/ml).

60 Figura 17: efectos proinflamatorios de ENV-SU en SCID-humanizada.

65 Los ratones SCID de aproximadamente 25g recibieron, como se indica en las abscisas, unas inyecciones de tampón, de 50 μ g de ENV-SU por animal o de 50 μ g de LPS por animal. Como se indica también en las abscisas para cada tipo de inóculo, el suero o el líquido procedente del lavado peritoneal (IP) de los ratones sacrificados a 2h, 24h y 48h se analizaron por ELISA.

Los gráficos de la izquierda representan la dosificación del TNF-alfa (pg/ml). El de arriba representa la dosificación de la citoquina murina y el de abajo la de la citoquina humana.

- 5 Los gráficos de la derecha representan la dosificación de la IL-6 (pg/ml). El de arriba representa la dosificación de la citoquina murina y el de abajo la de la citoquina humana.

Figura 18: inducción de EAE por la proteína ENV MSR/V

- 10 La figura 18 representa los resultados de un experimento preliminar de inducción de EAE por la proteína ENV MSR/V en ratones C57B16.

El eje de las abscisas representa los días después de la inyección. El eje de las ordenadas representa el resultado clínico medio de los animales estudiados.

- 15 La curva con los cuadrados representa los animales control positivos inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) y el adyuvante completo de Freund (que contiene el extracto de *Mycobacterium tuberculosis*). El estudio de esta serie se finalizó en este caso en el día 18.

- 20 La curva con los triángulos representa los animales inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) y el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y la proteína ENV-SU MSR/V. El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 25.

- 25 La curva con los rombos representa los animales control negativos inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) y el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*). El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 25.

Figura 19: reproducción de la inducción de EAE por la proteína ENV SR/V.

- 30 La figura 19 representa los resultados de un experimento que confirma la inducción de EAE por la proteína ENV MSR/V en ratones C57B16.

El eje de las abscisas representa los días después de la inyección. El eje de las ordenadas representa el resultado clínico medio de los animales estudiados.

- 35 La curva con los cuadrados representa los animales control positivos inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) y el adyuvante completo de Freund (que contiene el extracto de *Mycobacterium tuberculosis*). El estudio de esta serie se finalizó en este caso el día 21.

- 40 La curva con los triángulos representa los animales inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) y el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y la proteína ENV-SU MSR/V. El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 42.

- 45 La curva con los rombos representa los animales control negativos inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) y el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*). El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 42.

- 50 La curva con las cruces representa los animales control negativos inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y LPS. El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 42.

Figura 20: Dosificación a las 24h de la respuesta autoinmune a dosis crecientes de autoantígeno MOG en los ratones del modelo «EAE/MOG/ENV-SU» y en el control inmunizado sin ENV.

- 55 El eje de las abscisas representa las concentraciones de autoantígeno MOG (microgramo/ml) puesto en presencia de PBMC de ratones extraídos durante el protocolo ilustrado en la figura 19. El eje de las ordenadas representa la dosificación de interferón gamma segregado *in vitro* por los linfocitos T autoinmunes presentes en los PBMC presentados en dosis crecientes de antígeno MOG.

- 60 Las barras blancas representan los PBMC de ratones que han recibido en una inyección *in vivo* (en el día "0" de la serie ilustrada en la figura 19), el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y la proteína ENV-SU MSR/V.

- 65 Las barras negras representan los PBMC de ratones control que han recibido en inyección *in vivo* (en el día "0" de la serie ilustrada en la figura 19), el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*).

Figura 21: cinética de la respuesta linfocitaria T autoinmune anti-MOG revelada por la secreción de interferón gamma en los ratones del modelo «EAE/MOG/ENV-SU» y en el control inmunizado sin ENV.

5 El eje de las abscisas representa los plazos post-inoculación de la preparación "MOG y adyuvantes" (en horas) a los que se han extraído los PBMC sobre los ratones de la serie ilustrada en la figura 19. El eje de las ordenadas representa la dosificación de interferón gamma segregado *in vitro* por los linfocitos T autoinmunes presentes en los PBMC.

10 Las barras blancas representan los PBMC de ratones que han recibido en inyección *in vivo* (en el día "0" de la serie ilustrada en la figura 19), el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y la proteína ENV-SU MSR.V.

15 Las barras negras representan los PBMC de ratones control que han recibido en inyección *in vivo* (en el día "0" de la serie ilustrada en la figura 19), el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*).

20 Figura 22: actividad terapéutica de los anticuerpos anti-ENV MSR.V seleccionados por sus efectos inhibidores de la activación pro-inflamatoria de ENV-SU, demostrado en un modelo de SEP desarrollado y validado en la presente invención.

25 La figura 22 representa los resultados de un experimento que confirma la inducción de EAE por la proteína ENV MSR.V en ratones C57Bl6 y el efecto inhibitor de los anticuerpos monoclonales anti-ENV MSR.V/HERV-W previamente seleccionados en el ensayo de inhibición de la actividad proinflamatoria mediada por TLR4, inducida por el fragmento soluble ENV-SU de la proteína ENV.

El eje de las abscisas representa los días después de la inyección. El eje de las ordenadas representa el resultado clínico medio de los animales estudiados.

30 La curva con los cuadrados representa los animales control positivos inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), y el adyuvante completo de Freund (que contiene el extracto de *Mycobacterium tuberculosis*). El estudio de esta serie finalizó en este caso en el día 28.

35 La curva con los triángulos representa los animales inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y la proteína ENV-SU MSR.V. El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 28.

40 La curva con los rombos representa los animales control negativos inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), y el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*). El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 28.

45 La curva punteada con las cruces representa los animales inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y la proteína ENV-SU MSR.V. Estos animales han recibido además una dosis de 50 microgramos por kilo, es decir un microgramo para un ratón de 20 gramos, de anticuerpos control anti-GAG MSR.V 3H1H6. El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 28.

50 La curva con los círculos representa los animales inyectados con el autoantígeno MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), el adyuvante incompleto de Freund (que no contiene el extracto de *M. tuberculosis*) y la proteína ENV-SU MSR.V. Estos animales han recibido además una dosis de 50 microgramos por kilo, es decir un microgramo para un ratón de 20 gramos, de anticuerpos control anti-GAG MSR.V 3B2H4. El estudio de esta serie se prosiguió en este caso hasta el día 28.

55 Figura 23: secuencias de aminoácidos comparadas entre la proteína ENV MSR.V (línea de abajo) y la proteína ENV codificada por la copia HERV-W 7q (línea de arriba) las secuencias encuadradas son idénticas (regiones conservadas).

Figura 24: análisis en transferencia western.

60 Cruce antigénico entre la proteína ENV MSR.V y la proteína ENV codificada por orf env de la copia HERV-W localizada ubicuitariamente sobre el cromosoma 7q V14= proteína recombinante ENV codificada por el clon MSR.V pV14 H74= proteína recombinante ENV codificada por el clon HERV-W7q pH74 3C1D5: anticuerpo monoclonal obtenido después de la inmunización con unas proteínas recombinantes procedentes de clones MSR.V.

65 La flecha muestra el nivel de las bandas detectadas. 60 Kda indica el nivel del peso molecular correspondiente.

Figura 25: análisis de las propiedades antigénicas de la proteína ENV-SU.

Análisis en transferencia wester.

5 Las figuras 25a, b y c representan el análisis de la secuencia de aminoácido de la proteína MSR/V ENV-SU por el programa de análisis "Mac Vector" con la función "Protein analysis toolbox". Las regiones encuadradas por los 3 rectángulos verticales representan las tres regiones antigénicas más probables según un análisis de las secuencias primarias y secundarias.

10 Figura 25a, tres gráficos que ilustran la antigenicidad de las regiones "ENV-SU". Las zonas grises por encima del "0" del eje de las ordenadas tienen una antigenicidad positiva, la de debajo no la tienen (antigenicidad negativa).

15 Figura 25b, los dos gráficos de arriba ilustran la hidrofiliicidad de las regiones "ENV-SU". Las zonas grises por encima del "0" del eje de las ordenadas tienen una hidrofiliicidad positiva, la de debajo tienen una hidrofiliicidad negativa.

El gráfico de abajo ilustra la flexibilidad de las regiones "ENV-SU". Las zonas grises por encima del "0" del eje de las ordenadas tienen una flexibilidad positiva, la de debajo tienen una flexibilidad negativa.

20 Figura 25c, el gráfico ilustra la probabilidad de superficie de las regiones "ENV-SU". Las zonas grises por encima del "0" del eje de las ordenadas tienen una flexibilidad positiva, la de debajo tienen una probabilidad de superficie negativa.

PARTE EXPERIMENTAL

25

Estudio *in vitro*

Materiales y métodos

30 Proteínas y toxinas

La proteína de superficie de la envoltura de MSR/V (Env-SU) corresponde a una secuencia proteica de 287 aminoácidos de la proteína total de la envoltura (Env Pv14, GenBank AF331500). Las estructuras y las secuencias en aminoácidos de Env Pv14 y de Env-SU están respectivamente representadas en las figuras 1(a) y 1(b). La proteína Env-SU de MSR/V recombinante está expresada en *E. coli* y purificada sobre una columna FPLC. La calidad y la pureza de la proteína se confirman por espectrometría de masas y transferencia western. La caseína quinasa se utiliza como control negativo autólogo. Esta proteína de control se produjo y se purificó en las mismas condiciones que Env-SU.

40 Las dos proteínas son ensayadas por la presencia de endotoxinas mediante un ensayo sobre lisado de *Amebocyte* de *Lymulus* (LAL) realizado por la compañía CleanCells (Bouffere, Francia). Todas las fracciones están por debajo del límite de detección de 5 UI/ml. La enterotoxina B de estafilococo (SEB) obtenida en Toxin Technology (Sarasota, FL, USA), era pura al 95%. El liposacárido (LPS) de *E. coli* cepa 026:B6 se obtiene de Sigma Aldrich.

45 Medio de cultivo.

El medio de cultivo es el medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con:

50 L-glutamina 1% (Sigma-Aldrich),
penicilina/estreptomicina 1% (Sigma-Aldrich),
piruvato de sodio 1% (Sigma-Aldrich),
aminoácidos no esenciales 1% (Sigma-Aldrich),
SVF (suero de ternera fetal) inactivado por el calor al 10% (BioWest).

55 Para los ensayos de proliferación de las células T, se utilizó un suero AB humano (Sigma-Aldrich) en lugar del SVF.

Aislamiento de las células y de la preparación.

60 Unas células mononucleadas humanas de la sangre periférica (PBMC) se aíslan a partir de donantes sanos por centrifugación por gradiente de densidad sobre Ficoll Paque. Los monocitos de PBMC son purificados por eliminación de las células T, de las células B, de las células dendríticas, de las células NK y de los basófilos, utilizando el kit de aislamiento de los monocitos, comercializado por la compañía Miltenyi Biotec. En resumen, los PBMC se incuban en primer lugar con un cóctel de anticuerpos monoclonales y de anti-inmunoglobulina humana conjugados con un hapteno y se marcan magnéticamente (anti-CD3, anti-CD7, anti-CD19, anti-CD45Ra, anti-CD56 y anti-IgE), después con unas microesferas (Macs MicroBeads) acopladas a unos anticuerpos monoclonales anti-hapteno. Las células marcadas magnéticamente se eliminan finalmente reteniéndolas en una columna en un campo

5 magnético. La pureza de la población de los monocitos recuperada es siempre superior al 95%, como se determina por la expresión de CD14 por análisis por citometría de flujo. Para la generación de monocitos derivados de las células dendríticas (MDDC), los monocitos purificados se cultivan durante 5 días sobre unas placas de 6 pocillos que contienen IL-4 a 25 ng/ml y GM-CSF a 50 ng/ml en 2 ml del medio de cultivo. En el día D3 del cultivo, la cantidad completa de citoquinas se añade a las células. Como se muestra por análisis de la morfología y por citometría de flujo, la preparación de células resultante contiene más del 90% de células dendríticas CD1a positivas.

Estimulación celular.

10 Las células (PBMC, monocitos o MDDC) se colocan en unas placas de 24 pocillos, a una concentración de 1×10^6 células por pocillo, en 1 ml de medio de cultivo antes de la estimulación por Env-SU, LPS, SEB, o el control autólogo. Se incuban después a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Cuando se indique, las células se pre-incuban bien con 10 µg/ml de Polimixina B (Sigma-Aldrich), 20 µg/ml y 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD14, 20 µg/ml y 5 µg/ml de anticuerpo anti-TLR-4 (HTA125, eBioscience) o con una IgG de control de isotipo 2a (IgG2a) (eBM2a, eBioscience) antes de la estimulación celular. En algunos experimentos, Env-SU, el control autólogo, LPS y SEB se hierven durante 30 minutos antes del tratamiento celular.

20 Para determinar la especificidad de los resultados, se pre-incuba 1 µg de Env-SU, LPS, SEB y del control autólogo a 4°C durante 1 hora con 30 µg/ml de anticuerpos monoclonales dirigidos bien contra Env-SU (13H5A5; IgG1; biomérieux) o bien contra GAG (3H1H6; IgG1; biomérieux).

Después, las células se incuban durante 24 horas a 37°C, y después los sobrenadantes de cultivo se recogen para el análisis de la secreción de TNF-α, IL-1β e IL-6 por ELISA.

25 Ensayos de proliferación de las células T

30 Los monocitos y los MDDC estimulados se utilizan como estimuladores de las células T. Las células T alogénicas se utilizan a 1×10^5 células por pocillo como células "respondedoras" en unas microplacas de 96 pocillos con fondo redondo. Las células estimuladoras se añaden a las células T en dosis crecientes y los cultivos se efectúan en triplicado en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo. Después de 5 días de incubación a 37°C, la proliferación de las células T se evalúa por medición de la radioactividad incorporada. Para ello, en las últimas 18 horas de incubación, se añade 1 µCi de ³H timidina a cada pocillo. Las células se recuperan después en capas de filtro de vidrio para la medición de la radioactividad incorporada.

35 Marcados por inmunofluorescencia y citometría de flujo.

40 Las células se recogen, se lavan en PBS y después se tiñen mediante unos marcadores de superficie diferentes. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales siguientes (Becton-Dickinson, San Jose, CA): anti-CD1a alofocianina (HI149-APC), anti-CD14 isotiocianato de fluoresceína (MOP9-FITC), CD40 ficoeritrina (5C3-PE), CD80 ficoeritrina (L307.4-PE), CD86 ficoeritrina (IT2.2-PE) y HLA-DR clorofilo de peridina (L243-PerCP).

45 La coloración por inmunofluorescencia directa de las células se realiza en PBS enfriado sobre hielo complementado con SVF al 2%, con los diferentes anticuerpos a las concentraciones recomendadas por los fabricantes. Después de 30 minutos a 4°C, las células se lavan y después se analizan utilizando un FACS Calibur (nombre comercial) y el programa CellQuest (nombre comercial) (Becton Dickinson).

Ensayos de producción de las citoquinas.

50 Los sobrenadantes de cultivos se recogen y se conservan a -20°C antes del análisis de la secreción de las citoquinas. Las cantidades de citoquinas se miden utilizando los kits ELISA OptEIA (nombre comercial) (Pharmigen) para IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p40 y TNF-alfa, respetando las instrucciones del fabricante.

Resultados

55 Env-SU induce la producción de citoquinas proinflamatorias a partir de PBMC humanas.

60 Se ensayó la capacidad de la proteína recombinante Env-SU para estimular la secreción de citoquinas en los cultivos de PBMC. Los PBMC de donantes sanos se incubaron durante 24 horas con unas dosis crecientes de la proteína recombinante Env-SU y se evaluó la secreción de las citoquinas TNF-α, IL-1β e IL-6 por ELISA. Las cantidades de citoquinas segregadas se compararon con las obtenidas con el control autólogo, SEB (un superantígeno bacteriano bien caracterizado) y LPS, bien conocido por tener propiedades proinflamatorias sobre los PBMC humanos. Todas las proteínas y las toxinas se utilizan a una concentración de 1 µg/ml (concentración óptima para la inducción de citoquinas proinflamatorias determinada por unos experimentos dosis/respuesta). Los resultados muestran que Env-SU induce la secreción de las tres citoquinas de manera dependiente de la dosis, incluso a dosis tan bajas como 10 ng/ml. Como se muestra en la figura 2, la cinética de secreción de citoquinas obtenida con Env-SU está más cerca de la del LPS que del SEB. En efecto, la estimulación por Env-SU en las

condiciones del ensayo *in vitro* desarrollada y descrita en la presente memoria se diferencia del todo de la estimulación superantigénica representada en la presente memoria por el antígeno SEB: (i) ninguna secreción precoz de interferón gamma (que firma la activación de los linfocitos T, específicamente reconocidos a nivel del "receptor T-cell" (TCR) por los superantígenos, (ii) secreción importante y precoz de IL-6 (segregada por los monocitos-macrófagos y no por los linfocitos T) y de TNF-alfa, que no están producidos en las condiciones de nuestro ensayo *in vitro* por un superantígeno (tal como se muestra en la presente memoria con el ejemplo del SEB). Además, los ejemplos que muestran la actividad sobre los monocitos purificados y las células dendríticas de la proteína Env MSRV/HERV-W, por su región Env-SU, confirman que estos efectos no pasan por el TCR, que no está presente en estas células, y por lo tanto que el efecto proinflamatorio particular descrito en la presente memoria es muy diferente de la activación proinflamatoria causada por una función superantígeno que, por definición, pasa por la unión al TCR y los linfocitos T. La vía de activación proinflamatoria de la proteína Env MSRV/HERV-W reivindicada en la presente memoria pasa por el "receptor Toll-like 4" (TLR4), eventualmente con la ayuda de su co-receptor CD14, que está activado aguas arriba de la activación de los linfocitos T, como se ilustra en la figura 8. Esta vía proinflamatoria (TLR4) moviliza el componente "innato" del sistema inmunitario, que está movilizado muy aguas arriba de la inmunidad relacionada a los linfocitos "T" (inmunidad adaptativa). Esta vía aguas arriba puede, después de la activación de las células dendríticas, influir aguas abajo en el estado de activación de la inmunidad adaptativa (perfiles Th1 o Th2), a través de unas citoquinas segregadas en respuesta a la activación de un receptor de la inmunidad innata como TLR4. Este último efecto muestra, además del hecho de que la vía de la inmunidad innata está activada aguas arriba de la inmunidad adaptativa mediada por los linfocitos T, que incluso el efecto resultante aguas abajo sobre los linfocitos T no pasa por el receptor TCR. Esto ilustra bien la diferencia entre el efecto de la proteína Env MSRV/HERV-W (Env-SU) observado a este nivel (TLR4) y el efecto superantígeno (ilustrado por el superantígeno SEB en este ejemplo) que pasa por el receptor del linfocito T (TCR). Ahora bien, la vía TLR4 excluye una activación primaria de los linfocitos T a esta fase, y pasa por lo tanto por otras células (monocitos-macrófagos, células dendríticas, linfocitos B). La vía de activación observada en la presente memoria está por lo tanto aguas arriba del efecto superantígeno, lo que corrobora la cinética que corresponde a la referencia "LPS", más que a "SEB" en el ensayo celular utilizado en la presente memoria.

En efecto, Env-SU y LPS son capaces de inducir la secreción de grandes cantidades de TNF- α , de IL-6 y de IL-1 β , a partir de 24 horas, mientras que SEB induce sólo la secreción de TNF- α incluso después de 72 horas de incubación. Es interesante señalar que Env-SU y LPS alcanzan su pico de secreción de TNF- α mientras que SEB induce una secreción constante de TNF- α . Con respecto a IL-1 β , Env-SU y LPS inducen un perfil de secreción similar al del TNF- α , caracterizado por un pico de secreción alrededor de 24 horas de incubación seguido de una disminución constante. SEB, conocido por activar una gran población de linfocitos T, que lleva la misma especificidad TCR V β no induce ninguna IL-1 β . IL-6 está segregada de manera constante por los PBMC estimulados por Env-SU y LPS, pero no por SEB. IL-6 e IL-1 β son dos citoquinas preferentemente liberadas por los monocitos/macrófagos activados. Estos datos muestran que, de manera similar a la de LPS, Env-SU tiene por objetivo las células del sistema inmunitario innato, tales como los monocitos y los macrófagos para la liberación de citoquinas proinflamatorias, y que los linfocitos T no están dirigidos a este nivel de activación.

Para eliminar la posibilidad de una contaminación por endotoxinas de la proteína recombinante Env-SU, los PBMC humanos se trataron bien con un inhibidor de LPS, la polimixina B (PB) antes de la estimulación, o bien se incubaron con unas proteínas y unas toxinas hervidas. En paralelo, se añadió también un control autólogo producido y purificado en las mismas condiciones, con los mismos reactivos y material: caseína quinasa humana CK2.

Después de 24 horas de incubación, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y analizaron para la secreción de TNF- α . Como se muestra en la figura 4, el TNF- α inducido por Env-SU y SEB está sólo parcialmente inhibido por PB, mientras que los efectos de LPS están totalmente abolidos. La proteína autóloga de control no induce ninguna secreción de citoquinas. La liberación del TNF- α está asimismo inhibida de manera significativa cuando las proteínas Env-SU se hierven durante 30 minutos, mientras que la actividad LPS no está afectada. Esto está de acuerdo con los resultados negativos obtenidos durante el análisis de control de calidad realizado al mismo tiempo sobre unas muestras purificadas de Env-SU y del control autólogo utilizando el ensayo LAL, aprobado por la "Food and Drug Administration".

Estos resultados demuestran que los efectos proinflamatorios observados precozmente no se deben a una contaminación por endotoxinas y que el componente responsable de estos efectos es de hecho una proteína.

Para confirmar la especificidad de las propiedades proinflamatorias de Env-SU, se estudiaron los efectos de anticuerpos monoclonales. Se incubaron los PBMC durante 24 horas con el control autólogo, Env-SU o LPS preincubados a 4°C durante 1 hora bien con un anticuerpo monoclonal dirigido contra Env-SU, o bien con un anticuerpo monoclonal dirigido contra Gag. La proteína Gag utilizada para desarrollar este anticuerpo monoclonal no presenta ninguna actividad proinflamatoria y constituye un control adecuado. Como se muestra en la figura 4, el anticuerpo monoclonal anti-Env-SU bloquea específicamente la secreción de TNF- α mediada por Env-SU, pero no la de LPS. La secreción de citoquinas no está afectada por el anticuerpo monoclonal anti-Gag. Estos resultados demuestran la especificidad de Env-SU sobre la inducción de citoquinas y la activación celular.

Env-SU tiene la capacidad de inducir unas citoquinas proinflamatorias en cultivos de PBMC. Después, se ha

verificado que Env-SU era capaz de activar directamente unos monocitos purificados. Los monocitos purificados se estimularon con el control autólogo, Env-SU o LPS durante 24 horas y diferentes marcadores de activación, tales como CD80 y CD86, se evaluaron por citometría de flujo. Comparado con el control autólogo, Env-SU induce una regulación aguas arriba de los dos marcadores y los niveles de expresión obtenidos son similares a los de LPS (figura 5a). Grandes cantidades de TNF- α , de IL-1 β , de IL-6 y de IL-12p40 se producen en respuesta a Env-SU (figura 5b). Estos resultados muestran que Env-SU induce una activación rápida y directa de los monocitos asociada a una producción de citoquinas proinflamatorias.

Las células dendríticas son unas células presentadoras de antígenos que unen las inmunidades innata y adaptativa con la capacidad única de controlar la activación de las células T vírgenes. Se ha estudiado la capacidad de Env-SU para activar directamente unas células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC). Las células dendríticas se generaron *in vitro* a partir de monocitos altamente purificados, y se estimularon durante 24 horas con el control autólogo, Env-SU o LPS. Env-SU es capaz de aumentar drásticamente la activación de los marcadores CD80, CD86, CD40 y HLA-DR (figura 6a). Las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF- α , IL-12p40 e IL12p70 son segregadas a niveles más elevados. Se demuestra que las MDDC estimuladas por Env-SU son capaces de inducir una proliferación alogénica de las células T a un grado más importante que el control autólogo, incluso cuando el número de células estimuladoras es bajo (figura 6c). Por lo tanto, de manera similar al LPS (control positivo), Env-SU es capaz de inducir la maduración de células dendríticas que segregan IL-12, y es por lo tanto capaz de inducir unas respuestas inmunes específicas primarias.

Para determinar si Env-SU utiliza la misma vía de activación que LPS, se han medido los niveles de TNF- α , segregado por unos PBMC humanos después de la estimulación, con o sin preincubación con unos anticuerpos neutralizantes anti-CD14 o anti-TLR4. Los resultados presentados en la figura 7a muestran que el bloqueo de CD14 tiene como resultado una inhibición significativa dependiente de la dosis de Env-SU y de la secreción del TNF- α mediada por LPS (el 83% y el 56% de inhibición respectiva con 20 μ g de anticuerpos anti-CD14). SEB, que es conocido por activar las células T y las células presentadoras de antígenos a través del receptor de las células T y el HLA-DR, no está inhibido. El bloqueo de TLR4 tiene como resultado una inhibición del 37% sobre los efectos de Env-SU y una inhibición del 43% sobre los efectos de LPS, con 20 μ g de anticuerpo anti-TLR4 (figura 7b). No se observa ningún efecto de inhibición para los anticuerpos de control en los dos experimentos. Los receptores CD14 y TLR4 están por lo tanto implicados en las propiedades proinflamatorias mediadas por Env-SU.

En conclusión, la fracción soluble de la proteína de la envoltura de MSRV/HERV-W estimula una respuesta inmunitaria innata a través de los receptores de reconocimiento CD14 y TLR4 y se demuestra en la presente invención que la cascada inmunopatológica que lleva a lesiones inflamatorias puede ser bloqueada en una fase muy precoz por administración de una composición terapéutica o medicamento, que comprende por lo menos un anticuerpo seleccionado de entre los anticuerpos anti-Env-SU y/o anti-TLR4.

Así, en la presente invención, después de ensayar diferentes anticuerpos monoclonales producidos por bioMérieux contra las proteínas de la envoltura de MSRV/HERV-W, el ensayo celular establecido y desarrollado en la presente memoria permitió identificar los que tienen la propiedad de inhibir el efecto proinflamatorio que activa la vía TLR4 y seleccionar de entre los anticuerpos inhibidores, los que tienen un potencial inhibidor más próximo al 100%. Entre estos anticuerpos, los anticuerpos 3B2H4 y 13H5A5 son los anticuerpos preferidos.

Así, fue posible identificar las propiedades de inhibición de las vías precoces de la inflamación que están implicadas en patologías como la SEP y la SCZ a un nivel muy aguas arriba de una cascada patogénica que diverge más aguas abajo en los procesos de estas dos enfermedades, así como se ilustra en las figuras 8 y 9.

Destaca, por lo tanto, la utilidad de estos anticuerpos, que responden a las definiciones dadas anteriormente, para la preparación de una composición farmacéutica o de un medicamento, ya que permite bloquear muy aguas arriba una cascada patogénica en estas patologías, tales como la SEP o la SCZ. Sus intereses están asimismo demostrados por sus efectos inhibidores, que se sitúan antes de la interacción con el receptor TLR-4, ya que la inhibición es equivalente a la obtenida con el anticuerpo anti-TLR4 en el mismo ensayo celular dedicado al estudio de su activación precoz. Este efecto aguas arriba de la activación de los linfocitos T permite así bloquear un agonista patológico que, en esta fase, es común a patologías autoinmunes como la SEP y no autoinmunes como la SCZ (véase la figura 9). Así, los anticuerpos de la invención permiten bloquear aguas arriba unas cascadas patogénicas que difieren aguas abajo de patologías tales como la SEP y la SCZ. La figura 8 muestra el objetivo de los anticuerpos de la invención en la cascada patogénica de la SEP, que anticipa todas los objetivos actualmente pretendidos por los agentes terapéuticos existentes. En efecto, en la fase de intervención de los anticuerpos de la invención, sólo hay un antagonista (Env MSRV/HERV-W) y un receptor (TLR4), mientras que después de la activación del receptor, son centenares de agonistas en forma de moléculas bioactivas (citoquinas, enzimas, radicales libres, etc.) los que entran en juego en el proceso inflamatorio, después, en el caso de la SEP, miles de agonistas moleculares y celulares se utilizan después de la fase de activación de los clones de linfocitos T autoinmunes. En el caso de la esquizofrenia (SCZ), no son los linfocitos T los que son activados en una vía autoinmune, sino que son los mediadores proinflamatorios producidos después de la activación de la vía TLR4 en una célula de la sustancia gris cerebral los que provocan una excitotoxicidad a nivel de las neuronas adyacentes. Estos fenómenos de excitotoxicidad inducida por las moléculas proinflamatorias están bien descritos y provocan una

liberación anormal de neuromediadores que, en la corteza frontal de un individuo, provoca unos fenómenos de alucinaciones. Además, es interesante realizar que estos fenómenos excitotóxicos desembocan frecuentemente en una neurotoxicidad que se traduce por una muerte neuronal. Ahora bien, esta muerte neuronal es conocida en la SCZ y está objetivada por los ensanchamientos ventriculares típicamente visualizados por imaginería IRM en los pacientes a una fase avanzada de la patología. En efecto, la pérdida progresiva de las neuronas del cerebro de estos pacientes está compensada por un aumento del volumen de los ventrículos cerebrales, que se vuelven detectables en IRM después de un cierto tiempo de evolución de la enfermedad. Las figuras 8 y 9 ilustran por lo tanto bien el hecho de que los anticuerpos anti-Env identificados y seleccionados por el ensayo celular desarrollado en el ámbito de la presente invención bloquean realmente el estímulo "primario" más aguas arriba de esta cascada, después de la activación de una o varias copias patógenas de la familia MSR/HERV-W.

Con el fin de confirmar aún más precisamente la asociación entre la expresión de una proteína de la envoltura (Env) de la familia retroviral MSR/HERV-W y las patologías SEP y SCZ, se han realizado unos estudios utilizando el ensayo de activación de la inmunidad innata descrito en la presente invención, para buscar una vía de activación inmunológica en los pacientes SEP o SCZ, con respecto a controles sanos.

Estudios ex vivo

Estudio ex vivo en pacientes que padecen esclerosis múltiple (SEP).

La secreción de IL-6 inducida por Env-SU está aumentada en las células mononucleadas sanguíneas extraídas *ex vivo* en los pacientes SEP y correlaciona sus resultados clínicos (EDSS).

Durante este estudio, se han comparado la reactividad de Env-SU de PBMC de pacientes SEP y de donantes sanos. Se incluyeron treinta y dos pacientes, estando veinte en fase aguda y 12 en fase estable, según un análisis realizado por IRM. Su nivel de minusvalía también se determinó según los criterios de EDSS (Extended Disability Score). En paralelo, se ensayaron 19 donantes sanos. Brevemente, se incubaron 1×10^6 de PBMC con Env-SU o el control Mock durante 24 horas, después se analizaron los sobrenadantes de cultivo para la secreción de citoquinas tales como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-10. Los resultados obtenidos (Env-SU - Mock) se compararon en primer lugar entre los grupos. No se observó ninguna diferencia significativa para IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-10 (figura 10). Por el contrario, se obtuvieron unas diferencias importantes con IL-5 e IL12p40, que están incrementadas en los pacientes (figura 11). Además, se ha observado una correlación positiva entre el nivel de secreción de IL-6 o de IL-12p40 obtenidos y el resultado clínico de los pacientes (figura 12). No se obtuvo ninguna otra correlación con otras citoquinas o datos clínicos (edad, sexo, tratamiento). En la figura 12, se dan en ejemplo la ausencia de correlación de IL-6 inducida con la duración de la enfermedad, así como la ausencia de correlación entre el interferón gamma y el EDSS.

En lo que se refiere al interferón gamma, que está segregado en la presente memoria exclusivamente por los linfocitos T, es muy interesante señalar que, al contrario de las citoquinas asociadas a la inmunidad innata segregadas en la presente memoria por los monocitos/macrófagos, no está correlacionado con el resultado clínico (EDSS). Esto muestra bien que, como se ha puesto en evidencia *in vitro* con los ensayos celulares, el efecto revelado *ex vivo* se correlaciona bien con un efecto que no está mediado en esta fase por los linfocitos T, y por lo tanto, no se parece a un efecto superantígeno.

Estos resultados sugieren que los pacientes SEP que presentan los signos clínicos más avanzados (EDSS elevado) son "hipersensibles" a los factores retrovirales tales como Env-SU, pero puede también sugerir un papel para Env-SU en la patogénesis de la SEP a través de las citoquinas proinflamatorias y la IL-6.

Esto confirma los datos obtenidos con la carga viral MSR/HERV-W en el LCR de los pacientes SEP, en el estudio de Sotgiu *et al.* [10], que mostraba un aumento progresivo de la carga viral MSR/HERV-W con el agravante de la enfermedad. Según los resultados de la invención, la respuesta inducida por la proteína de la envoltura MSR/HERV-W aumenta de manera correlacionada, con la agravación de la enfermedad medida por EDSS. Estos dos estudios independientes realizados *ex vivo* sobre unos pacientes SEP, con unos enfoques diferentes (dosificación de los ácidos nucleicos MSR/HERV-W por RT-PCR por un lado, y dosificación de una respuesta inmunológica a la proteína de la envoltura MSR/HERV-W, por otro) confirman la asociación entre el proceso de la enfermedad en sí y el retrovirus MSR/HERV-W.

Estudio ex vivo en pacientes que padecen esquizofrenia (SCZ)

La secreción de IL-12p40 inducida por Env-SU está incrementada en las células mononucleadas sanguíneas extraídas *ex vivo* en los pacientes SCZ y permite además identificar los niveles más elevados, una subpoblación de pacientes resistentes a los terapéuticos anti-psicóticos y/o que tienen formas particularmente evolutivas de SCZ.

Durante este estudio, se comparó la reactividad a Env-SU de PBMC de pacientes SCZ y de donantes sanos. Se incluyeron veinticinco pacientes. En paralelo, 15 donantes sanos se sometieron a ensayo según un protocolo idéntico al del estudio anterior con los pacientes SEP.

Los sobrenadantes de cultivos se analizaron para la secreción de citoquinas tales como TNF- α , IL-12p40, IL-1 β , IL-6, e IL-10. En esta fase del estudio, se ha observado una diferencia notable entre una parte de los pacientes que padecen SCZ y el conjunto de los controles para diferentes citoquinas ensayadas. Los resultados están presentados en las tablas 1 y 2 siguientes. La tabla 1 representa los diferentes donantes sanos cuyo código está indicado en las líneas de la primera columna con, en cada línea, las cantidades en ng/ml dosificadas para las diferentes citoquinas indicadas arriba de la columna con las dos condiciones indicadas en la línea siguiente para sus columnas respectivas (estimulación Mock y Env-SU). La tabla 2 representa los diferentes pacientes SEP cuyo código está indicado en las líneas de la primera columna con, en cada línea, las cantidades en ng/ml dosificadas para las diferentes citoquinas indicadas arriba de la columna con las dos condiciones indicadas en la línea siguiente para sus columnas respectivas (estimulación Mock y Env-SU). En las tablas 1 y 2, las dos líneas de abajo (mean y St Dev) indican respectivamente para cada columna, la media y la desviación típica de los datos medidos.

Tabla 1

	TNF- α		IL-6		IL-10		IL-12p40		IL-1b	
	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1
ND 151003	24	500	216	3493	12	59	0	245	38	1149
ND 291003	14	1491	166	14230	14	337	0	398	32	1677
ND 011003	114	969	3727	12141	38	478	1	99	214	1712
ND 300402	18	58	172	601	20	21	9	31	69	193
ND 020702	0	139	111	1028	3,5	44	5	16	99	392
ND 180602	48	264	92	1816	16	32	20	57	110	424
ND 070801	0	124	84	1028	6	31	20	42	25	235
ND 180901	1	228	39	2328	7	60	0	113	21	651
ND 060701	30	260	345	3263	17	155	6	38	33	277
ND 110901	0	328	70	7352	14	214	11	169	9	587
ND 280801	7	58	77	882	20	30	4	57	52	168
ND 190603	ND	ND	21	123	0	6	1	12	16	58
ND 180602 (40)	15	541	30	7569	6	171	11	107	8	723
ND 2 (1)	ND	ND	2870	8863	125	187	124	291	ND	ND
ND 140504	ND	ND	185	803	ND	ND	8	8	ND	ND
Media	22,58	413,33	547,00	4368,00	21,32	130,36	14,67	112,20	55,85	634,31
Desv. Estándar	20,94	307,94	733,73	3775,33	17,19	108,55	16,00	87,33	41,33	421,61

15

Tabla 2

Código de pacientes	TNF-a		IL-6		IL-10		IL-12p40		IL-1b	
Schizo	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1
1	46	475	298	3491	82,9	25,6	9,5	302	8	835
2	40	1570	787	21956	73	389	29	559	84,6	5632
3	587	1639	9588	30299	124,6	800	171	436	988	6237
6	33	863	408	8494	88,9	139	35	152	46	1459
9	40	236	338	2819	34,5	22	63	24	111	932
10	10	310	527	7552	92,9	216	2	75	5	458
12	11	950	769	22510	14,9	769	87	158	70	1614
13	1031	2840	27022	38290	94	580	271	481	2396	10309
P2	NT	NT	738	2857	34,01	68,75	3	12	NT	NT
P3	NT	NT	3362	12521	193	269	32	93	NT	NT
P4	NT	NT	3481	14305	189	273	72	84	NT	NT
P5	NT	NT	903	4141	33	133	13	210	NT	NT
P8	NT	NT	579	7925	14	109	7	28	NT	NT
P16	NT	NT	787	1009	5	16	0	9	NT	NT
P17	NT	NT	113	432	0	0	0	0	NT	NT
P18	NT	NT	3166	10755	125	236	2	44	NT	NT
P20	NT	NT	57	90	0	0	10	0	NT	NT
P22	NT	NT	2461	8793	40	134	26	107	NT	NT
P23	NT	NT	880	837	0	0	0	9	NT	NT
P24	NT	NT	896	6833	8	101	4	38	NT	NT
P27	NT	NT	3039	88.16	132	230	57	49	NT	NT
P28	NT	NT	99	135	2	7	3	11	NT	NT
P30	NT	NT	2332	>15000	189	785	28	734	NT	NT
P32	NT	NT	>15000	>15000	233	805	40	584	NT	NT

Código de pacientes	TNF-a		IL-6		IL-10		IL-12p40		IL-1b	
Schizo	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1	Mock	ENV1
P33	NT	NT	>15000	>15000	249	452	11	18	NT	NT
Media	224,75	1110,38	2723,04	9766,36	82,07	262,37	39,02	168,68	463,58	3434,50
Desv. Est.	292,13	679,47	2897,37	7479,22	64,68	220,85	39,03	170,02	614,21	2968,63

Con respecto a la población SEP anteriormente estudiada, ya se ha observado una diferencia espontáneamente en cultivo para ciertos pacientes (ilustrada en las figuras 13 y 14 para la IL-10 y la IL-12p40). Esto demuestra un dato inesperado, a saber que, aunque la SCZ no sea una enfermedad inflamatoria sistémica y aún menos autoinmune, algunos pacientes SCZ presentan un porcentaje de activación inmunológica espontánea en sus PBMC que supera tanto el de los controles sanos como el de los SEP en las mismas condiciones. Esto aporta un dato importante en la noción de activación sistémica de la inmunidad en estos pacientes y por lo tanto, confirma la realidad de este componente inmunológico proinflamatorio en esta enfermedad.

La respuesta a la estimulación por Env-SU está globalmente más aumentada en la serie de pacientes SCZ y algunos pacientes responden con unos niveles de secreciones de citoquinas claramente superiores a la media de los control sanos e incluso a veces superiores al máximo observado en la serie de los controles (tal como se ilustra en las figuras 13 y 14, para la IL-10 y la IL-12p40). Esto confirma también que la respuesta a Env-SU está significativamente aumentada en algunos pacientes que padecen SCZ y que Env-SU es por lo tanto capaz de revelar un sesgo inmunológico que pone en juego los componentes de la inmunidad innata activada por la vía TLR4, en algunos de estos pacientes cuyo estatuto clínico coincide.

Sin embargo, en estos pacientes, el incremento después de la estimulación por Env-SU con relación al nivel espontáneo de citoquinas (nivel estimulado - nivel espontáneo / nivel espontáneo) es globalmente más bajo en los pacientes SCZ que en los controles sanos; esto incluso cuando el nivel de secreción inducido por ENV-1 supera el de todos los controles sanos (como se ilustra en la figura 14b y c, para la IL-12p40). Esto aporta un elemento nuevo frente a lo que se ha descrito en una patología como la SEP, en relación con el papel etiopatogénico de un elemento retroviral de la familia MSR/HERV-W. En efecto, el papel de un elemento retroviral de esta misma familia MSR/HERV-W en la SCZ también se puso en evidencia y se confirmó mediante varios equipos independientes con unos enfoques diferentes [3, 14, 31, 54], pero la SCZ no es una enfermedad con un componente patológico autoinmune como la SEP. Así, los resultados obtenidos con la proteína Env-SU sobre los PBMC de pacientes SCZ muestran que, a pesar de que las consecuencias aguas abajo de la activación inmunológica que se refiere a los linfocitos T (células responsables de la autoinmunidad) sean diferentes de la SEP, una vía de la activación precoz de la inmunidad innata que pasa por el receptor TLR4 (que no está presente en los linfocitos T) puede sin embargo constituir una vía patogénica inicial común entre estas dos enfermedades y la familia retroviral MSR/HERV-W.

Como se ha evocado anteriormente, el papel de una proteína de la envoltura MSR/HERV-W en estos pacientes se vuelve ahora objetivado por la reactividad inmunológica particular de sus células mononucleadas sanguíneas (PBMC) a la proteína Env-SU.

Las diferencias más interesantes y más pertinentes frente a los datos clínicos de los pacientes que padecen SCZ, en esta fase del estudio, se observaron para IL12p40 (figura 14).

En efecto, se ha verificado que los pacientes que presentan un nivel inducido de IL-12p40 inducido por Env-SU entre los más elevados (en este caso superior a 400 pg/ml, por lo tanto un nivel máximo de los controles sanos ensayados en esta serie) comprenden todos los pacientes resistentes a los terapéuticos anti-psicóticos de la serie ensayada y de las formas de esquizofrenia particularmente evolutivas.

Esto muestra que, con un perfil diferente del obtenido anteriormente con los pacientes SEP, existe por lo menos una subpoblación de pacientes que padecen formas evolutivas y/o resistentes a los tratamientos existentes, que es identificable y está caracterizada por una secreción superior a la media de la IL12p40 inducida por Env-SU.

El hecho de que por lo menos la IL12p40 inducida por la activación Env-SU en los PBMC de pacientes SCZ sea máxima en las formas evolutivas y/o resistentes a los tratamientos actuales, pone en evidencia, además de la asociación entre unos criterios de evolución y de gravedad de la enfermedad, una diana terapéutica nueva para estos pacientes, a saber la proteína Env MSR/HERV-W asociada a este sesgo inmunológico en los pacientes.

Como se ha demostrado por otra parte para los modelos de SEP, unos anticuerpos capaces de inhibir la activación del sistema inmunitario antes del inicio de la vía "aguas arriba" mediada por el receptor TLR4, tienen un interés terapéutico y su diana está muy interesante en el contexto clinicobiológico nuevamente identificado.

Al contrario que en la SEP, en la que estos efectos tienen como consecuencia ulterior una reactividad autoinmune que tiene como objetivo los componentes antigénicos de la mielina, los mediadores producidos en esta fase precoz de activación de la inmunidad innata (vía TLR4) con un porcentaje espontáneo *ex vivo* más elevado que en la SEP,

tiene un potencial excitotóxico sobre las neuronas corticales [17, 21, 23-25, 29, 50, 51, 55].

Así, la activación de un provirus MSR/HERV-W por diferentes cofactores, puede activar la expresión de la proteína Env MSR/HERV-W en unas células del cerebro [56] y, según la naturaleza del cofactor y las circunstancias, tener como objetivo unos territorios diferentes del cerebro. En estas condiciones, una activación en las regiones de la corteza frontal puede provocar una excitotoxicidad neuronal que se traduce por unas alucinaciones diversas según los territorios alcanzados.

En el caso de una activación en la sustancia blanca (mielinizada) la inflamación precoz producida por la proteína Env a nivel de los macrófagos y/o de los microglíocitos es susceptible de estimular una degradación de la mielina y por lo tanto, después de la contribución de los linfocitos T, inducir una autoinmunidad contra los autoantígenos de la mielina.

Estas diferentes nociones puestas en evidencia están ilustradas en la figura 9. Esto muestra que, en el contexto clinicobiológico así identificado en pacientes que padecen esquizofrenia, es útil inhibir este componente inflamatorio neurotóxico en relación evidente con los síntomas de la enfermedad.

Además, como se ilustra también en la figura 8, el nivel al que estos anticuerpos inhiben los efectos biológicos de la proteína Env está bien aguas arriba de todos los mediadores patológicos producidos aguas abajo y que son los objetivos habituales de las terapéuticas antiinflamatorias clásicas (citoquinas, radicales libres, compuestos redox, enzimas, prostaglandinas, proteínas y lípidos proinflamatorios, linfocitos T activados, etc.). En esta fase, el único agonista es la proteína Env MSR/HERV-W en sí misma, y su impedimento para activar el receptor TLR4 bloquea la vía de entrada inicial de las diferentes cascadas inmunobiológicas que resultan aguas abajo, como se ilustra en las figuras 8 y 9.

Está al alcance del experto en la materia iniciar los trabajos de desarrollo preclínico, como:

- la humanización de los anticuerpos monoclonales, según los procedimientos utilizados para unos anticuerpos terapéuticos conocidos como el REMICAD anti-TNF-alfa. La optimización del paso intercerebral de anticuerpos terapéuticos se realiza según unas técnicas ahora bien conocidas, de las cuales la mayoría están descritas en numerosas publicaciones científicas y médicas como, por ejemplo, la descrita por Merclo *et al.* o por Pranzatelli [57, 58].
- la verificación de la actividad inhibidora de estos anticuerpos humanizados o modificados con el ensayo de activación proinflamatorio por la proteína Env-SU sobre los PBMC, tal como se describe en la presente invención.
- la verificación del efecto terapéutico de los anticuerpos sobre unos modelos animales que pone en evidencia los efectos de comportamiento de la expresión anormal de la proteína Env MSR/HERV-W en el cerebro [59].

Así, los elementos descritos en la presente memoria, a saber:

- la puesta en evidencia del receptor "TLR4" de la proteína de la envoltura MSR/HERV-W como vía de entrada de la activación proinflamatoria "aguas arriba" a nivel de las células de la inmunidad innata
- el ensayo celular que permite detectar y medir estos efectos
- los anticuerpos monoclonales anti-Env capaces de inhibir los efectos de esta proteína
- las evidencias biológicas de estos efectos a nivel de las células inmunitarias sanguíneas extraídas *ex vivo* en pacientes que padecen esquizofrenia
- las evidencias biológicas que relacionan estos efectos con la patología permiten al experto en la materia realizar, con sus conocimientos, las técnicas y los modelos animales conocidos hoy en día, las etapas de desarrollo preclínico y abordar los estudios clínicos en el ser humano en las condiciones apropiadas. Además, los ensayos biológicos descritos en la presente invención permiten una investigación biológica *ex vivo* de los parámetros dirigidos de estos anticuerpos terapéuticos, antes, durante y después del tratamiento de los pacientes, mediante una simple extracción de sangre.

Dicho guiado terapéutico aporta una ventaja muy importante a la definición de los pacientes que se pueden seleccionar para un tratamiento en un momento dado o en un subgrupo dado, y permite ajustar la terapéutica en dosis y frecuencia en función de los resultados biológicos.

Modelos animales

Realización de un modelo de estudio de la distribución farmacocinética y de la toxicología de los anticuerpos

terapéuticos y de control en un modelo animal

Anticuerpos:

5 1. Naturaleza de los anticuerpos:

10 Para evitar una degradación hepática demasiado rápida y demasiado importante, se utilizan los anticuerpos de interés en forma de fragmentos de tipo Fab' o Fab2, obtenidos a partir de los anticuerpos monoclonales según las técnicas conocidas por el experto en la materia [60]. Los anticuerpos anti-ENV MSR/HERV-W, inhibidores del efecto proinflamatorio mediado por TLR4, son los anticuerpos 13H5A5 y 3B2H4. El anticuerpo control anti-Gag MSR/HERV-W es el anticuerpo 3H1H6.

2. Protocolo de marcado de los anticuerpos:

15 Se diluyen en primer lugar los fragmentos. Se preparan así 100 µl a la concentración de 1 µg/µl y después se ponen en contacto con el yoduro de sodio (NaI¹²⁵ NEN, a 5mCi/50 µl) absorbido sobre unas bolas (Iodobeads n°28665 Pierce Rockford, Illinois USA), como se recomienda por el fabricante.

20 Después de 10 minutos de incubación, la solución se extrae y se transfiere en un tubo desprovisto de bolas. Esta operación permite detener la reacción y así evitar la oxidación del sitio activo del anticuerpo, lo que llevaría a una pérdida de función.

25 La muestra se neutraliza después mediante 10 µl de una solución de piro-sulfito de sodio 4 mg/ml (Fluka). Finalmente, el yoduro de sodio se arrastra con la ayuda de 10 µl de un agente de arrastre frío dosificado a 250 nM/ml.

3. Purificación

30 La purificación se efectúa mediante la técnica de separación sobre columna intercambiadora de iones. Este método utiliza una columna intercambiadora de aniones, destinada a fijar el yodo libre. Está activada en una primera etapa, con la ayuda de 2 ml de una solución de NaCl 0,9% (Aguettant), el tampón de migración. La purificación se efectúa en cuatro pasos, ejercidos por 0,5 ml de NaCl 0,9%. Se procede después al recuento de la radioactividad contenida en los cuatro tubos.

35 4. Rendimiento

Los resultados se detallan en la tabla 3, que representa el porcentaje de recuperación de cada anticuerpo después de la purificación.

40 El rendimiento de marcado es correcto después de 10 minutos de incubación. No aumenta con el tiempo. El porcentaje obtenido para el conjunto de los fragmentos está comprendido entre el 70 y el 80%.

45 La purificación por intercambios de iones permite una buena recuperación de los anticuerpos marcados. Para el fragmento 3B2H4 Fab2 la relación es sólo del 50%.

Evaluación de la biodistribución:

1. Ratones

50 Los animales afectados por el experimento son unos ratones BALB/c de 7 semanas, proporcionados por los laboratorios Charles River (Wilmington, North Carolina, USA,). Su buen estado de salud está garantizado por el proveedor.

55 Se conservan durante el experimento en un local templado e iluminado por ciclos con precaución.

2. Protocolo

Los lotes están constituidos de 3 ratones blancos BALB/c de 7 semanas de edad para cada fragmento ensayado.

60 En una primera etapa, se anestesian con la ayuda de pentobarbital o de una mezcla volumen a volumen de ketamina 2%-xilamina 10g/100 ml administrado a la dosis de 1 µl/g de peso.

65 Después, se inyectan por vía intravenosa (IV) con 0,15 mg de anticuerpos marcados por 700 µCi/mg (los ratones son inoculados con los fragmentos de uno de los tres anticuerpos ensayados (3B2H4, 13H5A5 y 3H1H6).

Se efectúa una lectura a 10, 45, 90 y 210 minutos después de la inyección.

Al cabo de estos 210 minutos, el ratón se sacrifica y se extraen: el bazo, el hígado, los riñones, el cerebro, el corazón, los pulmones y la sangre. La cola se guarda también para ajustar los valores obtenidos.

5 3. Resultados

No se ha observado ninguna patología tisular evocadora de una toxicidad aguda relacionada con estos anticuerpos.

10 Los resultados de biodistribución de los anticuerpos se detallan en la tabla 4, que representa la distribución de la dosis de anticuerpos marcados en los diferentes órganos 210 minutos después de la inyección IV.

La tabla 4 pone en evidencia que ninguno de los fragmentos ensayados se fija de manera anormal en un tejido.

15 Estos resultados demuestran que los anticuerpos no tienen ninguna toxicidad aguda, son dosificables en los fluidos y los tejidos biológicos, y que su distribución corresponde a la esperada por el experto en la materia.

20 Así, cualquier optimización de la biodistribución de estos anticuerpos, y/o cualquier verificación de estas constantes después de su modificación, se puede evaluar para su pertinencia farmacocinética y toxicológica según un mismo protocolo o su equivalente.

Tabla 3

Porcentaje de recuperación de los fragmentos de anticuerpos durante el marcado por yodo 125

Porcentajes de recuperación	Anticuerpo				
	3H1H6		3B2H4		13H5A1
	Fab'	Fab2	Fab'	Fab2	Fab'
Después de la fijación	72,69%	82,00%	74,36%	75,95%	74,22%
Después de la purificación	62,70%	73%	75,10%	41,70%	76,20%

25

Tabla 4

Porcentaje medio de la dosis de anticuerpo encontrado en los diferentes órganos 210 minutos después de la inyección en el ratón BALB/c

30

	3H1H6 Fab'	3B2H4 Fab'	3B2H4 Fab2	13H5H1 Fab'
Bazo	1,28	1,68	2,26	1,30
Cerebro	0,18	0,28	0,60	0,17
Riñones	7,07	16,34	12,88	20,64
Hígado	1,31	1,24	1,80	0,97
Sangre	2,98	3,28	5,54	2,87
Corazón	0,00	1,30	1,87	0,95
Pulmones	0,00	2,14	2,68	0,60

Paralelamente al estudio directo sobre los pacientes, se realizaron unos modelos animales que permiten confirmar que:

35

- la patología "pro-inflamatoria" que corresponde a las vías de activación "inmunidad innata sola" (modelo SCID-hu y proteína Env-SU) o "inmunidad innata y efecto superantigénico sobre los linfocitos T (modelo SCID-hu y virión) producidas por una proteína Env MSR/HERV-W es bien observada *in vivo* y analizable por unos criterios objetivos. Siendo la vía "inmunidad innata/vía de activación TLR4 +/- CD14" el objeto de esta invención, y presentando una ventaja de bloqueo aguas arriba de la cascada proinflamatoria.

40

- la patología autoinmune dirigida contra unos autoantígenos de la mielina como en la SEP se obtiene bien con la proteína Env MSR/HERV-W (modelo EAE MOG Env-SU) y analizable.

45

- la utilización de anticuerpos monoclonales anti-Env, seleccionados por sus propiedades inhibitoras, y de sus fragmentos portadores de la especificidad de reconocimiento inmunológico, es compatible con una composición terapéutica que presenta una distribución orgánica que se puede medir y una ausencia de toxicidad orgánica en el animal (modelo BALB/c anticuerpos radiomarcados).

50

- la utilización terapéutica de anticuerpos anti-Env obtenidos por una selección previa de los monoclonos anti-Env en el ensayo de activación "celular" de la vía TLR4/inmunidad innata. Esta utilización está ilustrada en un modelo tal como "EAE" (Encefalomiелitis alérgica experimental) en presencia de autoantígeno "MOG" (Myelin

Oligodendrocyte Glycoprotein) inducida por Env y permite inhibir, más allá de la inhibición de la fase de activación proinflamatoria bien descrita en la presente memoria, las consecuencias patológicas mucho más aguas abajo (véase: inhibición por los anticuerpos anti-Env en el modelo EAE-MOG).

5 Además, después de una selección de anticuerpos anti-Env inhibidores del efecto proinflamatorio por el ensayo celular *in vitro* descrito en la presente invención, los modelos animales permiten seleccionar de entre esta primera selección los anticuerpos terapéuticos que no tienen ningún efecto secundario nefasto para su utilización terapéutica en el contexto patológico. En efecto, como se ha demostrado para un anticuerpo potenciador del alcance neurológico en el ejemplo "EAE-MOG" (es decir: por ejemplo EAE-MOG y anticuerpos 3H1H6), algunos anticuerpos pueden revelarse inadecuados para la terapéutica, sea cual sea su especificidad e, incluso si inhiben un objetivo patológico, estos efectos secundarios deben eliminarse o modificarse antes de una utilización terapéutica en un contexto particular. Las herramientas utilizadas en la presente invención permiten por lo tanto identificar estos efectos nefastos eventuales en el contexto patológico de utilización y contribuyen, por lo tanto, de manera original y adaptada, a la selección y a la validación de los anticuerpos terapéuticos adecuados.

15

Modelos inflamatorios sobre células y animales:

Material y métodos

20 Proteínas y toxinas

El lipopolisacárido (LPS) de la cepa *E. coli* 026: B6 se ha obtenido de Sigma (St Louis, Mi). La proteína recombinante Env-SU representa una fracción de la proteína de la envoltura entera de MSRv, ENV pV14, de aproximadamente 33 kDa y 287 aminoácidos. Env-SU se produjo en *E. coli*, purificada por cromatografía y analizada por transferencia western (Protein Expert, Grenoble). Se efectuó un ensayo (lymulus amebocyte lysate, Clean cell, Bouffere, Francia) con el fin de detectar la eventual presencia de endotoxinas. Los resultados fueron negativos, por debajo del límite de detección de 5 UI/ml. El tampón utilizado para la conservación de la proteína se utilizará en los experimentos como control negativo. Está constituido de Tris pH 8 50 mM, NaCl 0,3 M, de β -mercaptoetanol 1 mM, sacarosa 2%, glicerol 2% y urea 5,3 mM.

30

Cultivo celular

Preparación de PBMC

35 Los PBMC se prepararon a partir de sangre fresca total citratada de donantes sanos (bolsas de sangre total citratada, Centre de Transfusion Sanguine de Valence, Francia) por gradiente de densidad sobre Ficoll (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania). La dilución de 25 ml de sangre con 10 ml de PBS-2% SVF (suero de ternera fetal), delicadamente depositado sobre 15 ml de Ficoll, se centrifuga a 2400 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Los anillos celulares se recuperan y los PBMC se lavan tres veces con 50 ml de PBS 2% SVF (figura 11). Después del recuento en azul de tripano, las células se congelan a -80°C en una mezcla al 90% SVFd-10% DMSO y se utilizan directamente en cultivo para unos ensayos celulares o para inyección en el ratón.

40

Preparación de las suspensiones de esplenocitos murinos

45 Después de sacrificar unos ratones por dislocación cervical, se extraen los bazo y se trituran sobre un filtro de metal en RPMI. Las suspensiones celulares se centrifugan a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C. El residuo celular se recoge después en aproximadamente 4 ml de suero fisiológico o de SVFd (para, respectivamente, inyección a los ratones C57Bl6, o congelación). Un recuento con azul de tripano se efectúa y después se ajusta la concentración de las células. Las células se congelan después o se utilizan para los modelos animales. Para la inyección a los ratones, se añade gentamicina a una concentración de 0,2 mg/ml. Finalmente, se inyectan 500 μ l, es decir 50 \cdot 10⁶ células por vía IP (intraperitoneal) a cada uno de los ratones C57Bl6.

50

Congelación y descongelación de células

55 Las suspensiones celulares se lavan una vez en 50 ml de PBS (bioMérieux, Francia) a 4°C y centrifugadas a 1400 rpm durante 7 minutos a 4°C. Las células se recogen después en algunos ml de SVF y se cuentan. La concentración celular se ajusta después a 20 \cdot 10⁶ células en general. Se depositan 500 μ l de esta solución en criotubo y después se añaden 500 μ l de solución de congelación (80% SVFd-20%DMSO (Sigma)). Así, las células se conservan en 1 ml de solución al 90% SVFd-10%DMSO. Los criotubos se colocan en una caja de congelación que contiene isopropanol para una bajada lenta de la temperatura y se colocan a -80°C.

60

Las suspensiones celulares se descongelan al baño maría a 37°C. Los tubos se lavan con alcohol antes de la apertura. Las células se transfieren rápidamente en 50 ml de RPMIc-10%SVFd, se centrifugan a 1400 rpm durante 7 minutos a 4°C y después se efectúan otros dos lavados con RPMIc-10%SVF.

65

Mantenimiento de los cultivos

Los cultivos de células (PBMC) se incuban en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. El medio de cultivo utilizado está constituido de RPMI 1640 (Gibco, Rockville, MD) suplementado con 1% de L-glutamina, 1% de penicilina-estreptomina, 1% de piruvato de sodio, 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma) así como 10% de suero de ternera fetal (Biowest, Nuaille, Francia) descomplementado (SVFd) por calentamiento a 56°C durante 30 min.

Estimulaciones celulares

Las suspensiones celulares (PBMC o esplenocitos) se descongelan y se efectúa un recuento con azul de tripano: la concentración celular se ajusta a $1 \cdot 10^6$ células/ml. Los cultivos se efectúan en unas placas de 48 pocillos (500 µl de suspensión celular por pocillo) o en unas placas de 24 pocillos (1 ml de suspensión celular por pocillo). Después del depósito de las células en placa, se añaden las diferentes sustancias a ensayar y las células se incuban en unos periodos de tiempo variados. La recogida de los sobrenadantes se efectúa por centrifugación de las suspensiones celulares a 6000 rpm durante 10 minutos a TA. Después, se congelan en tubo ependorf a -20°C. Salvo que se indique lo contrario, las concentraciones de Env-SU y de LPS utilizadas para los ensayos celulares han sido de 1 µg/ml. Para algunos experimentos, Env-SU y LPS se hirvieron durante 30 minutos. La polimixina B (PB) se utilizó a 25 g/ml, y se preincubó durante 45 minutos a 37°C con las células antes de la adición del tampón, LPS o ENV-SU. Para los experimentos que necesitan la utilización de anticuerpos, fueron necesarias durante diferentes periodos de tiempo unas preincubaciones a 4°C o 37°C de las células con los anticuerpos o de Env-SU, del LPS o del tampón con los anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales IgG anti-Env-SU (13H5A5 y 3B3H4) y anti-Gag (3H1H6) (bioMérieux) se obtuvieron por cultivo de hibridomas después de la inmunización de los ratones con, respectivamente, las proteínas Env-SU o Gag recombinantes. La especificidad de los anticuerpos anti-Env-SU se verificó mediante ELISA. Salvo que se indique de otra forma, las concentraciones de 13H5A5, 3B2H4 y 3H1H6 utilizadas para los ensayos celulares fueron de 30 µg/ml.

Modelos animalesMantenimiento de los ratones

Los ratones C57B16, BalbC o SCID (Charles River, L'Arbresle, Francia) se compran con 5 o 6 semanas de edad y se conservan una semana en reposo después de la recepción. Se protegen en unas cajas estériles filtrantes a una temperatura de 24°C. Todas las manipulaciones se efectúan bajo campana de flujo laminar.

Humanización de los ratones SCID y preparación de los ratones C57B16

Después de una semana de adaptación, los ratones SCID reciben una inyección intra-peritoneal (IP) de $50 \cdot 10^6$ PBMC frescos humanos en 2 ml de RPMI sin rojo de fenol (Eurobio, Les Ulis, Francia) adicionados de gentamicina a una concentración de 0,25 mg/ml, y se dejan de nuevo una semana en reposo. Con el fin de garantizar una buena humanización, se inyectan 50 µl de anticuerpo anti-NK (25 µl de anticuerpo puro diluido en 25 microl de agua fisiológica) por vía RO dos días antes de la inyección de los PBMC. Una semana después de la humanización, se extrae sangre por vía RO a cada ratón y el suero se conserva a -80°C con el fin de poder ensayar el nivel de humanización de los ratones.

Los ratones C57B16 reciben, después de una semana de adaptación, una inyección intraperitoneal (IP) de $50 \cdot 10^6$ esplenocitos frescos murinos en 2 ml de RPMI sin rojo de fenol adicionado de gentamicina a una concentración de 0,25 mg/ml, y se dejan de nuevo una semana en reposo. Durante las inyecciones IP, tanto en los SCID como en los C57B16, el líquido se reabsorbe rápidamente, pero se observan algunas pérdidas.

Dosificación de las IgG humanas en los ratones SCID-humanizados

La dosificación de las IgG humanas en el suero de los ratones SCID se efectúa mediante el método de inmunodifusión radial siguiendo las instrucciones del fabricante (The binding site, Birmingham, UK). La medición del diámetro del precipitado 96 h después del depósito del suero sobre el gel permite, gracias a una curva de calibración, relacionar su grosor con la concentración en IgG de la muestra ensayada.

Inyecciones de las diferentes sustancias y extracciones en los ratones

El D0, las proteínas (Env-SU), toxinas (LPS) o tampón, son atribuidos a los ratones por inyección IP después de la dilución de las sustancias en 1 ml de agua fisiológica (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania) a la concentración deseada. Para las inyecciones de anticuerpos anti-Env-SU o anti-GAG, estos son previamente incubados durante 3 horas a 4°C con Env-SU, el LPS o el tampón. Los ratones control reciben 1 ml de agua fisiológica. Las extracciones se realizan algunas horas (1 h, 2 h) o días (24, 48, 72 h) más tarde. Después de la anestesia de los ratones con éter, se extrae el máximo de sangre (1 ml aproximadamente) por vía retro-orbital (RO) con una pipeta pasteur. Se inyectan después 2 ml de agua fisiológica en la cavidad intra-peritoneal (IP) y después de masajear el abdomen, se

retira el máximo de líquido (1 a 1,5 ml). Finalmente, los ratones son sacrificados por dislocación cervical y se extrae el bazo. Los diferentes protocolos utilizados están presentados en las figuras 12, 13 y 14. Todos los ratones son observados clínicamente hasta el final del experimento. Se anotan particularmente los signos de inflamaciones y los signos de ataque del sistema nervioso.

5

Tratamientos de las extracciones en los ratones

El bazo extraído se divide en dos fragmentos. Una parte de este se pone en suspensión mediante trituración sobre una rejilla en RPMI. Después de la centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C, las células se recogen en 50 ml de PBS a 4°C y después se centrifugan y se congelan en criotubo en 1 ml de solución de congelación (DMSO 10%- SVF 90%). Otra parte de la rata se congela tal cual en un ependorf a -80°C. El líquido retirado en IP se centrifuga a 6000 rpm durante 10 minutos a TA con el fin de retirar el residuo celular y se congela a -80°C en tubo ependorf. Después del lavado en PBS, las células retiradas de la cavidad peritoneal se congelan a su vez. Se centrifuga la sangre a 6000 rpm durante 10 minutos a TA con el fin de recuperar el suero. Este, así como el residuo celular, se congelan separadamente en tubo ependorf a -80°C.

15

Tratamiento de los resultados

Marcado celular y citometría de flujo

20

Las suspensiones celulares se descongelan y las células se recogen en 50 ml de PBS-2%SVFd-1 mM EDTA y se centrifugan a 1400 rpm durante 7 minutos a 4°C. Se efectúa un recuento con azul de tripano y las células se depositan en placa de 96 pocillos (aproximadamente $1 \cdot 10^6$ por pocillo). Después de la centrifugación de la placa a 4000 rpm durante 1 minuto a 4°C, los sobrenadantes son eliminados y se añaden 50 μ l de mezcla de anticuerpos marcadores de superficie (dilución en PBS-2% SVFd-1 mM EDTA) en cada pocillo. Las células son resuspendidas e incubadas durante 30 minutos a 4°C. Después, se lavan mediante adición de 100 μ l de PBS-2% SVF - 1 mM EDTA por pocillo y se centrifugan a 4000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Los sobrenadantes son eliminados y se añaden 200 μ l de PBS - 2% SVF - 1 mM EDTA por pocillo. Las células son resuspendidas y transferidas en unos tubos para el análisis por FACS (figura 15). Para los anticuerpos que necesitan un segundo marcado estreptavidina-APC, se efectúa el mismo ciclo nuevamente. Los anticuerpos (Pharmingen, San Diego, CA) y diluciones utilizadas para el marcado de las células murinas son: CD3 - FITC (1/500), CD4 - PE (1/1000), CD8 - cy-chrome (1/600), CD25 - APC (1/1000), CD69 - APC (1/500, biotinilado al principio). Para el marcado de las células humanas, se utilizan 2 μ l de cada anticuerpo: CD3-cy-chrome, CD4-APC, CD8-PE, CD25-PE, CD69-FITC.

25

30

Dosificaciones de citoquinas

35

Los sobrenadantes de cultivo, sueros y líquidos procedentes de los lavados intraperitoneales se conservaron a -20°C antes de la dosificación de las citoquinas por ELISA. Las dosificaciones de citoquinas humanas o murinas (TNF- α e IL-6) mediante el método ELISA se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmingen).

40

Selección de los anticuerpos anti-envoltura inhibidores del efecto proinflamatorio inducido por la proteína de la envoltura MSR/V a nivel de las células de la inmunidad innata (mediante la vía de activación TLR4)

Diferentes anticuerpos anti-envoltura MSR/V/HERV-W producidos en el laboratorio de los anticuerpos monoclonales de la compañía bioMérieux se ensayaron en unos cultivos de células mononucleadas sanguíneas (PBMC) de donantes sanos con una dosificación de citoquinas (IL-6 y/o TNF-alfa), en ausencia o en presencia de proteína Env-SU, con el fin de determinar sus efectos sobre la activación de los monocitos/macrófagos presentes en el cultivo, mediante una vía de la que se verificó, por otra parte, que era la del receptor "TLR4". Esto según los protocolos descritos en la presente invención y en particular con los anticuerpos producidos por los hibridomas 3H10F10, 13H5A5, 6A2B2, 2A12A5, 3C1D5 y 3B2H4.

45

50

Algunos anticuerpos anti-Env no tenían actividad inhibitora detectable en estos ensayos (6A2B2 y 2A12A5), o una actividad inhibitora moderada (3C1D5) o también una actividad desigual según los experimentos realizados con unos PBMC de donantes diferentes (3H10F10). Unos ejemplos de estos ensayos se muestran en la figura 15 (15a, b, c y d), que ilustra los efectos de estos anticuerpos frente a la activación proinflamatoria producida por la proteína Env-SU en diferentes experimentos.

55

Además, un anticuerpo como el producido por el hibridoma 2A12A5, en ausencia de actividad inhibitora sobre la proteína Env-SU, ha producido paradójicamente una estimulación inmunológica no específica en el ensayo, incluso en ausencia de proteína Env-SU.

60

Unos anticuerpos control ensayados en estos mismos ensayos no han mostrado ninguna actividad inhibitora, ni estimuladora particular, en particular el anticuerpo anti-GAG 3H1H6.

Los anticuerpos monoclonales anti-Env MSR/V/HERV-W producidos por los hibridomas 13H5A5 y 3B2H4 se mostraron constantemente inhibidores del efecto de la proteína Env-SU sobre los PBMC de diferentes donantes

65

humanos sanos, sin ningún efecto paradójico proinflamatorio ni variación significativa entre unos ensayos realizados con los PBMC de diferentes donantes sanos, detectable en las condiciones realizadas.

5 Un ejemplo de la actividad inhibidora de los anticuerpos 3B2H4 y 13H5A5 y de la ausencia de efecto del anticuerpo anti-GAG MSR/V 3H1H6 se presenta en la figura 15a. Las condiciones de especificidad de la inhibición son validadas con respecto a otro ligando, que estimula esta vía de activación (LPS) sobre el cual estos anticuerpos no tienen efecto. La figura 15b muestra que las condiciones de especificidad de activación por la proteína Env-SU son validadas por la ausencia de efecto de una proteína control (mock) producida y purificada en condiciones idénticas, así como por los ensayos que confirman la ausencia de contaminación de la muestra Env-SU utilizado por LPS bacteriano (inhibición mediante calentamiento a 100°C que desnaturaliza las proteínas y no el LPS, y ausencia de inhibición por la polimixina B que inhibe el efecto del LPS).

15 Así, después de haber ensayado diferentes anticuerpos monoclonales obtenidos por bioMérieux contra las proteínas de la envoltura MSR/V/HERV-W, el ensayo celular establecido y desarrollado en la presente invención permitió identificar los que son capaces de inhibir el efecto proinflamatorio que activa la vía TLR4 y seleccionar de entre los anticuerpos inhibidores, los que tienen un potencial inhibidor más próximo al 100%. Entre estos anticuerpos, se prefieren los anticuerpos 3B2H4 y 13H5A5. Se confirma, por lo tanto, la utilidad de estos anticuerpos o de otros anticuerpos que se pueden producir mediante unas técnicas clásicas al alcance del experto en la materia, tales como las descritas anteriormente.

20 Efecto de la proteína Env MSR/V sobre el sistema inmunitario humano, en un modelo animal injertado con un sistema linfocítico humano funcional.

25 - Preparación de los ratones:

El experimento siguiente se refiere a 17 ratones hembras C57Bl6 de 6 semanas de edad. La primera etapa consiste en inyectar en IP, 50 millones de PBL humanos. Los ratones son previamente irradiados y reciben una inyección de anticuerpos anti NK (Firouzi *et al.*, Journal of Neurovirology 2003). Los ratones se dejan en reposo durante una semana, tiempo necesario para la estabilización del sistema inmunitario.

30 Preparación de los PBL humanos.

Las suspensiones celulares se agrupan en un tubo de 50 ml, se centrifugan durante 10 minutos a 4°C y a 1200 rpm. El residuo celular se recoge después en aproximadamente 4 ml de suero fisiológico. Se efectúa un recuento en azul de tripano y después se ajusta la concentración de las células. Se añade gentamicina a una concentración de 0,2 mg/ml. Finalmente, se inyectan 500 µl, es decir 50·10⁶ células, por vía IP a cada uno de los 17 ratones C57Bl6. Constitución de los lotes de inoculación:

40 Los ratones son repartidos en grupos de 3 o 4. Cada lote así formado está nombrado de la manera siguiente:

- 45 - 3 * "T" para el grupo control negativo que recibirá el tampón ENV1.
- 3 * "LPS" para el grupo que recibirá una inyección de LPS, controles positivos de una reacción inflamatoria.
- 50 - 3 * "Env" para el lote al que se le inyectará una solución de la proteína de la envoltura del virus MSR/V.
- 4 * "2GR412" para el lote que será infectado por el virus MSR/V inactivado por el calor durante 30 minutos a 56°C (para ensayar el efecto de la proteína de la envoltura del virión, en ausencia de replicación viral).
- 55 - 4 * "GRE" para el lote que será infectado por el virus GRE inactivado por el calor y fuertemente diluido en el control negativo (para evaluar un efecto eventual de contaminación de una muestra biológica por este virión, en el ámbito de grupos sanguíneos para la transfusión de productos derivados que contienen un donante virémico).

Los ratones de cada lote son infectados por un volumen de solución adecuada en una sola administración IP (las cantidades de LPS y de Env corresponden a la concentración utilizada para los ensayos sobre PBMC). Las soluciones se titrarán de la siguiente manera:

60 "LPS": 50 µg/ratón; "Env": 50 µg/ratón (inyección de 500 µl); "2GR412" y "GRE": 100 µl del residuo de ultracentrifugación/ratón.

Todas las diluciones necesarias se realizan en un líquido fisiológico estéril.

65 Observaciones y extracciones:

D+1h/D+2h/D+24h/D3: Sacrificios y extracciones.

En cada grupo, se sacrifica un ratón. Inyección en IP de 2 ml de agua fisiológica, dar golpecitos en el vientre y retirar el máximo de líquido (1-1,5 ml máximo). Centrifugar la suspensión (6000 rpm/10 min./TA) con el fin de retirar el eventual residuo celular y congelar a -80°C en tubo ependorf.

5 El máximo de sangre se extrae por vía retro-orbital con una pipeta pasteur sobre un tubo heparina. Centrifugación de la sangre, a 6000 rpm/10 min./TA. Recuperar y congelar el plasma y el residuo celular separadamente en tubo ependorf a -80°C.

10 El bazo extraído se divide en dos fragmentos. Una parte se pone en suspensión (con el fin de realizar su fenotipaje humano y murino por FACS): trituración sobre rejilla en aproximadamente 10 ml de RPMO, centrifugación a 1200 rpm/4°C/10 minutos, lavado con aproximadamente 15 ml de PBS/4°C y después centrifugación y congelación en criotubo en 1 ml de solución de congelación (DMSO 10%-SVF 90%) y otra parte se congela tal cual en ependorf a -80°C (para una eventual PCR).

15 Esta operación se realiza al cabo de 24 h y 48 h, salvo signos clínicos aparecidos previamente (vigilar los ratones y recuperarlos justo antes de la muerte). Para los dos ratones restantes de los lotes "2GR412" y "GRE", los ratones son sacrificados al cabo de 15-20 días o recuperados cuando se mueren, si aparece la muerte antes.

20 Esta distribución de las extracciones permite cubrir las reacciones inmunitarias inmediatas (2h), precoces (24h) y retrasadas (10-15 días).

25 En las extracciones de líquidos biológicos se realizan unas dosificaciones de citoquinas humanas y murinas (IL-6 y TNF α) así como la dosificación de la proteína "Env" y/o la titración del virus por ELISA o por bioensayo sobre unos cultivos celulares.

Estos análisis permiten evaluar la reacción inmunitaria: inflamación (citoquinas) y distribución celular (FACS) y de buscar una replicación viral (ELISA; bioensayo).

30 Observaciones clínicas

Todos los ratones son observados clínicamente hasta el final del experimento. Se anotan en particular los signos de inflamaciones y los signos de ataques neurológicos.

35 Resultados:

Esta parte tiene como objetivo estudiar *in vivo* sobre un modelo SCID-humanizado las propiedades de Env-SU gracias a los parámetros determinados por un estudio de factibilidad previamente realizada.

40 Efectos proinflamatorios de Env-SU sobre unos cultivos de PBMC

45 En una primera etapa, se estudió la cinética de producción de TNF-alfa inducida por Env-SU y el LPS en un cultivo de PBMC humanos. Las proteínas y toxinas se utilizaron a una concentración de 1 μ g/ml (figura 16). Se puede observar que la producción de citoquina alcanza un pico a 2h post-inyección y después disminuye progresivamente para volverse nulo después de 48h. La detección de TNF-alfa post-inyección por Env-SU es muy significativa. En efecto, las células incubadas con un tampón dan lugar sólo a una producción muy baja de TNF-alfa, alcanzando apenas 30 pg/ml a 2h. La estimulación por Env-SU da lugar a una producción de 550, 350 y después 160 pg/ml a respectivamente 2h, 24h y 48h post-estimulación. La acción del LPS es ligeramente superior, dando lugar a una producción de 650, 180 y después 50 pg/ml a 2h, 24h y 48h. Este estudio permitió confirmar las propiedades pro-inflamatorias de la proteína Env-SU sobre los PBMC, como ya se ha mostrado. Permite además ver que la producción de TNF-alfa es máxima a 2h post-inyección. Estos datos permiten definir la cinética de extracciones a adoptar para el estudio sobre modelo SCID, a saber 2h, 24h y 48h.

55 Efectos proinflamatorios de Env-SU en el ratón SCID-humanizado (SCID-h)

60 Después de constatar los efectos proinflamatorios provocados por la proteína Env-SU sobre diferentes cultivos celulares, humanos y murinos, se evaluó *in vivo* la patogenicidad de estas mismas sustancias sobre los ratones SCID-hu. Se injertó un grupo de 16 ratones en IP con $50 \cdot 10^6$ PBMC humanos después de haber recibido 50 microlitos de anti-NK por vía retro-orbital. Una semana más tarde, se extrajo sangre de cada ratón con el fin de dosificar las IgG humanas en su suero, con el objetivo de validar la humanización de los ratones. Se ha podido determinar por dosificación en inmuno-difusión radial que la concentración en IgG humanas en el suero de todos los ratones SCID-hu eran muy superiores a 4,5 mg/l. La vida media de las IgG en un ratón SCID-hu es de 12 días. En nuestro caso, se puede por lo tanto afirmar que se consiguió la humanización de los ratones.

65 Los ratones se reparten después en cinco lotes, comprendiendo cada lote tres ratones inyectados con, respectivamente, 0,2 ml de tampón, 50 μ g de Env-SU o 50 μ g de LPS, diluidos en 2 ml de agua fisiológica (uno de

los ratones de cada lote fue sacrificado a 2h, 24h y 48h después de las inyecciones. Todos los ratones siguen vivos y no fue visible ningún signo exterior de ataque del sistema nervioso hasta su sacrificio.

5 La dosificación de las citoquinas TNF-alfa e IL-6 humanas y murinas se realizó por ELISA. Los resultados de la figura 17 muestran que la producción de citoquinas, humanas o murinas, sigue la misma tendencia: se detecta bruscamente a 2h post-inyección y después se vuelve nula en los días siguientes. Globalmente, esta cinética es idéntica a la observada *in vitro* sobre unos PBMC. Los ratones inyectados con un tampón no muestran producción significativa de citoquinas. La dosificación del TNF-alfa murino revela sólo un porcentaje de TNF- α superior a 1000 pg/ml en su suero. En lo referente a la dosificación de la IL-6 murina, se alcanza un nivel de aproximadamente 20000 pg/ml en el líquido IP de los ratones inyectados con Env o LPS. Las concentraciones encontradas en el suero de estos ratones alcanzan respectivamente 6200 pg/ml y más de 20000 pg/ml.

15 La dosificación de las citoquinas humanas revela una detección de citoquinas en el líquido IP más elevada que en el suero. En efecto, habiendo sido injertados los ratones sólo una decena de días antes de la administración de las proteínas y toxinas, los PBMC han tenido muy poco tiempo para migrar y colonizar el bazo así como los órganos linfoides secundarios (el índice de células que migra permanece relativamente bajo). Además, Env-SU tiene principalmente como objetivo los monocitos, que se diferencian rápidamente en macrófagos en los tejidos. Estas células son muy adherentes y preferentemente se "pegarán" al peritoneo en vez de colonizar los órganos linfoides secundarios. Parece por lo tanto lógico encontrar una producción más importante de citoquinas en el lugar mismo del injerto de las células, en la cavidad intraperitoneal (IP).

25 La dosificación del TNF- α humano revela una concentración que alcanza 1400 pg/ml en IP para el ratón inyectado con Env-SU y 3000 pg/ml en IP, así como 1200 pg/ml en el suero para el ratón inyectado con LPS. Se observan las mismas tendencias para la dosificación de IL-6 con 1700 pg/ml detectados en IP en el ratón inyectado con Env-SU y 9600 pg/ml y 1400 pg/ml respectivamente en IP y en el suero del ratón inyectado con LPS.

30 La decisión de dosificar las citoquinas murinas en ratones SCID-hu puede parecer sorprendente, ya que estas están desprovistas de linfocitos T y B. Sin embargo, la población de los monocitos/macrófagos permanece activa y contribuye a la producción de TNF- α y de IL-6 en estos ratones. Así, se demuestra que las concentraciones en IL-6 murina detectadas son siempre superiores a las concentraciones en IL-6 humana, lo que no es el caso para el TNF- α . Este último punto ilustra por lo tanto perfectamente "in vivo" el efecto directo de la envoltura MSRv sobre el componente de la inmunidad innata, en ausencia de linfocitos funcionales en este modelo SCID (para la parte murina).

35 El objeto de este estudio era evaluar *in vivo* la patogenicidad asociada a la proteína de envoltura recombinante, Env-SU, después de haber aportado la prueba de una patogenicidad *in vitro* sobre unos PBMC humanos. Los efectos proinflamatorios de la proteína Env-SU y del LPS, caracterizados por una producción masiva y puntual (2h post-inyección) de TNF- α y/o de IL-6 se observan en los ratones SCID-hu. Tras los resultados obtenidos, se pueden validar los protocolos experimentales de extracciones y de análisis de la producción de citoquinas (en el suero y por lavado IP) para la utilización sobre las SCID humanizadas, tal como se realizan sobre un modelo murino en un estudio de factibilidad "técnica" previa sobre los ratones C57Bl6.

Modelo EAE

45 El modelo EAE es un modelo animal de esclerosis múltiple que se basa en la inducción en periferia de una autoinmunidad dirigida contra unos determinantes de la mielina.

50 Este modelo es, hoy día, el modelo de referencia utilizado para todos los protocolos de validación "preclínica" de moléculas terapéuticas destinadas a tratar la esclerosis múltiple.

Este modelo está caracterizado por la presencia de linfocitos T autorreactivos y una desmielinización que conduce a unos signos neurológicos graves.

55 Su desarrollo se basa clásicamente en la inyección en ratones C57Bl6 de un péptido de mielina acoplado a un adyuvante adecuado (adyuvante completo de Freund) y asociado a una inyección de toxina pertussis.

El adyuvante que está compuesto de micobacterias inactivadas permite la ruptura de tolerancia contra la mielina inyectada y favorece el desarrollo de los linfocitos T autorreactivos.

60 La toxina pertussis favorece la apertura de la barrera hemato-encefálica pero desempeña también un papel en la ruptura de tolerancia.

65 Se ha demostrado que Env-SU activaba el sistema inmunitario innato a través del receptor TLR4 y era capaz de inducir el desarrollo de respuestas linfocitarias de tipo Th1. Env-SU podría por lo tanto desempeñar un papel de adyuvante para la activación de los mecanismos de autoinmunidad y de desmielinización asociados a la SEP. Este papel potencial se estudió en el modelo EAE.

Se realizaron tres experimentos diferentes.

1. - Experimento preliminar:

Material y método

El principio activo del adyuvante completo de Freund (microbacterias inactivadas) normalmente utilizado para el modelo de esclerosis múltiple "EAE" clásicamente realizado, se sustituyó por la fracción Env-SU de la proteína de la envoltura de MSRV.

Material

Ocho ratones C57B16 (Charles River).
Péptido de mielina MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) 35-55 inmunogrades de Neosystem.
Adyuvante completo de Freund (CFA) de SIGMA.
Adyuvante incompleto de Freund (IFA) de SIGMA.
Toxina Pertussis (Salt free bordetella pertussis) de Calbiochem.
Env-SU de Protein Expert.

Método:

Inyección subcutánea de 200 µl de:

- Control positivo:
MOG 150 µg + CFA: 3 ratones ensayados.
- Control negativo:
MOG 150 µg + IFA: 2 ratones ensayados.
- Env-SU:
MOG 150 µg + IFA + Env-SU (50 µg): 3 ratones ensayados;

y después inyección de 200 ul (IV) de toxina pertussis (200 ng) a D0 y D2.

Los signos neurológicos se miden después diariamente. Las diferentes fases se enumeran a continuación en función de los signos neurológicos observados.

La fase 0 significa sin señal clínica,
la fase 1 significa colas blandas,
la fase 2 significa trastornos del modo de andar,
la fase 3 significa parálisis parcial de los miembros posteriores,
la fase 4 significa parálisis total de los miembros posteriores,
la fase 5 significa parálisis de los miembros posteriores y parálisis de los miembros anteriores,
la fase 6 significa animales moribundos o muertos.

Resultados:

- MOG (150 µg) + CFA: 2 ratones de 3 han desarrollado la enfermedad (fase 4).
- MOG (150 µg) + IFA: ninguna señal observada.
- MOG (150 µg) + Env-SU (50 µg): 3 ratones de 3 han desarrollado la enfermedad (fases 1 a 6).

Los resultados del estudio preliminar se presentan en la figura 18.

Este estudio preliminar muestra que Env-SU, que activa el sistema inmunitario a través del receptor TLR4, puede ser utilizada como adyuvante para el desarrollo del modelo de la SEP, el EAE.

El control positivo con un adyuvante "clásico" (ACF) valida el experimento. El control negativo con un adyuvante incompleto sin potencial inductor de autoinmunidad (AIF) valida la necesidad de estimular el sistema inmunitario según unas vías específicas para inducir una reacción autoinmune.

Así, a partir de esta fase preliminar, es evidente que la proteína Env del retrovirus MSRV/HERV-W es por lo tanto muy capaz de provocar una sensibilización autoinmune con un efecto sobre el sistema nervioso central como el

adyuvante "experimental" actualmente utilizado para el modelo EAE.

La diferencia mayor con el ACF, cuyo principio activo es un lisado de *Mycobacterium tuberculosis*, es que esta bacteria no está de ninguna manera asociada con la esclerosis múltiple en el ser humano, mientras que el retrovirus MSRV y sus análogos genéticos de la familia HERV-W están claramente asociados a la esclerosis múltiple en el ser humano [2, 7, 8, 10, 61-53]. Además, la expresión y la circulación en los fluidos biológicos de viriones portadores de esta proteína de la envoltura está correlacionada con la progresión de la enfermedad [10].

Por lo tanto, y a partir de esta fase preliminar, es evidente que cualquier agente terapéutico susceptible de inhibir el potencial inmunológico "inductor de autoinmunidad" de la proteína de la envoltura Env de esta familia retroviral es particularmente interesante, además se seleccionó por su actividad inhibidora de los efectos anti-inflamatorios tales como se describen en la presente invención con los ensayos celulares *in vitro*. En efecto, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas Env MSRV/HERV-W son implícitamente inhibidores de los efectos "inductores de autoinmunidad" de estas proteínas cuando se expresan en la superficie de los viriones detectables en los pacientes que padecen SEP [8, 10, 62]. Su utilización en terapéutica humana es evidente y está técnicamente al alcance del experto en la materia, según unas modalidades conocidas para unos anticuerpos terapéuticos actualmente autorizados y comercializados para la terapia humana, como el anticuerpo anti-TNF alfa comercializado bajo el nombre de REMICAD, que está prescrito para el tratamiento de la poliartritis reumatoide en particular. Es interesante, además, señalar en este caso que este anticuerpo terapéutico, disponible comercialmente, tiene como objetivo un producto "aguas abajo" de la cascada de activación pro-inflamatoria, mientras que según la invención, la diana terapéutica está bien inhibida antes de la inducción de TNF-alfa a través del TLR4 en particular.

Es asimismo importante señalar que los agentes terapéuticos actualmente propuestos en la terapia de la SEP (corticosteroides, interferón beta u otros) actúan sobre una parte limitada sólo de los componentes proinflamatorios producidos consecutivamente a la iniciación de la cascada inmunopatológica, lo que explica su eficacia parcial y relativa en el tratamiento de los pacientes.

Por el contrario, inhibiendo el efecto primario de la proteína Env MSRV/HERV-W antes de la activación de la vía del receptor TLR4 y por lo tanto de la inmunidad innata utilizada en esta fase inicial, el único agonista inmunopatogénico presente en esta fase está inhibido, lo que no es ya el caso con la multitud de productos proinflamatorios segregados después de la activación primaria de esta vía (figura 8). Esta ventaja "biológica" aporta un potencial de eficacia único en los enfermos, aún más que tiene como diana un agente "clave" en la etiopatogenia de la SEP, y no sólo unos subproductos de activación cuya eficacia se midió en un modelo EAE inducido por el agente de la tuberculosis (*M. tuberculosis* en el adyuvante completo de Freund), que no tiene nada que ver con la enfermedad humana SEP.

2. Experimento 2

Se ha efectuado el mismo tipo de experimento con el fin de confirmar los resultados preliminares observados.

Método

Inyección subcutánea de 200 µl de:

- MOG (150 µg) + CFA: 4 ratones ensayados.
- MOG (150 µg) + IFA: 3 ratones ensayados.
- MOG (150 µg) + IFA + Env-SU (50 µg): 4 ratones ensayados.
- MOG (150 µg) + IFA + LPS (20ug): 4 ratones ensayados;

y después inyección de µl (IV) de toxina pertussis (200 ng) a D0 y D2.

Medición de los signos clínicos

Se recuperan después los bazos de todos los ratones y se congelan unas suspensiones celulares.

Los cerebros de 2 ratones se recuperan y después se congelan tras la transfusión al PFA 4%. (cerebro de un ratón Env fase 3; cerebro de un ratón LPS fase 0).

Se visualizaron unas lesiones inflamatorias características por análisis histológico en el cerebro del ratón que ha recibido la proteína Env y no en el del ratón que ha recibido la inyección de LPS.

Resultados:

Seguimiento de los signos neurológicos:

- MOG (150 µg) + CFA: 4 ratones de 4 han desarrollado la enfermedad (fases 2 a 6).

- MOG (150 µg) + IFA: Ningún signo observado.
- MOG (150 µg) + Env-SU (50 µg): 4 ratones de 4 han desarrollado la enfermedad (fases 1 a 5).
- MOG (150 µg) + LPS (20 µg): Ningún signo observado.

5 Los resultados están ilustrados en la figura 19.

Estos resultados confirman que Env-SU puede tener un papel adyuvante en la inducción de los signos neurológicos observados durante el desarrollo del modelo de SEP que es EAE.

10 Además de los controles anteriores, se utilizó el LPS (lipopolisacárido bacteriano), ya que estimula el mismo receptor en la superficie de las células presentadoras del antígeno que la proteína Env MSR/V: TLR4. La ausencia de efecto inductor de autoinmunidad de LPS en estas condiciones, muestra que la potencialidad inmunológica de la proteína Env es muy superior a la de otros ligandos de TLR4 y que, lógicamente, un inhibidor que tiene como diana esta proteína será una herramienta terapéutica mejor que unas moléculas que inhiben no específicamente algunas vías activadas por esta última.

15 Estudios funcionales:

Los bazo se descongelaron y después se reestimularon los esplenocitos con un péptido MOG *in vitro*, después se midió la producción de IFN-g (cinética y dosis-respuesta).

20 2×10^6 esplenocitos/ml de c-RPMI + 10% de FCS.

Se presentan las medias de 3 ratones para Env y 2 para IFA y LPS.

25 La figura 20 ilustra la respuesta en función de la dosis de MOG (efecto-dosis), mediante la dosificación del interferón gamma, que firma la activación de los linfocitos T en presencia del autoantígeno específico y muestra bien la realidad de la respuesta autoinmune inducida en este modelo por la proteína Env MSR/V/HERV-W, utilizando el fragmento Env-SU que estimula específicamente la vía TLR-4 en estas condiciones. En este modelo de SEP, la respuesta de los linfocitos T no resulta de la activación directa por Env MSR/V/HERV-W, por ejemplo, por el receptor T (TCR) como en el caso de un superantígeno, pero bien aguas arriba a nivel de las células de la inmunidad innata (monocitos/macrófagos, células dendríticas, etc.) como los numerosos resultados de la presente invención lo muestran (ausencia de secreción de IFN-gamma, estimulación de los monocitos y células dendríticas purificadas, estimulación de las citoquinas "macrofágicas" murinas en el modelo SCID que no comprende linfocitos murinos funcionales, cinética IL-6 paralela a la del LPS, ausencia de IL-6 y de TNF-alfa, pero bien interferón gamma inducido en las mismas condiciones por un superantígeno de referencia -SEB-, etc.).

35 Esto está también confirmado por el estudio de la cinética en el tiempo de la respuesta linfocitaria T autoinmune contra el antígeno de mielina MOG añadido a 10 microg/ml en el medio de cultivo utilizado para ensayar los esplenocitos extraídos en los animales "EAE/MOG/Env-SU" y los controles "sin Env" con adyuvante incompleto de Freund (IFA, sin extracto de *M. tuberculosis*) y MOG. Esto se ilustra por la figura 21 que muestra la progresión muy significativa de la respuesta autoinmune anti-MOG a lo largo del tiempo en los únicos ratones que han recibido Env-SU.

40 Estos resultados muestran, por lo tanto, bien que una estimulación por Env-SU asociada a un autoantígeno permite, aguas abajo de la cascada iniciada por Env-SU a nivel del receptor TLR4 sobre las células presentadoras del antígeno (APC de los cuales pertenecen los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, los microglíocitos cerebrales, etc.), el desarrollo de linfocitos T autorreactivos que son el origen exclusivo del interferón gamma (IFN-g) liberado en cantidades muy elevadas (véanse los gráficos) y, por lo tanto, una autoinmunidad mediada por estos linfocitos T *in vivo*.

45 3. Experimento 3.

El mismo tipo de experimento se efectuó con el fin de confirmar los resultados preliminares observados, pero también ensayar *in vivo* los efectos terapéuticos (sobre la consecuencia clínica medida en el modelo) de los anticuerpos anti Env-SU (representados en la presente memoria por el anticuerpo monoclonal 3B2H4), paralelamente a unos anticuerpos de mismo isotipo pero sin especificidad equivalente (representados en la presente memoria por el monoclonal anti-GAG, 3H1H6).

60 Método

Inyección subcutánea de una dosis de 200 microlitros de anticuerpos a 5 microgramo/ml, es decir 1 microgramo de anticuerpos por ratón de aproximadamente 20 gramos, es decir de 50 microgramos por kg:

- 65 - MOG (150 µg) + CFA: 5 ratones ensayados.

- MOG (150 µg) + IFA: 5 ratones ensayados.

- MOG (150 µg) + IFA + Env-SU (50 µg): 5 ratones ensayados.

5 - MOG (150 µg) + IFA + Env-SU (50 µg): 5 ratones ensayados. Estos ratones han recibido además 1 mg Ac 3B2H4 IV (200 µl);

y después inyección de 200 µl (IP) de toxina pertussis (200 ng) a D0 y D2 y medición de los signos clínicos.

10 Resultados:

Los resultados obtenidos se ilustran en la figura 22.

15 Con el fin de ensayar unas condiciones más próximas al desarrollo de una autoinmunidad progresiva como en la SEP, los resultados se obtienen en condiciones más "moderadas" que las anteriores, ya que la toxina se inyectó por vía IP y no IV como antes.

20 El control positivo "MOG+CFA" corresponde en este caso a 4/5 ratones con unos signos clínicos y que el control negativo "MOG+IFA" corresponde a 0/5 ratones afectados.

25 Con la proteína Env como con los controles positivos "MOG+CFA" el resultado clínico medio está reducido en este caso con respecto a las condiciones anteriores. Sin embargo, la clara reducción del efecto patógeno de esta proteína en presencia de anticuerpos anti-Env está ilustrada por el ataque mínimo observado en los ratones tratados.

30 Se señala así que el anticuerpo "anti-GAG" no tiene ningún efecto inhibitor sobre el efecto inmunopatológico inducido por la proteína Env, incluso potencia un poco este efecto por su presencia, mientras que el anticuerpo 3B2H4 tiene un muy claro efecto inhibitor que acerca al máximo la curva observada de la de los controles negativos "MOG+CFA". El efecto inhibitor *in vivo* de los efectos "inductor de autoinmunidad mediada por los linfocitos T" de tipo EAE está por lo tanto relacionado con la presencia del anticuerpo 3B2H4 anti-Env MSR/V/HERV-W.

35 En el modelo de esclerosis múltiple "EAE", estos son los efectos clínicos (ataque neurológico) que se miden en particular y no sólo los parámetros biológicos asociados. El efecto estudiado no es por lo tanto sólo un efecto biológico tal como se ha descrito anteriormente, sino su traducción clínica en el ámbito de un modelo patológico dedicado. Por lo tanto, lo que se mide en este caso es bien un efecto terapéutico. Ahora bien, es bien conocido por el experto en la materia que en este caso estos son los límites cualitativos de la validación terapéutica "pre-clínica" para la terapia humana, ya que cualquier validación terapéutica ulterior sobre la enfermedad humana debe hacerse sobre el ser humano en base a criterios obtenidos sobre un modelo animal.

40 Una vez identificados y seleccionados los agentes terapéuticos candidatos y los modelos animales dedicados desarrollados y validados, como en la presente invención, una extensión "cualitativa" de las series de ensayos efectuada puede implícitamente ser realizada desarrollando las herramientas y los modelos ya obtenidos con unos controles adecuados y bien conocidos por el experto en la materia, comunes a los estudios farmacológicos, con el fin de responder a los criterios pre-clínicos.

45 Los elementos obtenidos son por lo tanto necesarios y suficientes para finalizar las validaciones pre-clínicas y desarrollar un experimento terapéutico en el ser humano.

50 Por otra parte, el análisis de secuencia de aminoácido de las proteínas ENV MSR/V y HERV-W7q (sincitina) muestran la fuerte homología y la conservación de las principales unidades de aminoácido en la familia MSR/V/HERV-W (figura 23). Esto se traduce por una reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales anti-ENV (figura 24).

55 El análisis de las secuencias (véase la figura 25) permite también evaluar unas regiones antigénicas de interés en la secuencia de la proteína Env-SU referenciada en SEC ID nº 1 que corresponde a las regiones definidas por los aminoácidos 122-131 (inclusive) y/o 312-316 (inclusive) y/o 181-186 (inclusive).

60 Por lo tanto, se ha confirmado en este modelo animal de SEP, que un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de la envoltura Env de los retrovirus de la familia MSR/V/HERV-W y, en particular, de su miembro prototipo MSR/V, en particular seleccionado por sus propiedades inhibitoras de la vía proinflamatoria iniciada por el receptor TLR4 en un ensayo celular, constituye un agente terapéutico capaz de inhibir el potencial inmunopatológico, en particular "inductor de autoinmunidad", de la proteína de la envoltura ENV de esta familia retroviral.

65 Por lo tanto, se demuestra ahora que:

- 1) los viriones MSR/V envueltos se detectan en los pacientes que padecen esclerosis múltiple [4, 8, 10, 62, 64],

- 2) sus expresiones correlaciona la evolución de la enfermedad [10],
- 5 3) la respuesta inmunológica de la proteína Env MSR/V correlaciona la progresión y la gravedad de la enfermedad [65],
- 4) los viriones MSR/V poseen un ARN que codifica para la proteína Env MSR/V [66],
- 10 5) las proteínas Env de la familia MSR/V/HERV-W tienen una muy alta homología a nivel de su secuencia de aminoácido y a nivel de las secuencias genéticas que los codifican [2, 5, 66],
- 15 6) la proteína Env MSR/V y la proteína Env codificada por la copia HERV-W en la región del cromosoma humano 7q21-22 (HERV-W7q) tienen unas propiedades proinflamatorias *in vitro* e *in vivo* (ejemplos de la presente solicitud de patente y [11, 12, 59],
- 20 7) la proteína Env MSR/V es capaz de reproducir el modelo animal bien conocido de esclerosis múltiple (SEP), a saber la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), en presencia de un autoantígeno del sistema nervioso central procedente de la mielina (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, MOG, ejemplo de la presente solicitud de patente),
- 25 8) este modelo experimental está habitualmente provocado artificialmente por un extracto antigénico de *Mycobacterium tuberculosis*, agente bacteriano de la tuberculosis, sin relación con la etiología de la esclerosis múltiple humana. Su obtención con la proteína de la envoltura del retrovirus MSR/V, que pertenece a la familia retroviral endógena HERV-W, cuya expresión es detectable en correlación con la enfermedad en forma de viriones [8, 10, 62] o en forma de proteína Env específicamente expresada en las lesiones de desmielinización características de la SEP [59, 67], constituye un modelo animal nuevo y único que permite el estudio de los agentes terapéuticos que tienen como diana un agente retroviral implicado en la inmunopatogenia de la enfermedad,
- 30 9) se encuentran tanto los efectos proinflamatorios asociados a la activación de los linfocitos T descritos en las células humanas, como a nivel de los linfocitos T murinos del modelo EAE inducido por la proteína Env MSR/V, así como lo demuestra las dosificaciones de producción de interferón gamma (ejemplo de la presente solicitud de patente).
- 35 10) los efectos proinflamatorios de la proteína Env MSR/V son mediados por las células linfoides y las células presentadoras del antígeno, y por lo tanto por los sistemas inmunitarios (ejemplos de la presente solicitud de patente, [11, 12]),
- 40 11) unos anticuerpos monoclonales anti-Env MSR/V (3B2H4 y 13H5A5) son capaces de inhibir específicamente los efectos proinflamatorios de la proteína Env MSR/V sobre unas células linfoides (linfocitos y monocitos) sanguíneas humanas (ejemplos de la presente solicitud de patente),
- 45 12) el efecto "inhibidor específico" de un anticuerpo monoclonal (3B2H4) dirigido contra la proteína Env MSR/V está confirmado en el modelo animal de EAE inducido por ENV MSR/V. Este efecto se traduce por una mejora clínica notable de los animales tratados con respecto a los animales no tratados o tratados con un anticuerpo no pertinente de mismo isotipo, (ejemplo de la presente solicitud de patente).

Los anticuerpos monoclonales anti-ENV MSR/V/HERV-W pueden por lo tanto tener un efecto inhibidor de la inflamación, de la autoinmunidad y de los trastornos clínicos neurológicos inducidos por dicha proteína de un agente retroviral asociado a la enfermedad.

Por lo tanto, es evidente que los anticuerpos cuyas propiedades se han verificado *in vitro* e *in vivo*, constituyen nuevos agentes terapéuticos de la enfermedad humana, esclerosis múltiples, como tales o mejorados por las técnicas biológicas, en particular de ingeniería genética.

Los ensayos celulares y los modelos animales apropiados para la evaluación pre-clínica de estos anticuerpos terapéuticos se describen en la presente memoria y permiten ahora que el experto en la materia realice las etapas de validación requeridas antes de los ensayos terapéuticos en el ser humano y los adapte a diferentes patologías asociadas a la familia retroviral MSR/V/HERV-W.

Referencias bibliográficas

1. Conrad, B., *et al.*, A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell*, 1997. 90(2): p. 303-13.
2. Perron, H., *et al.*, Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple

- sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997. 94(14): p. 7583-8.
3. Deb-Rinker, P., *et al.*, Molecular characterization of a MSRV-like sequence identified by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Genomics*, 1999. 61 (2): p. 133-44.
- 5 4. Perron, H., *et al.*, Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis [letter]. *Lancet*, 1991. 337 (8745): p. 862-3.
- 10 5. Blond, J.L., *et al.*, Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*, 1999. 73(2): p. 1175-85.
- 15 6. Perron, H., *et al.*, Particle-associated retroviral RNA and tandem RGH/HERV-W copies on human chromosome 7q: possible components of a 'chain-reaction' triggered by infectious agents in multiple sclerosis? *J Neurovirol*, 2000. 6(Supl. 2): p. S67-75.
7. Dolei, A., *et al.*, Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology*, 2002. 58(3): p. 471-3.
- 20 8. Garson, J.A., *et al.*, Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis [letter] [see comments]. *Lancet*, 1998. 351(9095): p. 33.
9. Olsson, P., *et al.*, Retroviral RNA related to ERV9/MSRV in a human serum: a new sequence variant. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. 15(6): p. 591-3.
- 25 10. Sotgiu, S., *et al.*, Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: an observational study. *Neurology*, 2002. 59(7): p. 1071-3.
11. Perron, H., *et al.*, Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology*, 2001. 287(2): p. 321-32.
- 30 12. Firouzi, R., *et al.*, Multiple Sclerosis Associated Retrovirus Particles Cause T-Lymphocyte Dependent Death with Brain Hemorrhage, in Humanized SCID Mice Model. *Journal of Neurovirology*, 2003. 9: p. 79-93.
- 35 13. Lin, A., *et al.*, The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6. *Schizophr Res*, 1998. 32(1): p. 9-15. 6: Stevens JR. Neuropathology of schizophren... [PMID: 7125843]Related Articles, Links.
14. Karlsson, H., *et al.*, Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(8): p. 4634-9.
- 40 15. Perron, H., Microbial Agents triggering Endogenous Retroviruses within Genetic Susceptibility Loci, Resulting in Expression of Superantigen and Gliotoxic Molecules: a Plausible " Immunovirogenetic " Cascade causing Multiple Sclerosis ? *Modern Aspects of Immunobiology*, 2001. 1(5): p. 198-203.
- 45 16. Liu, Y., *et al.*, Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. 305(1): p. 212-8. 2: Gao HM *et al.* Synergistic dopaminergic neur...[PMID: 12598611]Related Articles, Links.
- 50 17. Morimoto, K., T. Murasugi, y T. Oda, Acute neuroinflammation exacerbates excitotoxicity in rat hippocampus in vivo. *Exp Neurol*, 2002. 177 (1): p. 95-104. 5: Stoll G. Inflammatory cytokines in the... [PMID: 12407295]Related Articles, Links.
18. Guillemain, G.J. y B.J. Brew, Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep*, 2002. 7 (4): p. 199-206. 7: Kim EJ *et al.* Neuroprotective effects of pr... [PMID: 12237868]Related Articles, Links.
- 55 19. Kim, W.G., *et al.*, Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*, 2000. 20(16): p. 6309-16. 15: Czlonkowska A *et al.* Inflammatory changes in the s... [PMID: 10894230]Related Articles, Links.
- 60 20. Licinio, J. y M.L. Wong, The role of inflammatory mediators in the biology of major depression: central nervous system cytokines modulate the biological substrate of depressive symptoms, regulate stress-responsive systems, and contribute to neurotoxicity and neuroprotection. *Mol Psychiatry*, 1999. 4(4): p. 317-27. 18: Cotter RL *et al.* Insights into the neurodegene...[PMID: 10204569]Related Articles, Links.
- 65 21. Cotter, R.L., *et al.*, Insights into the neurodegenerative process of Alzheimer's disease: a role for mononuclear

- phagocyte-associated inflammation and neurotoxicity. *J Leukoc Biol*, 1999. 65(4): p. 416-27. 19: Heese K *et al.* Inflammatory signals induce n...[PMID: 9453564]Related Articles, Links.
- 5 22. Heese, K., C. Hock, y U. Otten, Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J Neurochem*, 1998. 70(2): p. 699-707. 20: Sasser LB *et al.* Subchronic toxicity evaluatio...[PMID: 8600286]Related Articles, Links.
- 10 23. Chao, C.C., *et al.*, Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alfa synergistically médiare neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav Immun*, 1995. 9 (4): p. 355-65. 22: Chao CC *et al.* Tumor necrosis factor-alfa p...[PMID: 7705222]Related Articles, Links.
- 15 24. Chao, C.C. y S. Hu, Tumor necrosis factor-alfa potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev Neurosci*, 1994. 16(3-4): p. 172-9.
- 20 25. Bal-Price, A. y G.C. Brown, Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci*, 2001. 21(17): p. 6480-91. 5: Obrenovitch TP. Quinolinic acid accumulation ...[PMID: 11462760]Related Articles, Links.
26. Obrenovitch, T.P., Quinolinic acid accumulation during neuroinflammation. Does it imply excitotoxicity? *Ann N Y Acad Sci*, 2001. 939 (1-10.): p. Law A *et al.* Say NO to Alzheimer's disease...[PMID: 11245887]Related Articles, Links.
- 25 27. Werner, P., D. Pitt, y C.S. Raine, Glutamate excitotoxicity--a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis? *J Neural Transm Suppl*, 2000(60): p. 375-85. 8: Pitt D *et al.* Glutamate excitotoxicity in a...[PMID: 10613826]Related Articles, Links.
28. Pitt, D., P. Werner, y C.S. Raine, Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 2000. 6 (1): p. 67-70. 9: Carlson NG *et al.* Inflammatory cytokines IL-1 a...[PMID: 10490998]Related Articles, Links.
- 30 29. Carlson, N.G., *et al.*, Inflammatory cytokines IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alfa impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol*, 1999. 163 (7): p. 3963-8. 10: Wang YS *et al.* The bacterial endotoxin lipop...[PMID: 9930737]Related Articles, Links.
- 35 30. Wang, Y.S. y T.D. White, The bacterial endotoxin lipopolysaccharide causes rapid inappropriate excitation in rat cortex. *J Neurochem*, 1999. 72 (2): p. 652-60. 11: Chao CC *et al.* Tumor necrosis factor-alfa p...[PMID: 7705222]Related Articles, Links.
- 40 31. Yolken, R.H., *et al.*, Endogenous retroviruses and schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000. 31 (2-3): p. 193-9.
- 45 32. Kleine, T.O., *et al.*, Approach to discriminate subgroups in multiple sclerosis with cerebrospinal fluid (CSF) basic inflammation indices and TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8. *Brain Res Bull*, 2003. 61(3): p. 327-46. 2: Aarli JA. Role of cytokines in neurolog...[PMID: 12871095]Related Articles, Links.
- 50 33. Aarli, J.A., Role of cytokines in neurological disorders. *Curr Med Chem*, 2003. 10(19): p. 1931-7. 3: Vladoic A *et al.* Cerebrospinal fluid and serum... [PMID: 12445803]Related Articles, Links.
- 55 34. Miljkovic, D., *et al.*, Nitric oxide metabolites and interleukin-6 in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*, 2002. 9(4): p. 413-8. 5: Clerici M *et al.* Single-cell analysis of cytok...[PMID: 11730945]Related Articles, Links.
- 60 35. Fedetz, M., *et al.*, The -174/-597 promoter polymorphisms in the interleukin-6 gene are not associated with susceptibility to multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 2001. 190 (1-2): p. 69-72. 7: Stelmasiak Z *et al.* IL-6 and sIL-6R concentration...[PMID: 11535934]Related Articles, Links.
- 65 36. Vandenbroeck, K., *et al.*, High-resolution analysis of IL-6 minisatellite polymorphism in Sardinian multiple sclerosis: effect on course and onset of disease. *Genes Immun*, 2000. 1(7): p. 460-3. 9: Stelmasiak Z *et al.* Interleukin-6 concentration i...[PMID: 11208463]Related Articles, Links.
37. Stelmasiak, Z., *et al.*, Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Med Sci Monit*, 2000. 6(6): p. 1104-8. 10: Schonrock LM *et al.* Interleukin-6 expression in h...[PMID: 11044583]Related Articles, Links.
38. Cornford, E.M. y M.E. Cornford, New systems for delivery of drugs to the brain in neurological disease. *Lancet Neurol*, 2002. 1(5): p. 306-15. 4: Schmidt J *et al.* Drug targeting by long-circul... [PMID: 12805101]Related Articles, Links.

39. Schmidt, J., *et al.*, Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain*, 2003. 126 (Pt 8): p. 1895-904. 5: Fournier E *et al.* Therapeutic effectiveness of ... [PMID: 12767096]Related Articles, Links.
- 5 40. Pardridge, W.M., Blood-brain barrier drug targeting enables neuroprotection in brain ischemia following delayed intravenous administration of neurotrophins. *Adv Exp Med Biol*, 2002. 513 (397-430): p. Watanabe S *et al.* Chemotherapeutic targeting of...[PMID: 12575735]Related Articles, Links.
- 10 41. Watanabe, S., *et al.*, Chemotherapeutic targeting of etoposide to regions of the brain on the basis of polyamine level. *J Drug Target*, 2002. 10(6): p. 457-61. 13: Lahiri DK *et al.* A critical analysis of new mo...[PMID: 12558063]Related Articles, Links.
- 15 42. Scherrmann, J.M., Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*, 2002. 38(6): p. 349-54. 15: Wang JX *et al.* Enhanced brain targeting by s... [PMID: 12445558]Related Articles, Links.
- 20 43. Wang, J.X., X. Sun, y Z.R. Zhang, Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002. 54(3): p. 285-90. 16: Mahar Doan KM *et al.* Passive permeability and P-gl...[PMID: 12438524]Related Articles, Links.
- 25 44. Hosoya, K., S. Ohtsuki, y T. Terasaki, Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood"-brain barrier. *Int J Pharm*, 2002. 248(1-2): p. 15-29. 18: Mora M *et al.* Design and characterization o...[PMID: 12425459]Related Articles, Links.
- 30 45. Mora, M., *et al.*, Design and characterization of liposomes containing long-chain N-acylPEs for brain delivery: penetration of liposomes incorporating GM1 into the rat brain. *Pharm Res*, 2002. 19(10): p. 1430-8.
- 35 46. Perron, H., *et al.*, Herpes simplex virus ICP0 and ICP4 immediate early proteins strongly enhance expression of a retrovirus harboured by a leptomenigeal cell line from a patient with multiple sclerosis. *J Gen Virol*, 1993. 74(Pt 1): p. 65-72.
- 40 47. Soldan, S., *et al.*, Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med*, 1997. 3: p. 1394-1397.
- 45 48. Haahr, S., *et al.*, Is multiple sclerosis caused by a dual infection with retrovirus and Epstein-Barr virus? *Neuroepidemiology*, 1992. 11(4-6): p. 299-303.
- 50 49. Bergström, T., O. Andersen, y A. Vahlne, Isolation of herpes simplex virus type 1 during first attack of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1989. 26: p. 283-285.
- 55 50. Marx, C.E., *et al.*, Cytokine effects on cortical neuron MAP-2 immunoreactivity: implications for schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 2001. 50(10): p. 743-9. 2: Maes M *et al.* Effects of atypical antipsych...[PMID: 10706993]Related Articles, Links.
- 60 51. Minagar, A., *et al.*, The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 2002. 202 (1-2): p. 13-23. 9: Jeohn GH *et al.* Go6976 protects mesencephalic... [PMID: 12076986]Related Articles, Links.
- 65 52. Gaser, C., *et al.*, Ventricular enlargement in schizophrenia related to volume reduction of the thalamus, striatum, and superior temporal cortex. *Am J Psychiatry*, 2004. 161: p. 154-156.
53. Kurtzke, J., Disability rating scales in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1984. 436: p. 347-60.
54. Karlsson, H., *et al.*, HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder. *Mol Psychiatry*, 2004. 9: p. 12-13.
- 55 55. Qiu, Z. y D.L. Gruol, Interleukin-6, beta-amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *J Neuroimmunol*, 2003. 139 (1-2): p. 51-7. 2: Jenner P. Oxidative stress in Parkinson...[PMID: 12666096]Related Articles, Links.
- 60 56. Lafon, M., *et al.*, Human Viral superantigens: to be or not to be transactivated ? *Trends in Immunology*, 2002. 23 (5): p. 238-239.
- 65 57. Pranzatelli, M., Innovations in drug delivery to the central nervous system. *Drugs Today (Barc)*. 1999. 35: p. 435-448.

58. Merlo, A., J. Mueller-Brand, y H. Maecke, Comparing monoclonal antibodies and small peptidic hormones for local targeting of malignant gliomas. *Acta Neurochir.*, 2003. 88: p. 83-91.
59. Antony, J., *et al.*, Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci.*, 2004. 7 (10): p. 1088-95.
60. Ng, P. y Y. Osawa, Preparation and characterization of the F (ab)₂ fragments of an aromatase activity-suppressing monoclonal antibody. *Steroids.*, 1997. 62: p. 776-81.
61. Perron, H., *et al.*, In vitro transmission and antigenicity of a retrovirus isolated from a multiple sclerosis patient. *Res Virol*, 1992. 143 (5): p. 337-50.
62. Serra, C., *et al.*, Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci*, 2001. 22(2): p. 171-3.
63. Zawada M Fau - Liwien, I., *et al.*, MSRV pol sequence copy number as a potential marker of multiple sclerosis. *Pol J Pharmacol*, 2003. 55 (5): p. 869-75.
64. Perron H Fau - Garson, J.A., *et al.*, Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(14): p. 7583-8.
65. Rolland, A., *et al.*, Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSRV (Multiple Sclerosis associated RetroViral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2004. In press (Published Online Dec.2004.).
66. Komurian-Pradel, F., *et al.*, Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology*, 1999. 260 (1): p. 1-9.
67. Perron, H., *et al.*, Human Endogenous Retrovirus (HERV)-W Env And Gag Proteins: Physiological Expression In Human Brain And Pathophysiological Modulation In Multiple Sclerosis Lesions. *J. Neurovirology*, 2005. In press.

Listado de secuencias

- <110> bioMérieux Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
- <120> Composición para el tratamiento de una patología asociada a MSRV/HERV-W
- <130> TLR4
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 287
- <212> PRT
- <213> virus MSRV/HERV-W
- <400> 1

ES 2 466 790 T3

Ser Ser Ser Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Thr Arg Leu Pro Gly
 1 5 10 15
 Asn Ile Asp Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Asn Ser Thr
 20 25 30
 Phe Thr Ala His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr Asn Ser Ala Thr
 35 40 45
 Leu Cys Met His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn
 50 55 60
 Pro Ser Cys Pro Gly Gly Leu Gly Ala Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe
 65 70 75 80
 Thr His Thr Ser Met Ser Asp Gly Gly Gly Ile Gln Gly Gln Ala Arg
 85 90 95
 Glu Lys Gln Val Lys Glu Ala Ile Ser Gln Leu Thr Arg Gly His Ser
 100 105 110
 Thr Pro Ser Pro Tyr Lys Gly Leu Val Leu Ser Lys Leu His Glu Thr
 115 120 125
 Leu Arg Thr His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr
 130 135 140
 Arg Leu His Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Met Cys
 145 150 155 160
 Leu Pro Leu His Phe Arg Pro Tyr Ile Ser Ile Pro Val Pro Glu Gln
 165 170 175
 Trp Asn Asn Phe Ser Thr Glu Ile Asn Thr Thr Ser Val Leu Val Gly
 180 185 190
 Pro Leu Val Ser Asn Leu Glu Ile Thr His Thr Ser Asn Leu Thr Cys
 195 200 205
 Val Lys Phe Ser Asn Thr Ile Asp Thr Thr Ser Ser Gln Cys Ile Arg
 210 215 220
 Trp Val Thr Pro Pro Thr Arg Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe
 225 230 235 240
 Phe Val Cys Gly Thr Ser Ala Tyr His Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu
 245 250 255
 Ser Met Cys Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr
 260 265 270
 Glu Gln Asp Leu Tyr Asn His Val Val Pro Lys Pro His Asn Lys
 275 280 285

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de por lo menos un anticuerpo seleccionado de entre (i) los anticuerpos anti-Env-SU MSR/HERV-W capaces de unirse específicamente a la fracción soluble de la proteína Env de MSR/HERV-W, y (ii) los anticuerpos anti-TLR4 capaces de unirse específicamente al receptor TLR4 de dicha fracción soluble de la proteína Env de MSR/HERV-W, teniendo los anticuerpos (i) un efecto inhibitor equivalente al de los anticuerpos (ii),
- 10 para la preparación de un medicamento destinado a tratar la esclerosis múltiple o la esquizofrenia, por inhibición de la cascada proinflamatoria que implica dicha fracción soluble de Env de MSR/HERV-W y dicho receptor.
- 15 2. Utilización según la reivindicación 1, de por lo menos dos anticuerpos, un primer anticuerpo seleccionado de entre los anticuerpos (i) y un segundo anticuerpo seleccionado de entre los anticuerpos (ii).
3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, según la cual el o los anticuerpos están asociados a un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada porque la composición comprende un vector farmacéuticamente aceptable que permite atravesar la barrera hematoencefálica.
5. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque la cascada proinflamatoria induce la formación de citoquinas seleccionadas de entre IL-6, IL-1 β y el TNF- α .
- 25 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque los anticuerpos (i) se seleccionan de entre los capaces de unirse a por lo menos una de las regiones siguientes de SEC ID n $^{\circ}$ 1: la región que empieza en el aminoácido 122 y que se termina en el aminoácido 131, la región que empieza en el aminoácido 181 y que se termina en el aminoácido 186, la región que empieza en el aminoácido 312 y que se termina en el aminoácido 316.
- 30 7. Utilización según la reivindicación 6, caracterizada porque dichos anticuerpos (i) son susceptibles de ser obtenidos a partir de un hibridoma de células de ratones inmunizados por la fracción soluble de la envoltura HERV-W.

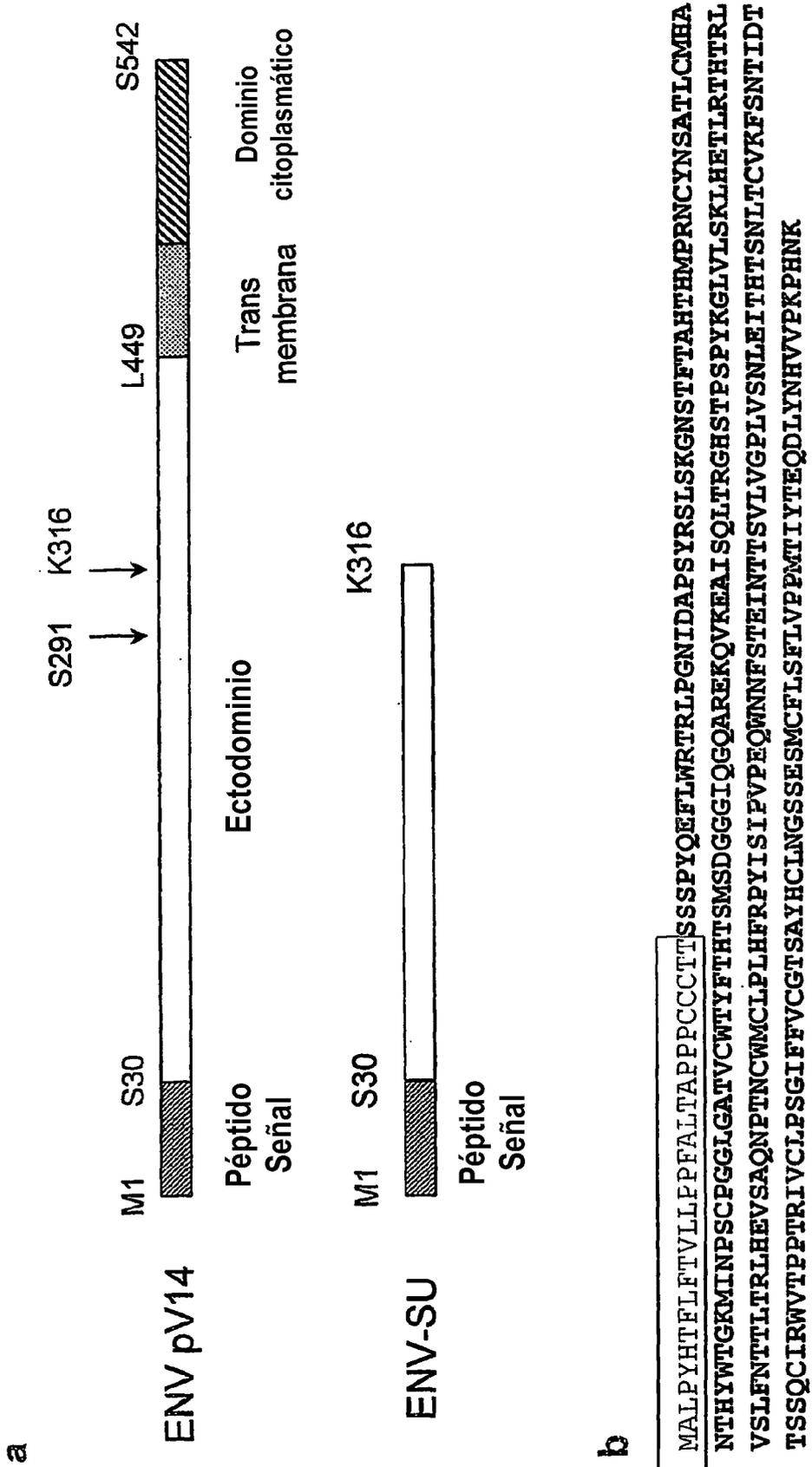
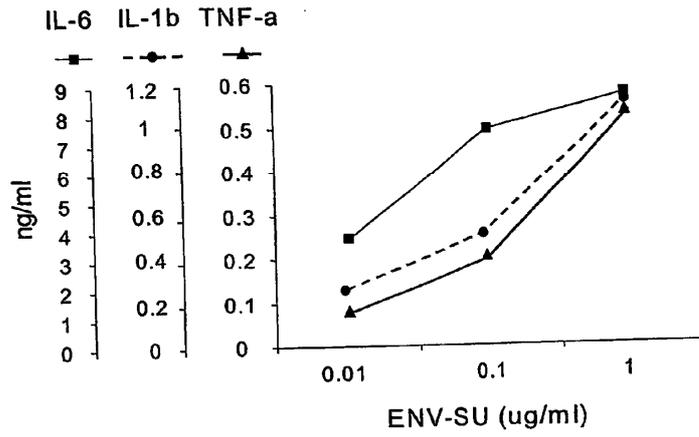


Fig. 1

A



B

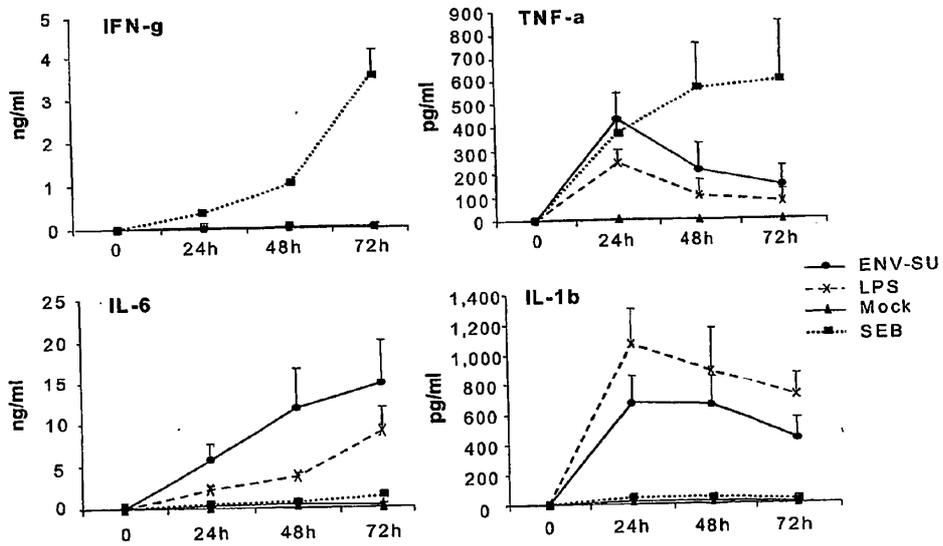


Fig. 2.

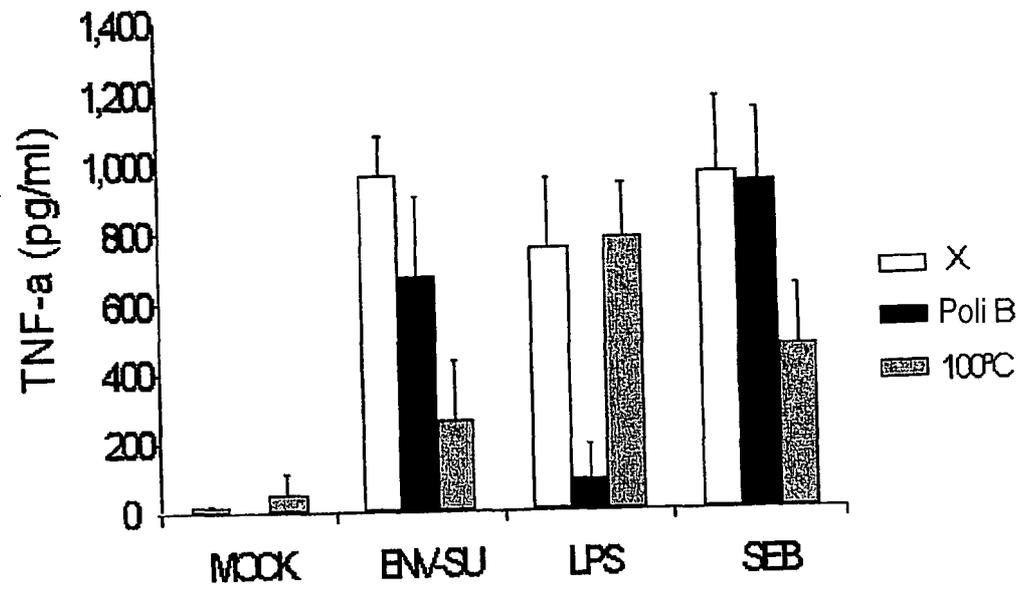


Fig. 3

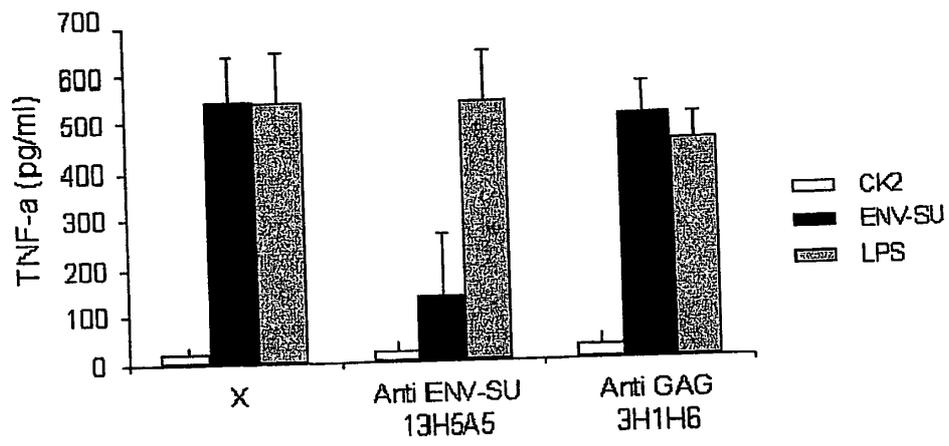


Fig. 4

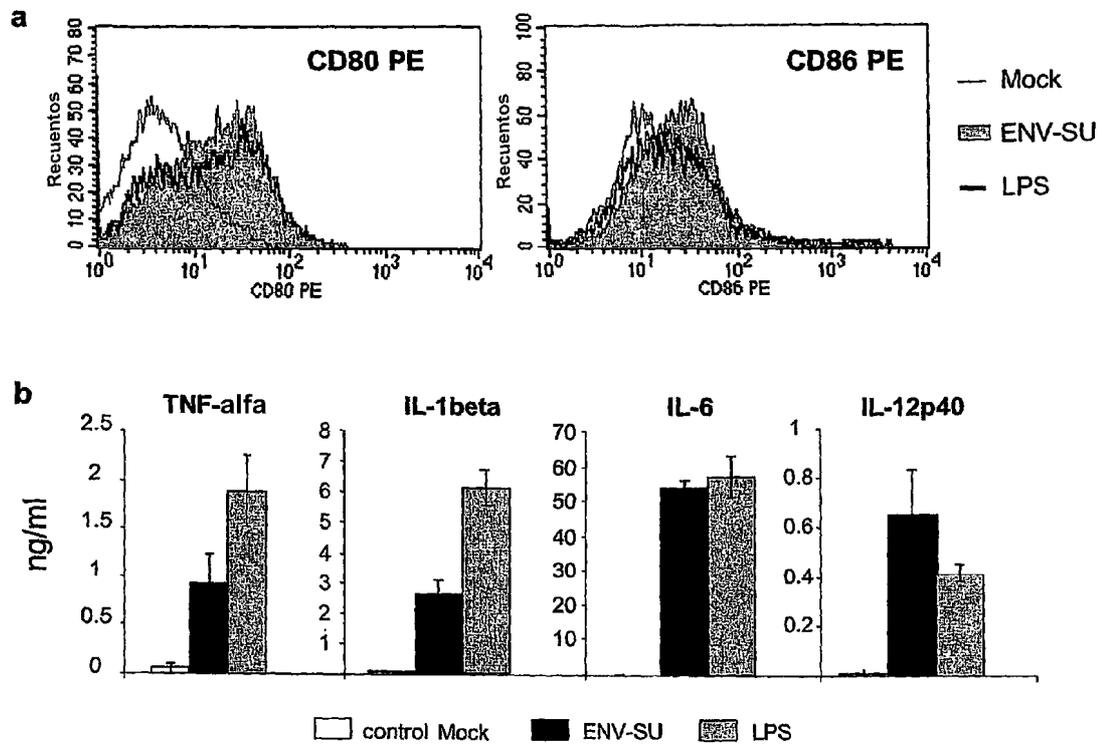


Fig. 5

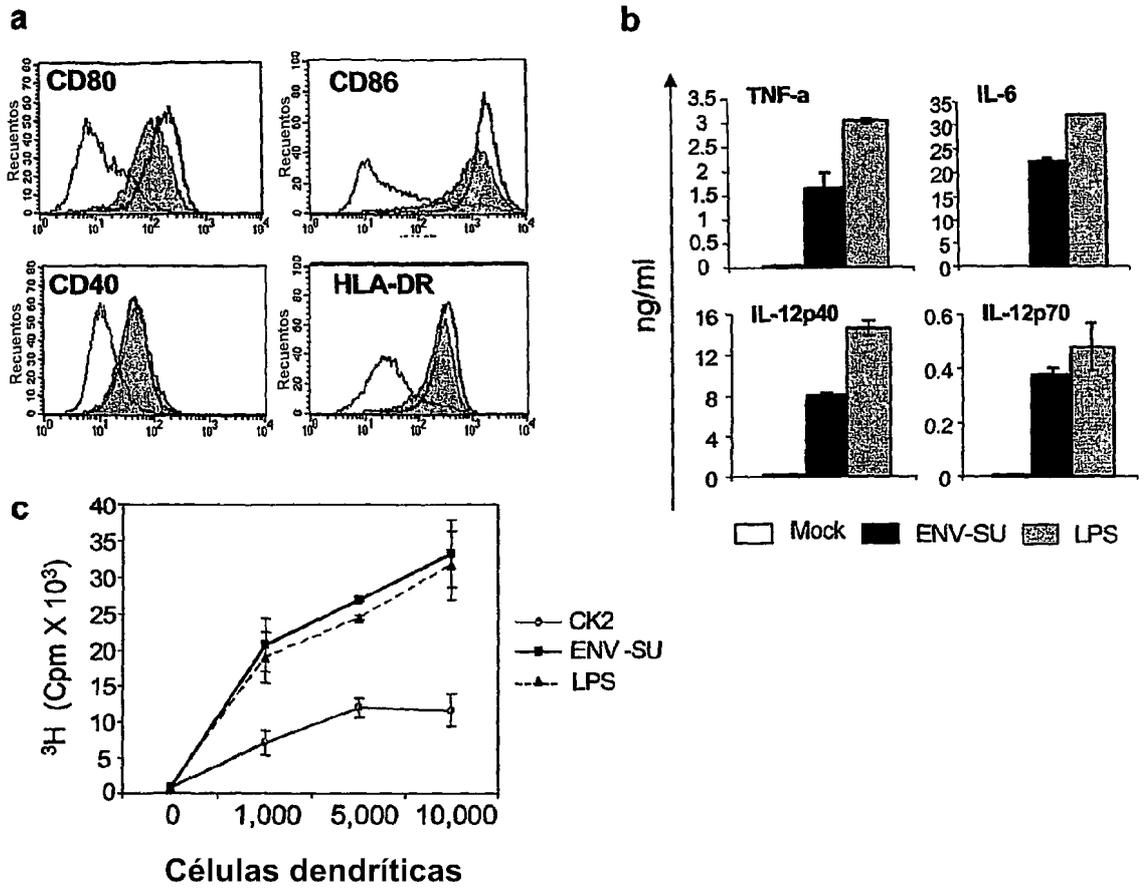


Fig. 6

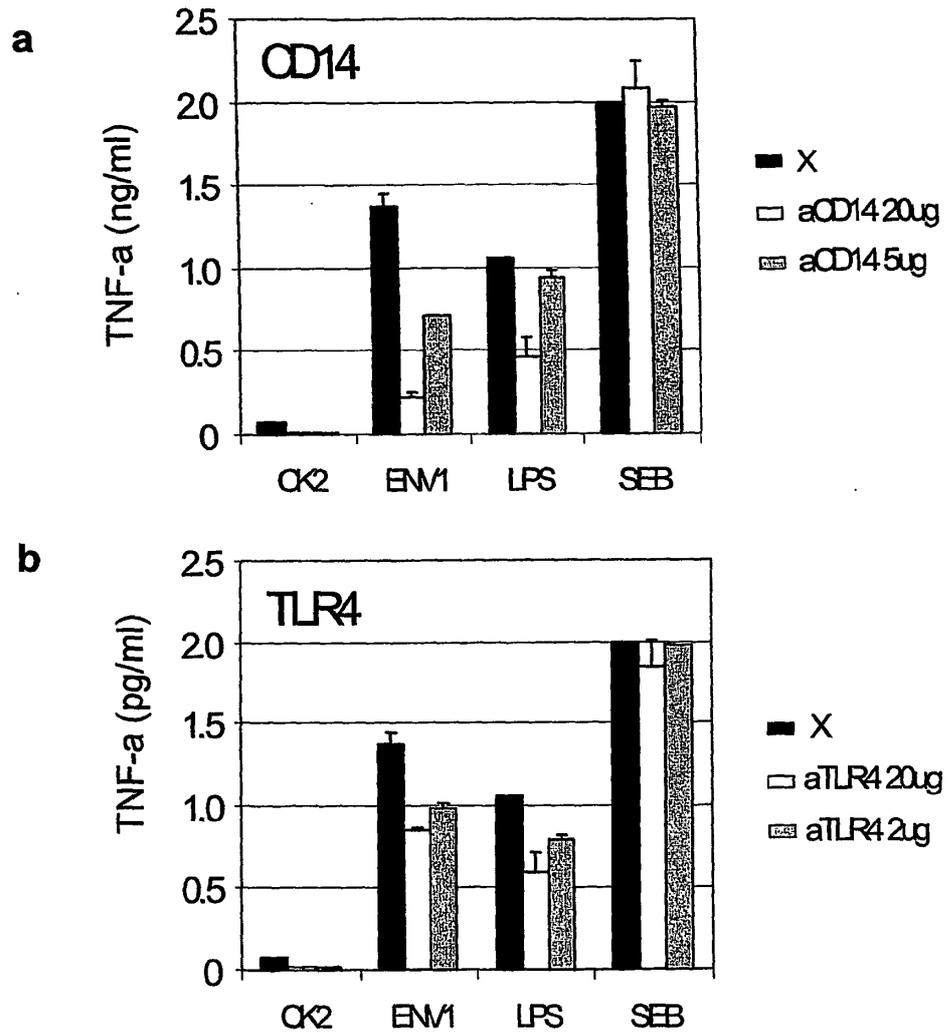


Fig. 7

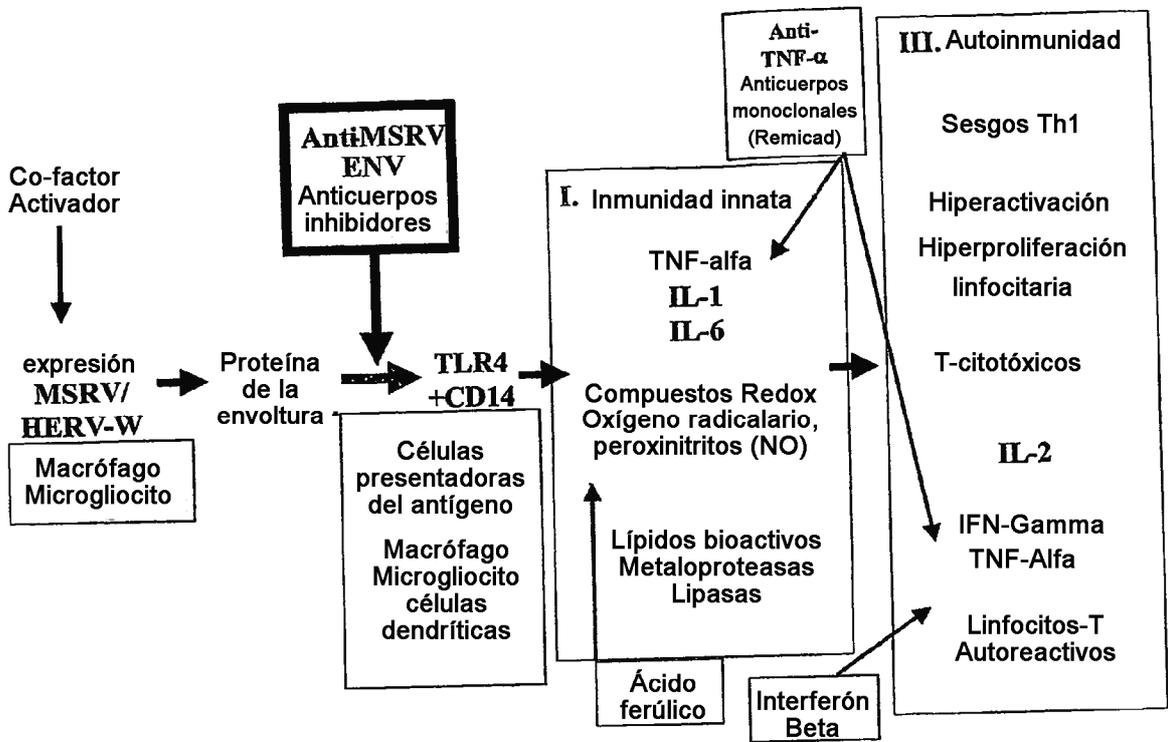


Fig. 8

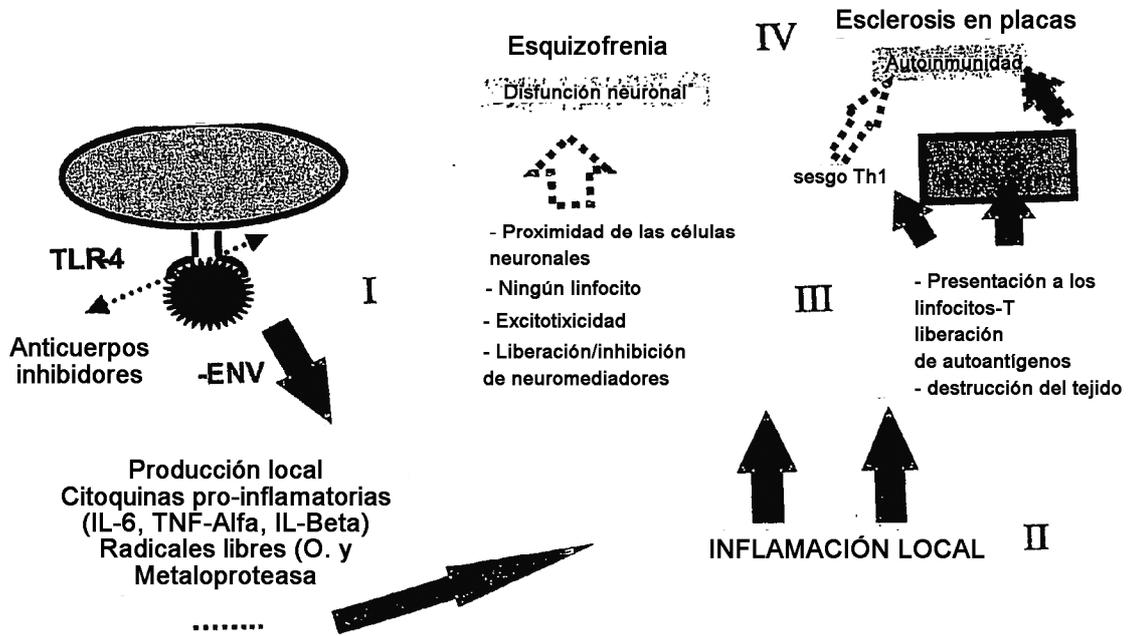


Fig. 9

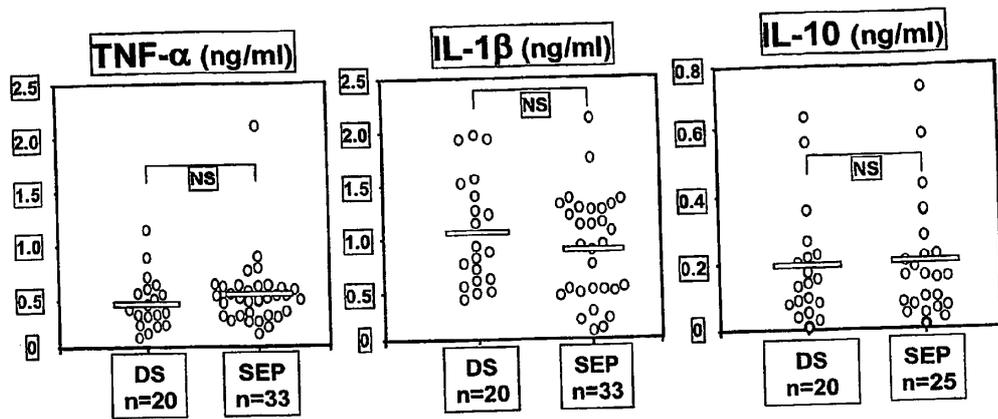


Fig. 10

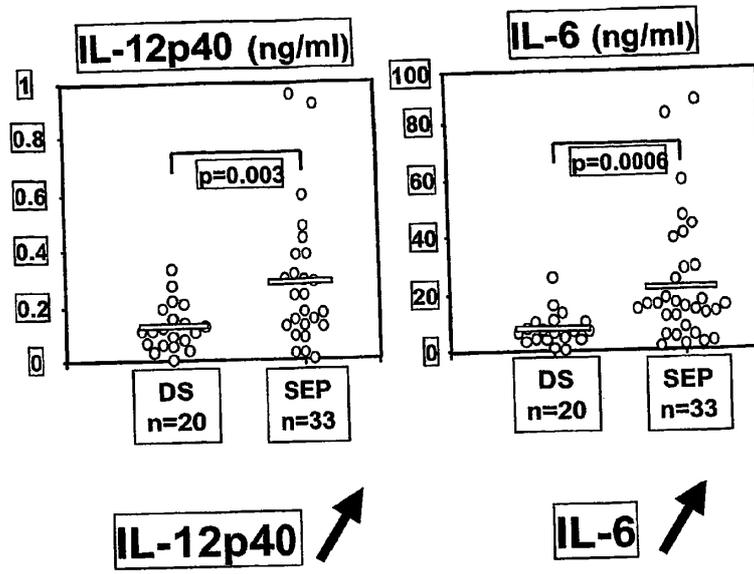


Fig. 11

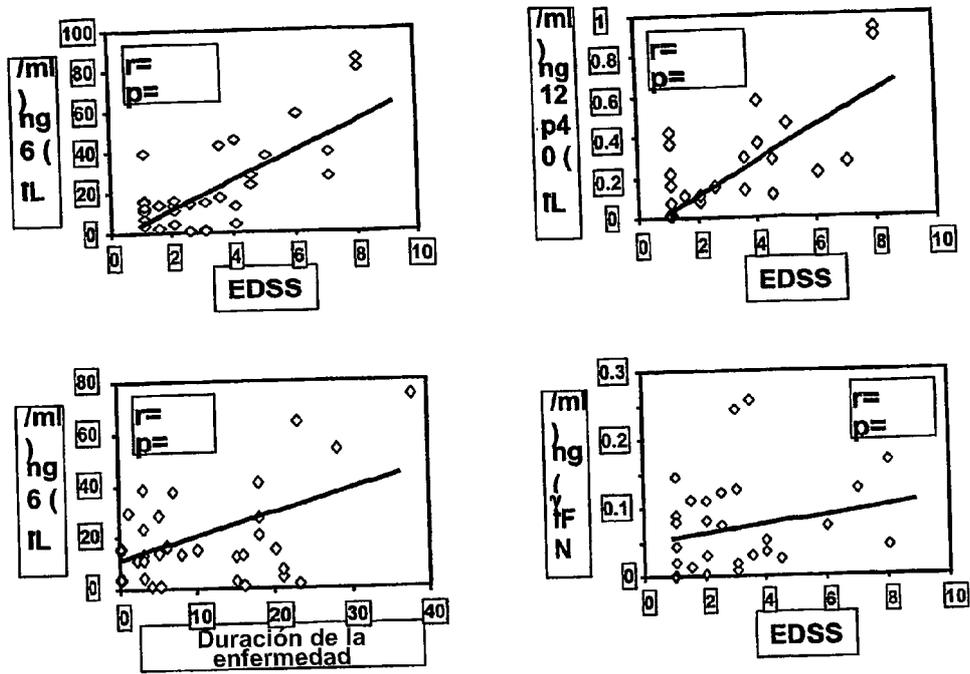


Fig. 12

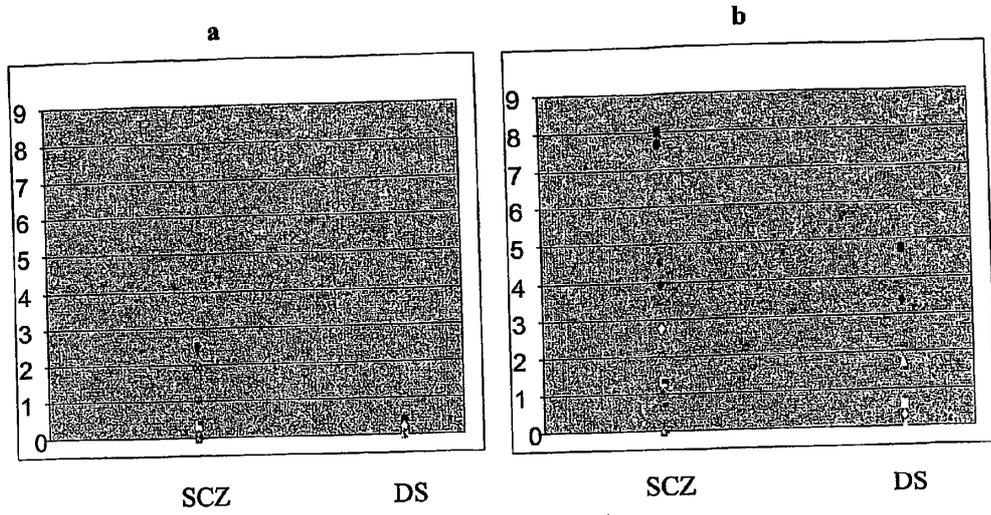


Fig. 13

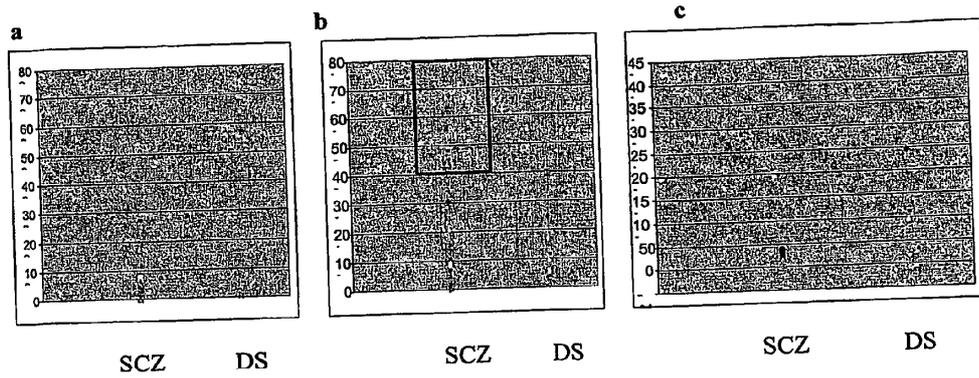


Fig. 14

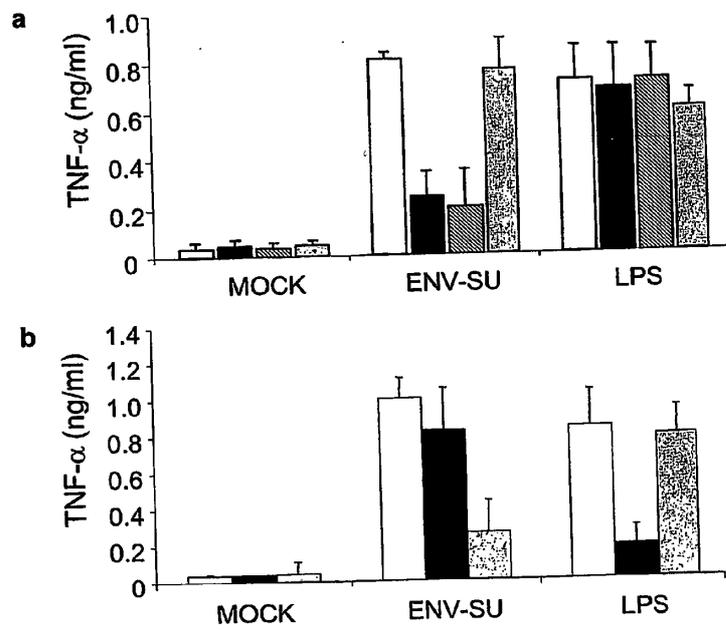


Fig. 15A-B

C

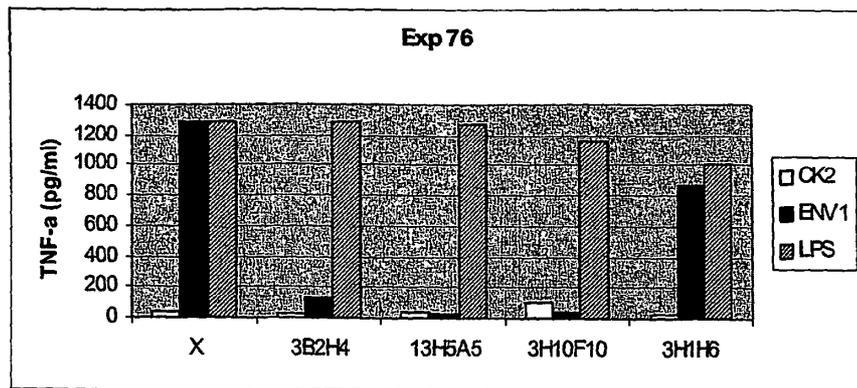


Fig. 15C

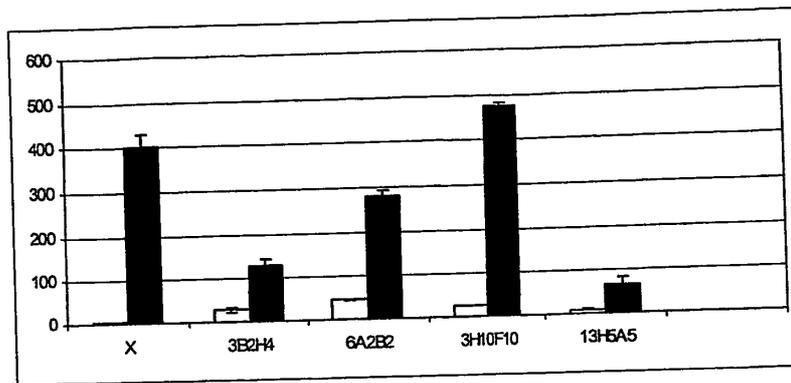


Fig. 15D

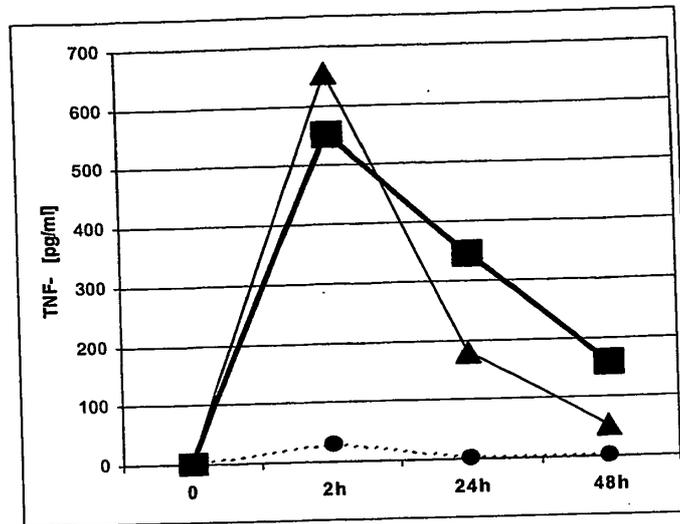


Fig. 16

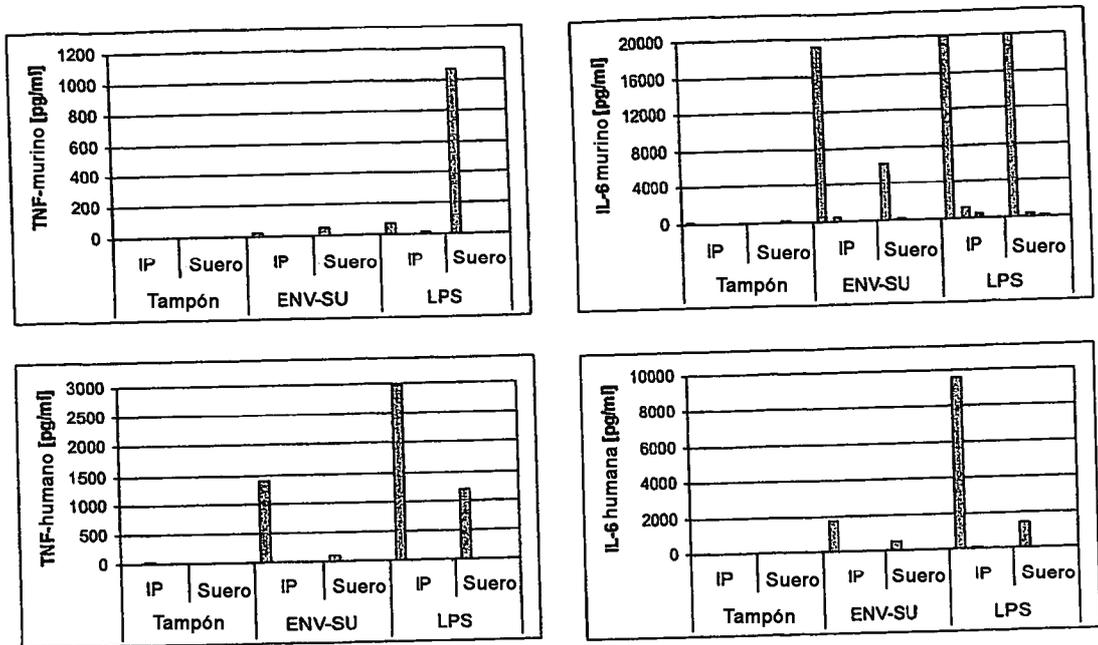


Fig. 17

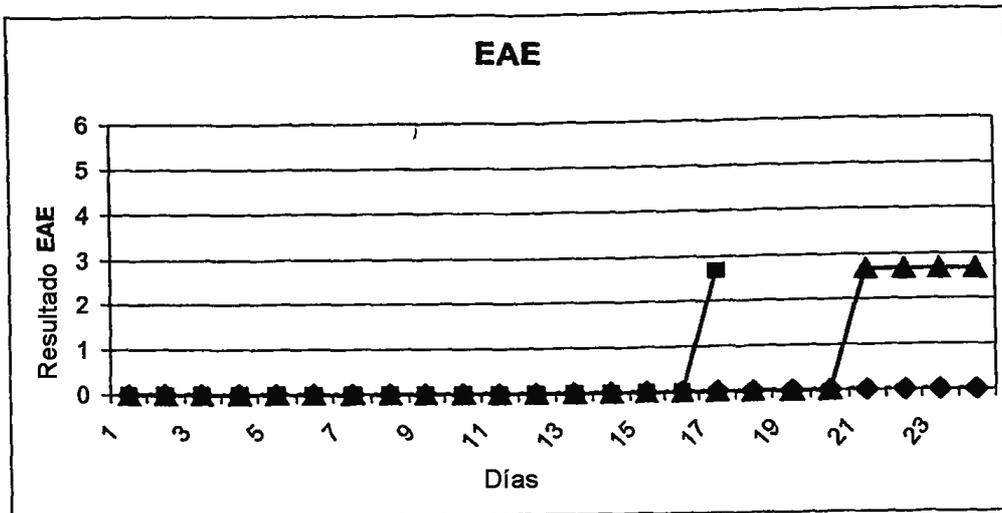


Fig. 18

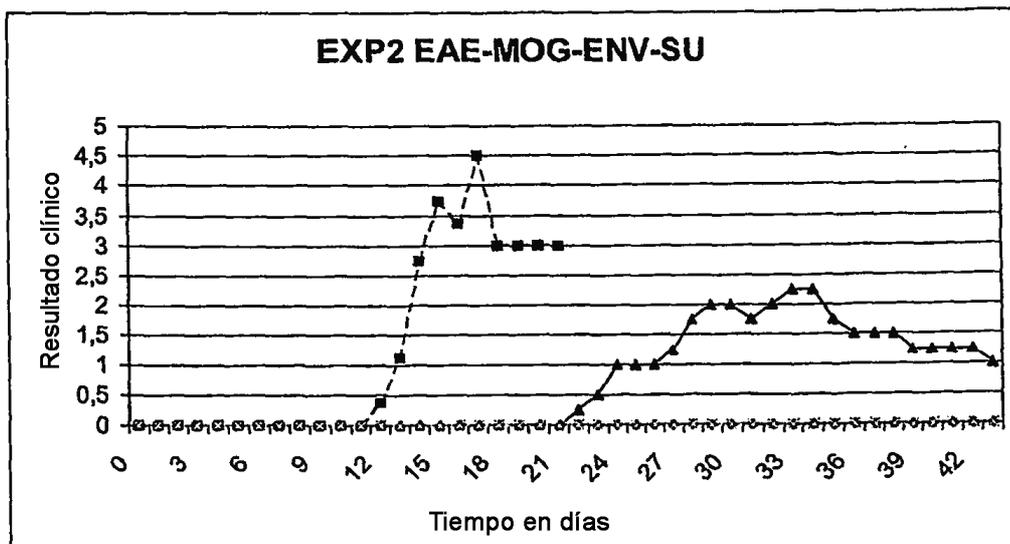


Fig. 19

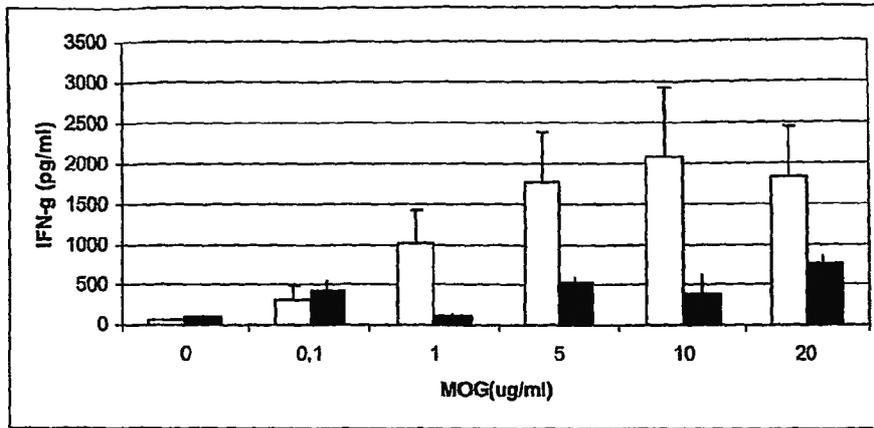


Fig. 20

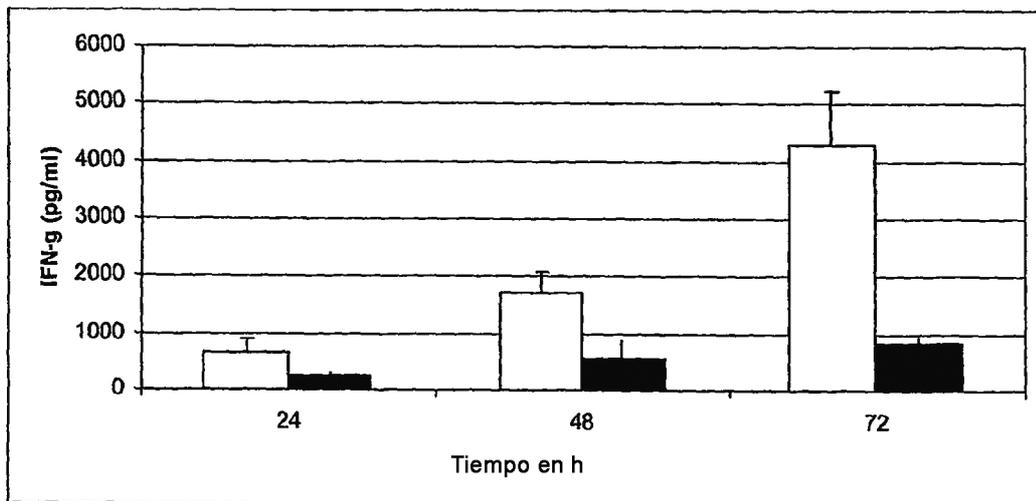


Fig. 21

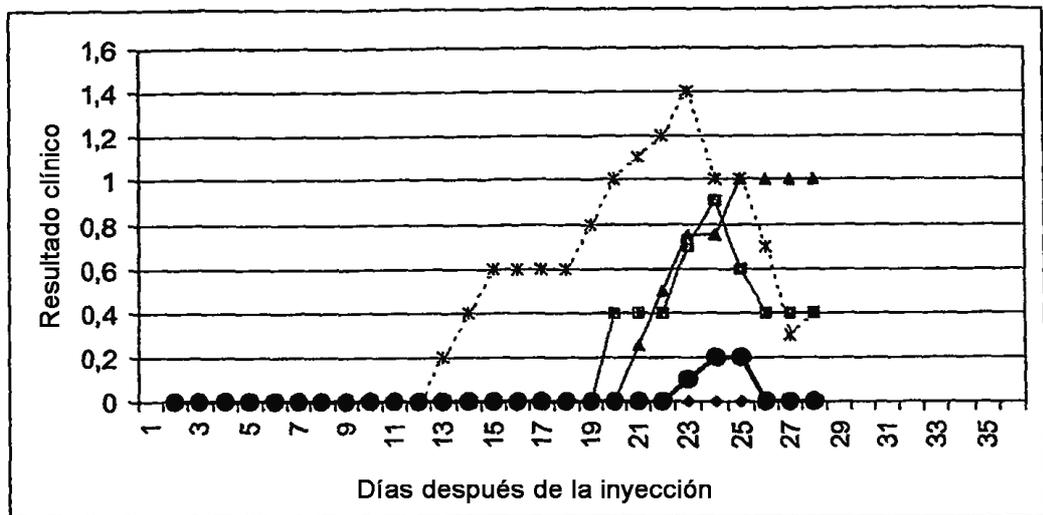


Fig. 22

M A L P Y B ; P L F T V L L P ; F T L T A P P P C ; C ; T S
M A L P Y B ; P L F T V L L P ; F A L T A P P P C ; C ; T S

S S P Y Q E F L W R ; Q ; P G N I D A P S Y R S L S K C T ; P
S S P Y Q E F L W R ; R ; P G N I D A P S Y R S L S K C T ; P

T F T A H T H M P R N C Y H S A T L C M H A N T H Y W T G K
T F T A H T H M P R N C Y H S A T L C M H A N T H Y W T G K

M I N P S C P G G L G ; T V C W T Y F T Q T ; M S D G G G V
M I N P S C P G G L G ; T V C W T Y F T H T ; M S D G G G V

Q ; Q A R E K H V K E ; I S Q L T R ; H ; T ; S P Y K C L ; d
Q ; Q A R E K H V K E ; I S Q L T R ; H ; T ; S P Y K C L ; d

L S K L H E T L R F H T R L V S L F N T T L T ; L H E V S A
L S K L H E T L R F H T R L V S L F N T T L T ; L H E V S A

Q N F T N C W I C L P L N F R P Y V S I F V P E Q W N N F S
Q N F T N C W M C L P L H F R P Y I S I F V P E Q W N N F S

T E I N T T S V L V G P L V S N L E I T H T S N L T C V K F
T E I N T T S V L V G P L V S N L E I T H T S N L T C V K F

S N T ; y T T ; S Q C I R W Y T F P T Q I V C L F S G I F F
S N T ; d T T ; S Q C I R W Y T F P T R I V C L F S G I F F

V C G T S A Y R C L N G S S E S M C P L S F L V P F M T I Y
V C G T S A Y H C L N G S S E S M C F L S F L V P F M T I Y

T E Q D L Y ; y V I ; K P R N K R V P I L P F V I ; A G V L
T E Q D L Y ; h V V ; K P R N K R V P I L P F V I ; A G V L

G ; L G T G I G ; I T Y S T Q F Y V K L S Q E I N G D M E R
G ; L G T G I G ; I T Y S T Q F Y V K L S Q E I N G D M E R

V A D S E V T L Q D Q L N S L A A V Y L Q N R R A L D L L T
V T D S E V T L Q D Q L N S L A A V Y L Q N R R A L D L L T

A ; R G G T C L F L G E E ; C Y Y V N Q S ; I V T E K V K E
A ; R G G T C L F L G E E ; C Y Y V N Q S ; I V T E K V K E

I R D R I Q ; R A E E L R N T ; p W C L L S Q W M F W ; L P
I R D R I Q ; R A E E L Q N T ; c r W C L L S Q W M F W ; L P

F L G P L A A I I ; L L L F G P C I F N ; L V ; F V S S R I
F L G P L A A I I ; L L L F G P C I F N ; L V ; P V S S R I

E A V K ; - - - L Q M E P K M Q S ; T K I Y R ; P L D R P A
E A V K ; i q i v L Q M E P Q M Q S ; T K I Y R ; P L D R P A

s p ; S D V N D I ; k ; T P P E E I S A A Q P L L R ; p N S ; G
r l c S D V N D I ; c v T P P E E I S Y A Q P L L H ; s N S ; v G

S S
S S

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520

Fig. 23

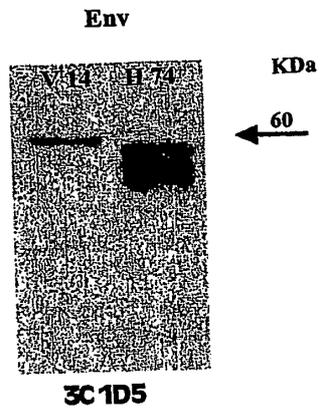


Fig. 24

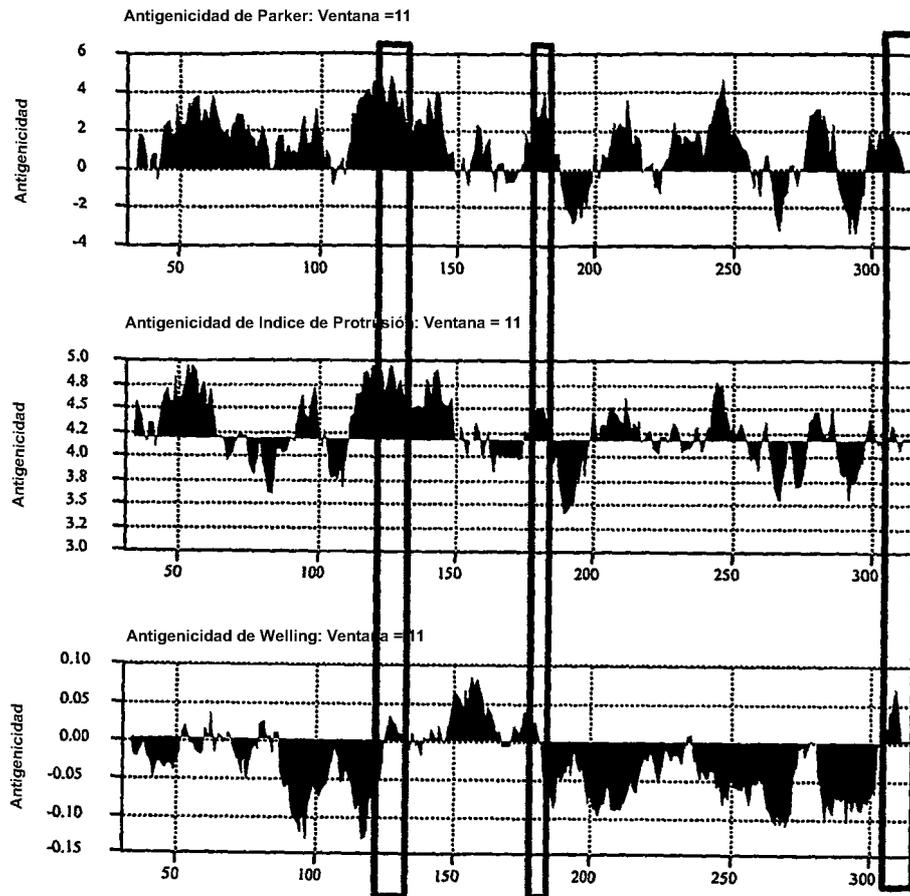


Fig. 25a

Fig. 25b

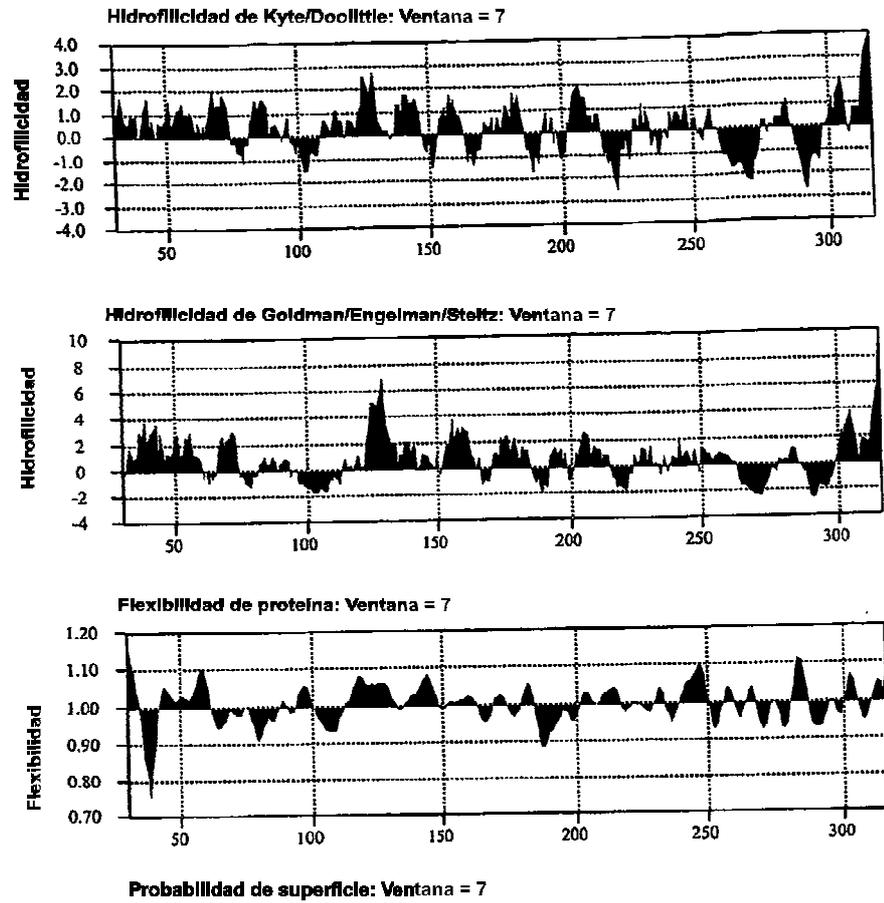


Fig. 25c :

