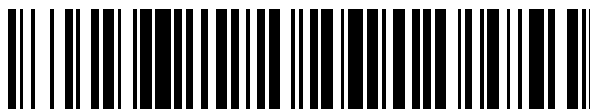


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 131**

51 Int. Cl.:

C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2015** **PCT/EP2015/061691**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015** **WO15181226**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2015** **E 15725326 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 3148582**

54 Título: **Fármaco antirretrovírico dirigido a retrovirus endógenos humanos**

30 Prioridad:

28.05.2014 EP 14305806

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.04.2020

73 Titular/es:

GENEURO SA (100.0%)
Chemin du Pré-Fleuri 3
1228 Plan-Les-Ouates, CH

72 Inventor/es:

PERRON, HERVÉ;
CURTIN, FRANÇOIS;
LANG, ALOIS;
FAUCARD, RAPHAËL;
MEDINA, JULIE;
MADEIRA, ALEXANDRA y
GEHIN, NADÈGE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 752 131 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

Fármaco antirretrovírico dirigido a retrovirus endógenos humanos

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un nuevo fármaco antirretrovírico dirigido a retrovirus endógenos humanos.

Estado de la técnica

10 Los retrovirus endógenos humanos (HERV, de sus siglas en inglés) son familias multicopia complejas y heterogéneas de elementos genéticos que son restos de infecciones retrovíricas ancestrales que ingresaron al genoma de determinadas especies a través de inserciones dentro de las células de la línea germinal. En total, los elementos de HERV representan aproximadamente un 8 % del genoma humano y, cuando los elementos de HERV han retenido la actividad transcripcional, rara vez causan una expresión completa del genoma retroviroico y esto apenas se espera que surja de copias províricas completamente funcionales.

El elemento de retrovirus asociado a esclerosis múltiple (MSRV, de sus siglas en inglés), que es miembro de la familia de los retrovirus endógenos humanos tipo W (HERV-W), se aisló por primera vez de las células de pacientes que padecen esclerosis múltiple. El MSRV normalmente está latente en el genoma de los individuos, pero cuando se desencadena mediante cofactores, como determinados virus comunes, se puede reactivar y puede expresar además una proteína de envoltura de la familia HERV-W. Los inventores investigaron previamente este mecanismo y revelaron que es un importante factor desencadenante y agravante en el desarrollo y la progresión de diversas enfermedades como la esclerosis múltiple (MS, de sus siglas en inglés), esquizofrenia (SZ, de sus siglas en inglés), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS de sus siglas en inglés), con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CI-DP, de sus siglas en inglés), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2.

A pesar de la posible expresión de todos los genes retrovíricos estructurales de HERV, es decir, de la matriz que codifica el gen gag, la poliproteína precursora de la cápside y la nucleocápside, junto con el gen pol que codifica enzimas retrovíricas, incluida la poliproteína precursora de la proteasa, la transcriptasa inversa y la integrasa, y junto con el gen env que codifica la proteína precursora de envoltura del mismo HERV, hasta la fecha no se pudo encontrar ninguna copia retroviroica infecciosa de los HERV.

Por otro lado, a diferencia de los retrovirus infecciosos exógenos, los HERV están presentes en el ADN de todas las células de cada individuo humano y, por lo tanto, las moléculas terapéuticas utilizadas clásicamente para tratar los retrovirus humanos no pueden eliminar el provirus correspondiente dentro de una subpoblación de células de reservorio. Muchas restricciones celulares y genéticas sobre estos elementos endógenos también los hacen controlados mediante mecanismos moleculares no retrovíricos, escapando así de las rutas retrovíricas clásicas. Entre estos diversos mecanismos, se conoce una implicación del silenciamiento génico, del control génico mediante el promotor/potenciador celular o de la recombinación genética entre secuencias de HERV y genes celulares. Dichas características no se esperan con los retrovirus exógenos clásicos y, por lo tanto, no son accesibles para la terapia antirretrovírica actualmente existente.

En dichas condiciones, los tratamientos de retrovirus exógenos clásicos no pueden esperar controlar completamente la expresión de HERV patógenos y, por consiguiente, tener una eficacia terapéutica óptima, si la hubiera, en enfermedades asociadas a HERV. Anteriormente, la solicitud internacional WO2014/053489A1 describía un anticuerpo anti-HERV-W env denominado GNbAC1 y definido mediante las CDR con SEQ ID NO: 1-6, para el tratamiento de enfermedades asociadas a HERV-W, incluida la esclerosis múltiple. Además, la solicitud internacional WO2010/003977A1 también describía un anticuerpo anti-HERV-W env denominado GNbAC1 y definido mediante las CDR con SEQ ID NO: 1-6, para el tratamiento de enfermedades asociadas a MSRV, incluida la esclerosis múltiple, esquizofrenia, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica o diabetes tipo I.

Por lo tanto, durante mucho tiempo se sintió la necesidad insatisfecha de una nueva estrategia terapéutica antirretrovírica dirigida a los virus HERV.

Objeto de la invención

El ámbito de la presente invención está definido por las reivindicaciones, y cualquier información que no se encuentre en las reivindicaciones se proporciona solo a efectos informativos. Los inventores han descubierto sorprendentemente que un efecto anti-HERV inesperado dirigido a elementos endógenos de la familia HERV-W puede reducir e inhibir la expresión de HERV-W. Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo para su uso como un fármaco antirretrovírico dirigido a un virus que pertenece a un retrovirus endógeno humano (HERV), en donde dicho anticuerpo está dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env). Preferentemente, dicho anticuerpo, fragmento o derivado es para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada a HERV-W. Más preferentemente, dicho anticuerpo es para prevenir y/o tratar la esclerosis

múltiple (MS) o la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP). Más preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado, en donde la cadena pesada (HC, de sus siglas en inglés) tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9 y la cadena ligera (LC, de sus siglas en inglés) tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10.

La presente invención se refiere a una preparación combinada o una composición que comprende, preferentemente que consiste en, un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env), un fragmento o un derivado del mismo y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral para su uso como un fármaco antirretrovírico dirigido a un virus que pertenece a retrovirus endógenos humanos (HERV), en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env), un fragmento o un derivado del mismo y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en un método para tratar una enfermedad asociada a HERV-W, preferentemente una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

La presente divulgación también se refiere a un kit que comprende al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11 a 28.

La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env), un fragmento o un derivado del mismo para su uso como un fármaco antirretrovírico dirigido a un virus que pertenece a retrovirus endógenos humanos (HERV), preferentemente a la familia HERV-W, más preferentemente a MSRV, en un paciente que padece una enfermedad asociada a HERV-W, en donde dicho paciente se identifica mediante un método que comprende una etapa i) de detección y/o cuantificación de HERV-W en una muestra biológica.

Descripción detallada de la invención

Definición

Como se usa en el presente documento, las expresiones "**retrovirus endógeno humano**" y "HERV", se refieren a los retrovirus endógenos humanos que comprenden el virus que pertenece a la familia de los retrovirus endógenos de tipo W, generalmente denominado "HERV-W".

"**HERV-W**" es una familia de retrovirus endógenos humanos que se deshizo en el genoma humano a partir del descubrimiento inicial del "Retrovirus asociado a la esclerosis múltiple", MSRV, un retrovirus humano aislado por primera vez de pacientes con esclerosis múltiple. Por lo tanto, cuando los estudios mencionan "LM7" (primer aislado descrito de MS), "retrovirus de MS", "MSRV", "Sincitina", "HERV-W 7q", "ERVW-E1", "ERVW-E2", "copias HERV-W del cromosoma X" o "HERV-W", todas designan elementos de HERV-W.

Como se usa en el presente documento, el término "**MSRV**" se refiere a un retrovirus endógeno específico que es un miembro de la familia HERV-W. En el contexto de la presente invención, las expresiones "**HERV-W**" y "**MSRV**" designan ambas elementos HERV-W. Específicamente, las expresiones "**HERV-W Env**" y "**MSRV-Env**" se refieren ambas a las mismas proteínas de envoltura. Normalmente, pocas variaciones eventuales en la secuencia de aminoácidos no evitan la unión de anticuerpos anti-Env específicos para su uso terapéutico, en particular, un anticuerpo que tiene una cadena pesada (HC) con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera (LC) con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**enfermedad asociada a HERV-W**" se refiere a una afección patológica asociada con la expresión de HERV-W, preferentemente de la proteína de envoltura de HERV-W. Normalmente, dicha enfermedad asociada a HERV-W es una enfermedad inflamatoria crónica. Como se usa en el presente documento, la expresión "**enfermedad inflamatoria crónica**" se refiere a cualquier enfermedad en la que la inflamación persistente o recurrente es impulsada por la inmunidad innata y/o por la inmunidad adaptativa implicada en lesiones tisulares y/o puede detectarse localmente o sistémicamente a partir de una sobreexpresión de moléculas proinflamatorias.

Preferentemente, dicha enfermedad asociada a HERV-W se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer,

pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2. Más preferentemente, dicha enfermedad asociada a HERV-W se selecciona del grupo que consiste en Esclerosis Múltiple (MS) y Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (CIPD), que son enfermedades desmielinizantes.

5 Como se usa en el presente documento, el término **"tratar"** o **"tratamiento"**, como se usa en el presente documento, significan revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección, al que se aplica dicho término, o revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir uno o más síntomas del trastorno o afección, al que se aplica dicho término.

10 Como se usa en el presente documento, el término **"prevención"** se refiere a prevenir que la enfermedad o afección ocurra en un sujeto que aún no ha presentado síntomas clínicos, lesiones típicas o disfunciones fisiológicas que permitirían su diagnóstico clínico.

15 Como se usa en el presente documento, **"anticuerpo"** o **"inmunoglobulina"** tienen el mismo significado, y se usarán igualmente en la presente invención. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Como tal, el término "anticuerpo" abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpos, así como derivados de anticuerpos.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión **"fragmento de anticuerpo"** se refiere a una porción de dicho anticuerpo que imita la región hipervariable, tal como una CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3). Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención retienen la afinidad y especificidad de unión de dicho anticuerpo. Dichos fragmentos son equivalentes funcionales de dicho anticuerpo y se unen sustancialmente al mismo epítipo que dicho anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, cadena pesada, cadena ligera, VL, VH, Fv, Fab, Fab', F(ab)2, y F(ab')2.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión **"derivado de anticuerpo"** se refiere a un fragmento del anticuerpo de la invención, que incluye preferentemente al menos una CDR de dicho anticuerpo, preferentemente al menos una CDR3 de dicho anticuerpo, fusionada a al menos una secuencia diferente de la secuencia natural (por ejemplo, una secuencia enlazadora de otra especie...), teniendo dicho derivado afinidad y especificidad de unión a HERV-W Env comparable a la del anticuerpo de la invención. Los derivados de acuerdo con la presente invención retienen la afinidad y especificidad de unión de dicho anticuerpo. Dichos derivados son equivalentes funcionales de dicho anticuerpo y se unen sustancialmente al mismo epítipo que dicho anticuerpo. Los ejemplos de derivados de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, scFv, (scFv)2 y diacuerpos.

30 En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas (HC) están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera (LC) mediante un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (1) y kappa (k). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos.

35 Normalmente, la cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL, de sus siglas en inglés) y un dominio constante (CL, de sus siglas en inglés). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH, de sus siglas en inglés) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH, de sus siglas en inglés). Las regiones variables de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el sitio de unión específico del epítipo antigénico. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como asociación de cadena de anticuerpos, secreción, movilidad transplacentaria, unión de complemento y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consta de las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de unión del anticuerpo y el epítipo antigénico. Los sitios de unión a anticuerpos están formados por restos que provienen principalmente de las regiones determinantes de la hipervariabilidad o complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés). Ocasionalmente, los restos de regiones no hipervariables o marco (FR, de sus siglas en inglés) influyen en la estructura general del dominio y, por lo tanto, en el sitio de unión. Regiones determinantes de complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina natural. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR procedente de cada región V de cadena pesada y ligera. Las Regiones Marco (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión **"anticuerpo quimérico"** se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo de cualquier especie, preferentemente de ratón, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

De acuerdo con la invención, la expresión "**anticuerpo humanizado**" se refiere a un anticuerpo que tiene un marco de región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano pero retiene las CDR de un anticuerpo de cualquier especie, preferentemente de ratón.

5 El término "**Fab**" denota un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de la IgG con una proteasa, papaína, se unen a través de un enlace disulfuro.

10 Como se usa en el presente documento, el término "**F(ab')₂**" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión al antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos mediante el tratamiento de la IgG con una proteasa, pepsina.

15 Como se usa en el presente documento, el término "**Fab**" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene mediante el corte de un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.

20 Las expresiones "Un Fv de cadena sencilla" o "**scFv**" se refieren a un polipéptido que es un heterodímero VH::VL unido covalentemente, y generalmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL unidos mediante un enlazador de codificación peptídico. "**dsFv**" es un heterodímero VH::VL estabilizado mediante un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de scFvs monovalentes, o pueden generarse por acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente.

25 El término "**diacuerpos**" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se obligan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "**anticuerpo de la invención**" se refiere a un anticuerpo dirigido contra, es decir, que se une específicamente a, la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env), preferentemente contra la proteína de envoltura de HERV-W de la familia de retrovirus endógeno humano tipo W (HERV-W), más preferentemente contra la proteína de envoltura de MSRV, más preferentemente contra el dominio extracelular de la proteína de envoltura de MSRV. Preferentemente, el anticuerpo de la invención comprende todas las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 a 6.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "**muestra biológica**", como se usa en este documento, se refiere a cualquier muestra biológica obtenida con el propósito de realizar una evaluación *in vitro*. En la presente invención, la muestra o muestra del paciente puede comprender cualquier fluido corporal o lesiones y tejido específicos de la enfermedad. Ejemplos de fluidos corporales incluyen sangre, suero, plasma, líquido de aspirado de pezón, orina, saliva, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo (CSF, de sus siglas en inglés). Los ejemplos de lesiones y tejidos específicos de la enfermedad incluyen placa cerebral de MS, biopsias nerviosas CIDP o biopsias de páncreas de diabetes.

Anticuerpo para su uso como fármaco antirretrovírico

50 La expresión patógena de HERV-W se produce en determinados individuos cuando se asocia con afecciones patológicas, en particular, cuando se expresan elementos asociados a la esclerosis múltiple (MSRV) de esta familia HERV-W. Se ha demostrado que esto implica a la proteína de envoltura como el único agente patógeno entre las proteínas codificadas por HERV-W cuando se expone al sistema inmunitario o a las células neurogliales a pesar de la evidencia de antígenos codificados por gag de HERV-W en pacientes.

55 Hasta la fecha, la estrategia terapéutica ha consistido en dirigir a la proteína de envoltura de HERV-W con un anticuerpo neutralizante humanizado, para prevenir e inhibir sus efectos inmunoinflamatorios y neuropatogénos en las enfermedades humanas asociadas a HERV-W. Por consiguiente, este enfoque terapéutico se dirige cadena arriba de la cascada inflamatoria y de los efectos citotóxicos dirigidos, en particular, cadena arriba de la cascada desmielinizante inflamatoria con bloqueo de remielinización en el origen de las lesiones con potencial de curación deteriorado en el sistema nervioso central (CNS, de sus siglas en inglés) de la MS.

60 Los inventores han evaluado un anticuerpo IgG4 humanizado que se une selectivamente al dominio extracelular de la proteína de envoltura de MSRV, denominado en el presente documento "GNbAC1" por su seguridad y farmacocinética en voluntarios sanos en un ensayo clínico de fase I. Este anticuerpo también se ha evaluado en pacientes con MS durante un año, con infusiones repetidas de anticuerpo GNbAC1 cada 4 semanas a 6 mg/kg o 2 mg/kg en dos cohortes paralelas. En el último ensayo clínico de fase IIa en pacientes con MS, los inventores

obtuvieron muestras de sangre de pacientes antes y durante el estudio en el que se analizaron los biomarcadores de HERV-W por primera vez después de 6 meses de tratamiento mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) para estudiar la expresión específica de ARNm de HERV-W env y pol junto con el tratamiento con GNBAC1.

- 5 Los resultados así obtenidos han revelado un efecto completamente inesperado y desconocido de la neutralización de la proteína HERV-W Env *in vivo* por el anticuerpo GNBAC1.

De hecho, los inventores descubrieron que los pacientes humanos tratados con este anticuerpo han revelado un efecto inhibitorio sobre la expresión del genoma retroviral de HERV-W, que no se limita al gen env que expresa la proteína de envoltura como diana específica de GNBAC1. De hecho, los resultados de los inventores indican indiscutiblemente que tanto los niveles de ARNm env (que codifica la proteína de envoltura de HERV-W) como los de ARNm pol (que codifican enzimas de HERV-W, incluida la transcriptasa inversa) mostraron una disminución paralela y progresiva después de tres y seis meses de tratamiento, en comparación con los niveles medidos antes del tratamiento en los mismos pacientes.

15 Por lo tanto, se ha observado un efecto antirretroviral significativo sobre la expresión de HERV-W después de 6 meses de tratamiento con GNBAC1, y afectó a las expresiones de los genes env y pol en paralelo. Como no se espera que la expresión de ARN retroviral de HERV-W esté regulada por la expresión de la proteína de envoltura de HERV-W, tanto más ARNm del gen pol que codifica proteínas antigénicas totalmente no relacionadas, los inventores concluyen que un efecto desconocido de HERV-W Env (o MSRV-Env) produce un efecto positivo en la regulación genética de HERV-W en relación con su expresión asociada a la enfermedad, como se observa en pacientes con MS, y ha sido antagonizado mediante GNBAC1 en pacientes del ensayo clínico de fase IIa realizado por los inventores (véase el Ejemplo 1). Este efecto no está en absoluto relacionado con los efectos fisiopatológicos de HERV-W Env conocidos en los sistemas inmunitario y neuroglial.

25 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo para su uso como un fármaco antirretroviral dirigido a un virus que pertenece a retrovirus endógenos humanos (HERV), en donde dicho anticuerpo, fragmento o derivado está dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env).

30 Como se usa en el presente documento, la expresión **"fármaco antirretroviral dirigido a virus que pertenece a retrovirus endógenos humanos (HERV)"** se refiere a un anticuerpo, un fragmento o un derivado del mismo capaz de inhibir la expresión y/o la replicación de un virus que pertenece a retrovirus endógenos humanos (HERV). Más específicamente, dicha expresión se refiere a un anticuerpo capaz de:

- 35 - suprimir o inhibir total o parcialmente la replicación de un virus perteneciente al HERV, preferentemente perteneciente a la familia HERV-W. Normalmente, dicha supresión o inhibición de la replicación es global y completa; o
- 40 - suprimir o inhibir total o parcialmente la expresión de un virus perteneciente a retrovirus endógenos humanos (HERV), preferentemente un virus que pertenece a la familia de retrovirus endógenos humanos tipo W (HERV-W) o la expresión de la proteína de envoltura de dicho virus.

45 Preferentemente, dicho virus pertenece a la familia de retrovirus endógeno humano tipo W (HERV-W). Más preferentemente, dicho virus es MSRV. En particular, el anticuerpo se dirige contra la proteína de envoltura de MSRV.

Más particularmente, el fármaco antirretroviral, de acuerdo con la presente divulgación, suprime o inhibe total o parcialmente la expresión de las proteínas codificadas por *env* y/o *pol* de un virus que pertenece al HERV, preferentemente, un virus que pertenece al HERV-W.

50 Los inventores han demostrado que dirigir la proteína de envoltura específica de MSRV conduce al sorprendente efecto de inhibir o suprimir la expresión del virus. Como se ha mencionado previamente, el MSRV está implicado en el inicio y en el desarrollo de varias enfermedades. Por consiguiente, el anticuerpo de la presente divulgación es muy prometedor para su uso para tratar una enfermedad asociada a HERV-W, preferentemente una patología asociada con la expresión de la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env).

60 Preferentemente, dicha enfermedad asociada a HERV-W se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2.

Más preferentemente, dicha enfermedad asociada a HERV-W se selecciona del grupo que consiste en Esclerosis Múltiple (MS) y Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (CIDP).

65 La presente divulgación también se refiere a un agente para su uso para prevenir y/o tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar

o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2, en donde dicho agente consiste en un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o un fragmento o derivado del mismo. En este caso específico, el anticuerpo previene la expresión de HERV-W.

En particular, el anticuerpo, fragmento o derivado de la presente divulgación comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

En particular, el anticuerpo, fragmento o derivado de la presente divulgación comprende:

- una cadena ligera en donde el dominio variable comprende cada una de las 3 CDR como se representa en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3; y
- una cadena pesada en donde el dominio variable comprende cada una de las 3 CDR como se representa en SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) mencionadas anteriormente se describen en la Tabla 1:

Tabla 1: Dominios CDR de un anticuerpo de acuerdo con la invención

Dominios	SEQ ID NO:	Secuencia
CDR-L1	1	Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
CDR-L2	2	Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
CDR-L3	3	Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr
CDR-H1	4	Asp Tyr Glu Met His
CDR-H2	5	Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly
CDR-H3	6	Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr

En particular, el anticuerpo, fragmento o derivado de la divulgación comprende:

- una región variable de cadena ligera (VL) como se muestra en la SEQ ID NO: 7; y
- una región variable de cadena pesada (VH) como se muestra en la SEQ ID NO: 8.

Las regiones variables ligeras y pesadas mencionadas anteriormente se describen en la Tabla 2:

Tabla 2: Regiones variables ligeras y pesadas de un anticuerpo de acuerdo con la invención

Dominios	SEQ ID NO:	Secuencia
VL	7	Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
VH	8	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

En particular, el anticuerpo, fragmento o derivado de la divulgación se selecciona del grupo que consiste en un Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, un diacuerpo y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Más particularmente, el anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales de la divulgación son monovalentes, bivalentes, multivalentes, monoespecíficos, biespecíficos o multispecíficos. En

otro caso, el anticuerpo dirigido contra HERV-W Env es un fragmento de unión o un conjugado. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden conjugarse con un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico o una enzima activadora de profármacos.

- 5 También puede ser deseable modificar el anticuerpo de la divulgación con respecto a las funciones efectoras, por ejemplo, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC, de sus siglas en inglés) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, de sus siglas en inglés) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, pueden introducirse uno o varios restos cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la
- 10 formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por el complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Caron PC. Et al. 1992; y Shopes B. 1992).

15 Otro tipo de modificación de aminoácidos del anticuerpo de la divulgación puede ser útil para alterar el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por "alteración" se entiende la delección de una o más fracciones de carbohidrato encontradas en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos está normalmente ligada a N. "Ligada a N" se refiere a la unión de la fracción de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de

20 reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza sistemáticamente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados al átomo de N).

25 En otro caso, el anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo monoclonal humanizado, más preferentemente un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4.

30 Dicho anticuerpo humanizado puede producirse mediante la obtención de secuencias de ácido nucleico que codifican para el dominio de CDR mediante su inserción en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano; y una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y que expresa el vector de expresión mediante su introducción en una célula animal. El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existen

35 en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo en tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpos humanizados, la facilidad de introducción en las células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L de anticuerpos en las células animales, es más preferido un vector de expresión de anticuerpos humanizados de tipo en tándem. Los ejemplos del vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo en tándem incluyen pKANTEX93, pEE18 y similares. Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en ADN recombinante

40 convencional y técnicas de transfección génica son bien conocidos en la materia. Los anticuerpos se pueden humanizar usando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR, remodelación o acondicionamiento de la superficie y reorganización de cadenas. También se conoce la tecnología general de ADN recombinante para la preparación de dichos anticuerpos.

45 Por lo tanto, en particular, la divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende:

- una cadena ligera en donde el dominio variable comprende cada una de las 3 CDR como se representa en SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3; y
- 50 - una cadena pesada en donde el dominio variable comprende cada una de las 3 CDR como se representa en SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

En particular, la cadena pesada (HC) de dicho anticuerpo humanizado tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEC ID NO: 9 y la cadena ligera (LC) de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos

55 establecida en la SEC ID NO: 10. Este anticuerpo específico se denomina en el presente documento "GNbAC1". Las cadenas pesadas y ligeras mencionadas anteriormente se desvelan en la Tabla 3:

Tabla 3: HC y LC del anticuerpo humanizado

Dominios	SEQ ID NO:	Secuencia
HC	SEQ ID NO: 9	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ser Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala LeuHis Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
LC	SEQ ID NO: 10	Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

Composición para su uso como fármaco antirretrovírico

- 5 Los inventores investigaron además el efecto antirretrovírico recientemente revelado del anticuerpo de la divulgación. Para este fin, se evaluó su efecto *in vitro* en cultivos celulares que expresan proteínas codificadas por gag, pol y env de HERV-W, según lo detectado por anticuerpos específicos en el análisis de transferencia Western.
- 10 Los inventores han confirmado que la expresión de la proteína pol correspondiente a la transcriptasa inversa (RT, de sus siglas en inglés) de HERV-W parecía menos importante en las células cultivadas en presencia de GNbAC1, además de la disminución de los niveles de ARN pol en pacientes tratados con GNbAC1. Por otro lado, se sabe que la RT amplifica la expresión retroviral mediante la generación de copias adicionales de ADN retroviral a partir de ARN expresado. Estas copias de ADN retroviral recién producidas pueden expresar el ARN correspondiente, amplificando así la expresión global del elemento retroviral mediante la multiplicación de las copias de expresión a
- 15 través de un producto de esta expresión en sí, tal como la RT del ARN pol.

Por consiguiente, tuvieron la idea de que la combinación de GNBAC1 y un inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral como la azidotimidina (AZT) podría producir mejores efectos inhibidores en la expresión de HERV-W, en particular en su expresión de RT como se ejemplifica actualmente.

5 Esto se estudió además y, sorprendentemente, esta combinación de un anticuerpo dirigido contra HERV-W Env y de un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral, abolió la expresión de la proteína HERV-W RT en estas células productivas.

10 En cultivos paralelos y simultáneos, la detección positiva de HERV-W RT mediante transferencia Western en células no tratadas y la reducción leve o parcial en células tratadas con GNBAC1 o AZT solo, confirmaron la especificidad y la importancia de esta observación: en las mismas condiciones, la combinación de la proteína HERV-W Env neutralizante de anticuerpos GNBAC1 y AZT había abolido la detección de esta proteína HERV-W RT.

15 Por lo tanto, la invención se refiere a una preparación combinada o una composición que comprende:

- un anticuerpo, un fragmento o un derivado de acuerdo con la invención; y
 - un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral, para su uso como fármaco antirretroviral dirigido a un virus perteneciente a los retrovirus endógenos humanos (HERV), en donde dicho anticuerpo o fragmento
- 20 comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

25 Preferentemente, dicho fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral se selecciona del grupo que consiste en azidotimidina, entecavir, lamivudina, adefovir, sofosbuvir, didanosina, tenofovir, abacavir, lamivudina, estavudina, emtricitabina, zalcitabina, telbivudina y didanosina. Más preferentemente, dicho fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral es azidotimidina (AZT). Todos los datos técnicos divulgados anteriormente son aplicables en el presente documento.

30 La composición de la invención proporciona una perspectiva inesperada y novedosa para la intervención terapéutica en la expresión patológica de HERV-W. El tratamiento con una preparación combinada o una combinación que comprende:

- un anticuerpo dirigido contra HERV-W Env, tal como GNBAC1; y
- 35 - una molécula dirigida a la transcriptasa inversa en sí misma y/o su actividad, tal como AZT, demostró ser muy útil para inhibir la expresión de HERV-W RT en enfermedades asociadas con HERV-W.

Por lo tanto, la invención también se refiere a una preparación combinada o una composición que comprende:

- 40 - un anticuerpo dirigido contra HERV-W Env, un fragmento o un derivado como se desvela anteriormente; y
- un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral,

para su uso para prevenir y/o tratar una enfermedad asociada a HERV-W, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

La invención también se refiere a una preparación combinada o una composición que comprende:

- 50 - un anticuerpo dirigido contra HERV-W Env, un fragmento o un derivado como se describe anteriormente; y
- un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral,

para su uso para prevenir y/o tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2. Más preferentemente, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en Esclerosis Múltiple (MS) y Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (CIDP), en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

Todos los datos técnicos divulgados anteriormente son aplicables en el presente documento.

65 **En otro aspecto**, la invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o un fragmento o derivado del mismo, y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral, preferentemente azidotimidina como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en

un método para tratar una enfermedad asociada a HERV-W, preferentemente, una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

Todos los datos técnicos divulgados anteriormente son aplicables en el presente documento.

Kit de acuerdo con la invención

La expresión de estos elementos de HERV-W en pacientes con enfermedad y/o su detección en lesiones y tejido específicos de la enfermedad identifica y define la categoría general de síndromes o enfermedades asociadas a HERV-W. También refleja la actividad biológica de HERV-W durante el transcurso del tiempo de la evolución de la enfermedad y durante sus tratamientos.

Por lo tanto, la detección de HERV-W con sensibilidad mejorada, con especificidad de enfermedad particular o con asociación particular con características clínicas en pacientes con síndromes o enfermedades asociadas con HERV-W, constituye un valor importante para la identificación y estratificación diagnóstica, así como para el seguimiento y la monitorización terapéutica de los pacientes. De un panel de cebadores, sondas y protocolos de PCR, los inventores seleccionaron y desarrollaron un kit de cebadores y sondas, que resultó útil para detectar la presencia y/o medir el nivel de expresión de HERV en pacientes.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un kit que comprende al menos uno, preferentemente, al menos dos, preferentemente, al menos tres, preferentemente, al menos cuatro, preferentemente, al menos cinco, preferentemente, al menos seis, preferentemente, al menos siete, preferentemente, al menos ocho, preferentemente, al menos nueve, preferentemente, al menos diez oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11 a 28.

Preferentemente, dicho kit comprende al menos la SEQ ID NO: 17 y/o 18 o la SEQ ID NO: 19 y 20.

Alternativamente, dicho kit comprende:

- SEQ ID NO: 19, 20, 23, 24 y 25; o
- SEQ ID NO: 17, 18, 23, 24 y 25; o
- SEQ ID NO: 19, 20, 14, 15, 16, 23, 24 y 25; o
- SEQ ID NO: 17, 18, 14, 15, 16, 23, 24 y 25.

Más preferentemente, el kit de la presente divulgación comprende todos los oligonucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 11 a 28. Normalmente, dicho kit está destinado a usarse para realizar una PCR o, más particularmente, un ensayo de PCR cuantitativa (qPCR). Por lo tanto, el kit, preferentemente, también comprende cebadores y/o sondas de genes celulares de referencia más apropiados para la cuantificación relativa de ARN o ADN y para diversas indicaciones.

Dicho kit, preferentemente, comprende además:

- SEQ ID NO: 26, 27 y 28; o
- Secuencias específicas para el gen GUSB; o
- Secuencias específicas para el gen RNAsa P; o
- Secuencias específicas para un gen celular de referencia para la cuantificación relativa por qPCR.

Dicho kit es útil para controlar la detección y/o la cuantificación de un virus y que pertenece a la familia de retrovirus endógenos humanos tipo W (HERV-W), que comprende MSRV pero también otros subtipos de HERV-W. Más específicamente, el kit de la divulgación es útil para detectar y/o cuantificar las secuencias que codifican para HERV-W Env como las que codifican para la poliproteína HERV-W pol, incluyendo RT. Normalmente, la detección y/o la cuantificación de HERV-W en un paciente abarca:

- (i) la detección y/o la cuantificación de ARN, ADN o antígenos HERV-W específicos, preferentemente detectados en fluidos corporales o en tejidos y lesiones específicos de enfermedades,
- (ii) la detección y/o la cuantificación de un número elevado de copias de ADN o ARN en células o tejidos de la sangre o de órganos con lesiones o disfunciones.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env), un fragmento o derivado del mismo para su uso como un fármaco antirretrovírico dirigido a un virus que pertenece a HERV, preferentemente a HERV-W, más preferentemente a

MSRV, en un paciente que padece una enfermedad asociada a HERV-W, en donde dicho paciente se identifica mediante un método que comprende una etapa i) de detección y/o cuantificación de HERV-W en una muestra biológica.

- 5 En este caso específico, el médico podría adaptar y optimizar la atención médica adecuada de un paciente que padece una enfermedad asociada a HERV-W. El monitoreo de la presencia y/o del nivel de expresión de HERV-W es altamente apropiado para la atención de seguimiento y la toma de decisiones clínicas. De hecho, el médico puede definir la terapia adecuada con una estrategia óptima para cada paciente.
- 10 Normalmente, la etapa i) de detección y/o cuantificación puede realizarse de acuerdo con las técnicas de rutina, bien conocidas por el experto en la materia. Normalmente, dicha etapa i) comprende poner en contacto una muestra biológica del paciente con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores, ligandos o anticuerpos, y detectar así la presencia de ácidos nucleicos o proteínas de interés originalmente en la muestra. Preferentemente, dicha etapa i) de detectar la presencia y/o cuantificar HERV-W se realiza con el kit de acuerdo con la presente divulgación.
- 15 Todos los datos técnicos mencionados anteriormente son aplicables en el presente documento.

Composición farmacéutica

- 20 Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) y que comprende opcionalmente un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retroviral.

- 25 Cualquier agente terapéutico de la invención como se describió anteriormente puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

- 30 **"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable"** se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea adecuado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico auxiliar de cualquier tipo.

- 35 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen naturalmente dependerán de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración tópica, oral, intranasal, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similar.

- 40 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, en función del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

- 45 Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular, en función del modo de administración usado, de la patología relevante o, como alternativa, de la duración deseada del tratamiento.

- 50 Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) puede disolverse o dispersarse en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

- 55 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

- 60 Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

- 65 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de

formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares. Preferentemente, el anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) de la invención o el fragmento y el derivado del mismo se puede formular en un tampón en el que se solubilizó, almacenó e inyectó a los pacientes. Preferentemente, dicho tampón comprende histidina 20 mM, sacarosa al 5 % y polisorbato 20 al 0,01 % y presenta un pH de 6,0. Un ejemplo de una formulación utilizada para la administración intravenosa de GNbAC1 se presenta en el Ejemplo 3.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución puede tamponarse adecuadamente y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, puede disolverse una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y o bien se añade a 1000 ml de fluido de hipodermoclastia o se inyecta en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá cierta variación en la dosis dependiendo de la afección del paciente que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el paciente individual.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyecciones intravenosas o intramusculares, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

Método terapéutico y método de monitoreo

La divulgación también se refiere a un método para inhibir la expresión y/o la replicación de un virus que pertenece a retrovirus endógenos humanos (HERV) en un paciente mediante la administración a dicho paciente de un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura HERV-W (HERV-W Env).

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir y/o tratar a un paciente que padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2, mediante la administración a dicho paciente de un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env), un fragmento o un derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo actúa como un fármaco antirretrovírico dirigido a HERV, preferentemente dirigido a HERV-W, más preferentemente dirigido al MSRV.

La divulgación también se refiere a un método de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad asociada a HERV-W que comprende las etapas de:

1) predecir el pronóstico de un paciente mediante la detección y/o cuantificación de un virus que pertenece a la familia de los retrovirus endógenos humanos (HERV), preferentemente HERV-W, más preferentemente MSRV, en una muestra biológica mediante el kit de la presente divulgación; y después

2) si dicha etapa 1) muestra la expresión de un retrovirus endógeno humano (HERV), entonces el método de divulgación comprende una etapa 3) de proporcionar el anticuerpo, fragmento o derivado de la divulgación a dicho paciente.

La divulgación también se refiere a un método para monitorear la respuesta a un tratamiento de un paciente que padece una enfermedad asociada a HERV-W, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a. tratar a dicho paciente con el anticuerpo, fragmento o derivado de acuerdo con la presente divulgación; después

b. detección y/o cuantificación de HERV-W en una muestra biológica de dicho paciente.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para monitorear la respuesta a un tratamiento de un paciente que padece una enfermedad asociada a HERV-W, comprendiendo dicho método una etapa de detección y/o cuantificación de HERV-W en una muestra biológica de dicho paciente. Preferentemente, dicho paciente comprende un anticuerpo, un fragmento o un derivado de acuerdo con la presente descripción. La expresión "**paciente que comprende un anticuerpo**" se refiere a un paciente que fue tratado con un anticuerpo y presenta una cantidad detectable de dicho anticuerpo en su sangre, tejidos u órganos. Normalmente, dicho anticuerpo, fragmento o derivado se proporcionó o administró al paciente previamente a la etapa de detectar y/o cuantificar HERV-W.

De acuerdo con la presente divulgación, en caso de monitorear la respuesta a un tratamiento de un paciente que padece una enfermedad asociada a HERV-W, una muestra biológica puede ser una muestra de fluidos corporales tales como sangre, fluido cefalorraquídeo, orina o en lesiones o tejido específico de la enfermedad tales como placas

cerebrales de MS, biopsias de nervios de CIDP o biopsias de páncreas de diabetes.

Normalmente, la etapa b. de detección y/o cuantificación puede realizarse de acuerdo con las técnicas de rutina, bien conocidas por el experto en la materia. Normalmente, dicha etapa b. comprende poner en contacto una muestra biológica del paciente con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores, ligandos o anticuerpos, y detectar así la presencia de ácidos nucleicos o proteínas de interés originalmente en la muestra. Preferentemente, dicha etapa b. de detección de la presencia y/o mediación del nivel de expresión de HERV-W se realiza con el kit de acuerdo con la presente divulgación.

Todos las características técnicas divulgadas anteriormente son aplicables en el presente documento.

Leyendas de las figuras

Figura 1

(A) Niveles de transcripción de HERV-W env y pol en la inclusión, según lo detectado por diferentes pares de cebadores y sondas para qPCR.

(B) Transcripción de HERV-W env con sondas y cebadores "env" y "UNO" en paralelo para pacientes incluidos para la cohorte de 2 mg/ml (círculos simples) y para la cohorte de 6 mg/ml (cuadrados simples).

(C) Transcripción de HERV-W env con sondas y cebadores "UNO2", "syn" y "pol" en paralelo para pacientes incluidos para la cohorte de 2 mg/ml (círculos simples) y para la cohorte de 6 mg/ml (cuadrados simples).

Las ordenadas representan la expresión relativa (relación con GUS B) del ARN diana para cada paciente y las abscisas representan los diferentes protocolos qPCR utilizados en las mismas muestras.

Figura 2: Diferencia en los niveles de transcripción de HERV-W env y pol entre diferentes formas clínicas de MS en la inclusión, según lo detectado por diferentes pares de cebadores y sondas para qPCR (A) protocolo "env" (B) protocolo "UNO" (C) protocolo "UNO2" (D) protocolo "syn" (E) protocolo "pol". Las ordenadas representan la expresión relativa (relación con GUS B) del ARN diana para cada paciente y las abscisas representan las diferentes formas clínicas de MS: Progresiva primaria (PPMS, de sus siglas en inglés), Remitente recurrente (RRMS, de sus siglas en inglés) y Progresiva secundaria (SPMS, de sus siglas en inglés).

Figura 3: La correlación entre los niveles de transcripción de HERV-W env y pol y los parámetros clínicos de los pacientes con MS en la inclusión, tal como se detecta por pares de cebadores particulares y sondas para qPCR (A) el protocolo "Syn" evidencia una correlación negativa entre la expresión de HERV-W de tipo Sincitina y la duración de la enfermedad: prueba de correlación de Pearson $r = -0,96$; $p = 0,009$ (B) el protocolo "Syn" evidencia una correlación positiva entre la expresión de HERV-W tipo Sincitina y el índice de progresión de la enfermedad: prueba de correlación de Pearson $r = 0,95$; $p = 0,014$ (C) el protocolo "pol" también evidencia una correlación positiva entre la expresión del gen tipo HERV-W pol (que codifica la proteasa, la transcriptasa inversa y la integrasa) y el índice de progresión de la enfermedad: prueba de correlación de Pearson $r = 0,95$; $p = 0,048$. Las ordenadas representan la duración de la enfermedad en años (A) o el índice de progresión (B y C); las abscisas representan la expresión relativa (relación con GUS B) del ARN diana para cada paciente.

Figura 4: Variación de los niveles de transcripción relacionados con HERV-W durante los primeros 6 meses de GNC002. Los datos representan la expresión relativa media de ARN dirigido a GUS B para cada transcripción relacionada con HERV-W en la cohorte de 2 mg/kg (A), en la cohorte de 6 mg/kg (B) y de todos los pacientes incluidos en GNC002 (C). Las líneas discontinuas representan el nivel de las transcripciones correspondientes en la inclusión. Las ordenadas representan la expresión relativa promedio (relación con GUS B) del ARN diana para cada protocolo qPCR en el grupo de pacientes. Las abscisas representan el número de inyecciones de GNBAC1 a los pacientes.

Figura 5: Variación de los niveles de transcripción relacionados con HERV-W durante los primeros 6 meses de GNC002. Los datos representan la expresión relativa media de ARN dirigido a GUS B para cada transcripción de HERV-W en todos los pacientes incluidos en GNC002. La variación en los niveles de transcripción de HERV-W env y pol junto con el tratamiento en la MS desde la inclusión hasta la fecha de la sexta inyección se ilustra, como transferencia de Whiskers (percentiles 10-90) de cada paciente medidos con diferentes pares de cebadores y sondas para qPCR (A) protocolo "env" (B) protocolo "UNO" (C) protocolo "UNO2" (D) protocolo "syn" (E) protocolo "pol".

Las ordenadas representan la expresión relativa promedio (relación con GUS B) del ARN diana para cada protocolo qPCR en el grupo de pacientes. Las abscisas representan el número de inyecciones de GNBAC1 a los pacientes, antes de las cuales se recolectaron muestras de sangre (por lo tanto, "1" corresponde al estado antes de cualquier inyección, "3", el estado 4 semanas después de la segunda inyección y "6", el estado 4 semanas después de la quinta inyección).

Figura 6: Las células CH2 expresan espontáneamente proteínas HERV-W codificadas por gag, pol y env, tal como se detectan con anticuerpos específicos mediante transferencia Western.

El peso molecular aparente de las bandas detectadas con cada anticuerpo específico contra antígenos

codificados por HERV-W gag, pol y env se indica en el lado derecho del carril correspondiente al extracto celular para cada antígeno. El carril izquierdo en A, B y C representa los marcadores de peso molecular utilizados para la estimación de KDa.

- (A) Poliproteína HERV-W gag y productos de escisión, incluida la proteína de la cápside típica de aproximadamente 30 KDa.
 (B) Poliproteína HERV-W Pol y productos de escisión, incluida la proteína transcriptasa inversa típica de aproximadamente 55 KDa.
 (C) Proteína de envoltura HERV-W, productos de escisión y multímeros, incluidas las unidades escindidas SU (superficie) y TM (transmembrana) de aproximadamente 45 y 35 KDa. Los productos env glucosilados se detectan con una posible variación en las glucosilaciones entre bandas monoméricas detectadas alrededor de 75 y 80 KDa. Los 55 KDa corresponden al monómero no glucosilado, con un dímero de alrededor de 100 KDa. La banda de alrededor de 160 KDa podría ser un dímero glucosilado o un trímero no glucosilado

Figura 7: Proteína de transcriptasa inversa codificada por HERV-W pol en cultivos CH2 con o sin tratamiento con GNbAC1 y/o AZT.

El peso molecular aparente de las bandas detectadas con el anticuerpo específico contra los antígenos codificados con HERV-W pol se indica en el lado derecho de la transferencia Western. El número de los carriles de la transferencia Western (1 a 6) se indican debajo de la imagen.

- 1) Tratamiento combinado con GNbAC1 y AZT
- 2) Tratamiento solo con AZT
- 3) Tratamiento solo con GNbAC1
- 4) Células tratadas simuladas (sin tratamiento)
- 5) Pocillo vacío
- 6) Marcador de peso molecular

Ejemplos

Ejemplo 1: Inhibición de la expresión de ARNm de retrovirus endógeno humano tipo W en pacientes con esclerosis múltiple tratados con GNbAC1.

GNbAc1 es un anticuerpo monoclonal IgG4 dirigido a la proteína de envoltura de retrovirus asociada a esclerosis múltiple (MSRV-Env), un miembro de la familia HERV-W de elementos retrovíricos endógenos, por lo tanto, también se conoce como HERV-W Env. GNbAC1 ha mostrado un perfil de seguridad favorable y una farmacocinética lineal en un ensayo clínico de fase I realizado en voluntarios sanos.

El presente ensayo clínico de Fase IIa GNC002 se realizó para evaluar el perfil de seguridad y la farmacocinética de GNbAC1 a 2 y 6 mg/kg en 10 pacientes con MS. GNC002 consistió en un estudio longitudinal de 12 meses, en el cual GNbAC1 se administra mensualmente.

El presente análisis se realizó en muestras recolectadas durante los primeros 6 meses de GNC002, donde se evaluaron los niveles de transcripciones relacionadas con HERV-W mediante reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés) de pacientes inscritos. Las transcripciones de HERV-W se evaluaron mediante diferentes conjuntos de cebadores/sondas de la siguiente manera: MSRV-env, HERV-W-UNO, HERV-W-UNO2,

Materiales y métodos

Las muestras se recogieron en tubos Vacutainer CPT de 4 ml, se procesaron, almacenaron y enviaron de acuerdo con el protocolo proporcionado por Geneuro en "The GNC002 Laboratory Manual".

Los 2 centros de reclutamiento implicados en el estudio GNC002 proporcionaron PBMC congeladas de 10 pacientes con MS.

Sustancias químicas y biológicas

Artículo	Proveedor	Referencia	N.º de lote
2-β-mercaptoetanol	Sigma	M3148-100 ml	18596EK
DNA Zap 1	Ambion	AM9891G	1108021
DNA Zap 2	Ambion	AM9892G	1108017
Etanol	Fluka	51976-500 ml	BCBH0821V
IQ supermix	Biorad	1708862	730001658
IQ supermix con SYBR green	Biorad	170-8882	730001695

(continuación)

Artículo	Proveedor	Referencia	N.º de lote
kit de síntesis de ADNc i-script select	Biorad	1708897	730001741
Nucleasa libre de agua	Ambion	AM9932	1303123
PBS pH 7,410X	Ambion	AM9625	1305040
QIAshredder (250)	Qiagen	79656	139309935
Mini kit RNeasy (250)	Qiagen	74106	139314102
Kit libre de ADN turbo	Ambion	AM1907	1303051

Programas informáticos

- 5 - Biorad CFX Manager 2.0: ejecución y análisis de PCR
- Genex 5: suavizado de datos brutos de PCR
- Graph Pad Prism: transferencias
- 10 - SigmaStat: análisis estadísticos

La prueba de normalidad utilizada es la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las correlaciones se determinaron con el análisis de Pearson Product Moment si los datos eran paramétricos, o el análisis de Spearman Rank Order si los datos no eran paramétricos.

Protocolos

- En resumen, la primera etapa consistió en la extracción de ARN total de las muestras de PBMC. Las muestras son PBMC aisladas de la sangre recogida en tubos de CPT y congeladas en 0,5 ml de DMSO al 10 % en suero de ternera fetal. Después de descongelar, las muestras de PBMC se lavaron con PBS helado y se extrajeron los ARN totales con el mini kit QIAamp RNeasy. A continuación, los ADNc se prepararon mediante retrotranscripción de todo el ARNm contenido en ARN totales extraídos previamente. Se realizaron PCR cuantitativas en estos ADNc, con la adición de un estándar interno utilizado como un calibrador entre placas (que permite la estandarización de los valores a lo largo de un experimento con múltiples placas). Los resultados se expresaron como la expresión relativa del ARN diana (MSRV/HERV-W), en una relación con la expresión del ARN de GUS B, un gen de mantenimiento de referencia con un nivel de expresión estable en la población con MS.

Secuencias de cebadores y sondas

- 30 El conjunto de cebadores/sonda de detección comercial para el gen de mantenimiento de control, GUS B, es el ensayo de expresión génica Taqman GusB (biosistema aplicado 4448485). VIC® es el marcador de tinción fluorescente detectado en el extremo 5' de la sonda GusB.

- 35 Los cebadores y la sonda de MSRV-env están diseñados para detectar específicamente la secuencia que codifica la proteína MSRV-Env y no Sincitina. Por el contrario, los cebadores de Sincitina permiten la amplificación específica de la secuencia que codifica para Sincitina, pero no MSRV-env. La fluorescencia del marcador de tinción FAM™ se mide en la sonda de MSRV-env y Sincitina.

- 40 Los cebadores UNO2 están diseñados por Geneuro para reconocer la secuencia de MSRV-Env que se supone que tiene una posible función inmunosupresora, por analogía con la región correspondiente en otras secuencias de retrovirus endógenas; sin embargo, esta terminología ("péptido/secuencia inmunosupresora") se usa en el presente documento para localizar un dominio definido en proteínas de envoltura retrovíricas, que pueden no ser inmunosupresoras en muchos retrovirus. Estos cebadores también pueden hibridar la secuencia que codifica Sincitina.

- 45 UNO, diseñado por Geneuro, une secuencias que codifican para MSRV-Env y Sincitina. Ninguna sonda está diseñada para las secuencias amplificadas por los cebadores UNO y UNO2, por lo tanto, la fluorescencia verde SYBR permite la cuantificación de la amplificación de estas secuencias.

- 50 Los cebadores y la sonda de MSRV-pol se diseñaron por Geneuro y reconocen la secuencia que codifica la transcriptasa inversa de MSRV. La detección de la hibridación de la sonda de MSRV-pol se cuantifica con el indicador fluorescente FAM™.

Tabla 4: Secuencia de todos los cebadores y sondas utilizados en este estudio de biomarcadores

DIANA:	DENOMINACIÓN DE CEBADORES	SECUENCIA (5' → 3')	SEQ ID NO:
Env de retrovirus de esclerosis múltiple	MSRV env Directa	5'-CTTCCAGAATTGAAGCTGTAAAGC-3'	11
	MSRV env Inversa	5'-GGGTTGTGCAGTTGAGATTTCC-3'	12
	MSRV env Sonda	FAM-TTCTTCAAATGGAGCCCCAGATGCAG-TAMRA	13
Sincitina-1	Sincitina M Directa	5'-ACTTTGTCTCTTCCAGAATC-3'	14
	Sincitina M Inversa	5'-GCGGTAGATCTTAGTCTTGG-3'	15
	Sonda de Sincitina M	FAM-ATGGAGCCCAAGATGCA-TAMRA	16
Posible secuencia inmunosupresora	UNO2 Directa	5'-GGCGGTTAGCAAGTCTAAAG-3'	17
	UNO2 Inversa	5'-ATGGAACAGGTCACTGACTCC-3'	18
Secuencias <i>Sincitina</i> y <i>MSRV-env</i>	UNO Directa	5'-GTATGTCTGATGGGGGTGGAG-3'	19
	UNO Inversa	5'-CTAGTCCTTTGTAGGGGCTAGAG-3'	20
	Sincitina Directa	5'-TGCCCCATCGTATAGGAGTCT-3'	21
	Sincitina Inversa	5'-CATGTACCCGGGTGAGTTGG-3'	22
Secuencia <i>MSRV-pol</i> (transcriptasa inversa)	MSRVpol2 Directa	5'-CCTGTACGTCCTGACTCTC-3'	23
	MSRVpol2 Inversa	5'-CTTGGGCTAATGCCTGGCC-3'	24
	Sonda de MSRV-pol 2	FAM-CCAACGTCTCAACTCACCTGGTAMRA	25
GAPDH	GAPDH Directa	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGAC-3'	26
	GAPDH Inversa	5'-TGGCATGGACTGTGGTCATG-3'	27
	Sonda GAPDH	VIC-AGCCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTAMRA	28

El fluoróforo detectado por el termociclador CFX está en 5' de la sonda. Para los cebadores establecidos sin sonda, la detección se realiza con tinte verde SYBR intercalante.

Análisis de resultados

Los criterios de exclusión para las muestras que previenen sesgos en los análisis fueron los siguientes:

- Concentración de ARN de la muestra por debajo de 10 ng/μl, después de la extracción y el tratamiento con DNasa
- Desviación estándar del triplicado de PCR por encima de 0,2 Cq, para una muestra
- Cq (Ciclo de cuantificación) de GUS B por encima del límite de degradación, lo que indica que el ARN no está alcanzando el nivel de calidad esperado en el estudio. El límite de degradación se calcula de la siguiente manera: Media + 2 x desviación estándar de todos los valores individuales del Cq de GUS B

Todos los Cq individuales para genes MSRV/HERV-W env y GUS B están estandarizados de acuerdo con sus propios estándares internos añadidos en cada placa experimental con el programa informático Genex® (análisis MultiD AB, Suecia).

La expresión relativa de cada ARN diana dentro de cada muestra se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Expresión relativa de ARN dirigido a GUS B} = 2^{(\text{Cq de GUS B} - \text{Cq de ARN dirigido})}$$

Rendimiento de extracción y exclusión de muestras

Después de la extracción, la concentración total de ARN para cada muestra se determina con un aparato Nanodrop®. Se excluyeron todas las muestras con una concentración de ARN total inferior a 10 ng/μl. Antes de la cuantificación de ARN total, el ARN total se sometió a un tratamiento con DNasa para eliminar el ADN genómico contaminante que eventualmente quedaba en la preparación de ARN total. Después de esta etapa con DNasa, la ausencia de ADN genómico contaminante para cada muestra se controló mediante una PCR sin retrotranscripción (NoRT Ctrl n.º 1). Si se detecta ADN genómico durante esta etapa, las muestras correspondientes se someten a una segunda etapa de DNasa y una segunda cuantificación de ARN, así como un segundo control NoRT (NoRT Ctrl n.º 2). Las muestras finalmente se excluyeron si el ADN genómico todavía estaba presente en la preparación, o si el ARN total estaba por debajo de 10 ng/μl después de este tratamiento adicional con DNasa.

Estandarización de datos sin procesar con Genex® y exclusión de muestras

Para armonizar los datos sin procesar recopilados a través de múltiples microplacas de PCR, todos los datos sin procesar se estandarizaron de acuerdo con el estándar interno presente en cada microplaca con el programa

informático Genex. Las muestras para las cuales la desviación estándar del triplicado de PCR fue superior a 0,2 Cq se excluyeron del estudio. La calidad de una muestra se refleja en su nivel de expresión de GUS B. Todas las muestras por encima del límite de degradación se excluyeron del estudio.

5 **Resultados**

Niveles de transcripción relacionados con HERV-W en la inclusión

- 10 En el primer momento del estudio, se aislaron PBMC de la sangre de todos los sujetos antes de la primera administración de GNBAC1 o placebo. Por lo tanto, los resultados presentados en la **Tabla 5** y en la **Figura 1** corresponden al nivel basal de transcripciones de interés relacionadas con HERV-W para cada paciente en el momento de la inclusión en el estudio.

Tabla 5: Niveles de transcripción relacionados con HERV-W en la inclusión.

			Expresión relativa de ARN dirigido a GUS B				
Muestra	Punto de tiempo	Dosis (mg/kg)	Expresión relativa para MSRV-env/GusB	Expresión relativa para UNO/GusB	Expresión relativa para UN02/GusB	Expresión relativa para Sincitina/GusB	Expresión relativa para MSRV-pat/GusH
01-000112	1	2					
01-000312	1	2	0.058	0.151	0.044		0.010
01-000412	1	2					
02-000212	1	2	0.042	0.099	0.029		0.004
02-000512	1	2	0.115	0.418	0.102	0.021	0.013
01-000612	1	6	0.104	0.237			0.009
01-000812	1	6	0.063	0.278	0.043	0.024	0.011
02-000712	1	6	0.061	0.178	0.044	0.009	0.004
02-000912	1	6	0.042	0.124	0.035	0.007	0.004
02-001012	1	6	0.095	0.404	0.088	0.020	0.014

La distribución de los resultados de todos los pacientes es homogénea con los protocolos qPCR para "env" y "syn", pero se pueden ver diferencias en la distribución con los protocolos para UNO y UNO2 a pesar de la menor expresión relativa detectada para ARN específicamente dirigido con "UNO2".

- 5 No se observó diferencia en la distribución de niveles de transcripciones de HERV-W en la inclusión entre los pacientes que se inscribieron en las cohortes de 2 mg/kg y 6 mg/kg y entre los dos centros de reclutamiento implicados en el estudio.

Comparación de los niveles de transcripción de HERV-W env y pol con datos clínicos en la inclusión

- 10 La correlación de los parámetros clínicos con los niveles de transcripción relacionados con HERV-W en la inclusión se evaluó de acuerdo con la información resumida en la **tabla 6**.

Tabla 6: Niveles de transcripción relacionados con HERV-W e información clínica en la inclusión

			Expresión relativa de ARN dirigido a GUS B						Información clínica			
Muestra	Punto de tiempo	Dosis (mg/kg)	Expresión relativa para MSRV-env/GusB	Expresión relativa para UNO/GusB	Expresión relativa para UN02/GusB	Expresión relativa para Sincitina/GusB	Expresión relativa para MSRV-pol/GusB	Edad	Diagnóstico	Duración de la Enfermedad	EDSS en la inclusión	Índice de progresión
01-000112	1	2										
01-000312	1	2	0.058	0.151	0.044		0.010	49	SPMS	22	6	0,27
01-000412	1	2										
02-000212	1	2	0.042	0.099	0.029		0.004	52	SPMS	14	4,5	0,32
02-000512	1	2	0.115	0.418	0.102	0.021	0.013	59	PPMS	6	6	1
01-000612	1	6	0.104	0.237			0.009	57	RRMS	5	2,5	0,5
01-000812	1	6	0.063	0.278	0.043	0.024	0.011	51	PPMS	2	3	1,5
02-000712	1	6	0.061	0.178	0.044	0.009	0.004	62	SPMS	28	3,5	0,13
02-000912	1	6	0.042	0.124	0.035	0.007	0.004	47	SPMS	22	6,5	0,3
02-001012	1	6	0.095	0.404	0.088	0.020	0.014	65	PPMS	7	6	0,86

En primer lugar, estos resultados evidenciaron el hecho de que, independientemente de los cebadores y las sondas utilizados para los diferentes protocolos qPCR y cualesquiera que sean los genes HERV-W (env o pol), los niveles más altos de ARN de HERV-W se encontraron en pacientes PPMS y los más bajos en SPMS (**Figura 2**). Esto proporcionó claramente nueva información de interés sobre el nivel de expresión transcripcional diferencial de HERV-W en pacientes con dos formas diferentes de MS progresiva (PPMS y SPMS). Esto también puede ser de interés para RRMS, pero solo uno de estos casos se representa en el presente documento con una expresión relativa intermedia.

Esto muestra que la cuantificación del nivel transcripcional de HERV-W en pacientes con MS puede tener un valor de diagnóstico y puede, por ejemplo, usarse con el propósito de respaldar un diagnóstico diferencial entre los casos de SPMS y PPMS. Esto también puede ser útil para estratificar los umbrales de qPCR para el pronóstico o la monitorización terapéutica en PPMS, SPMS y, eventualmente también, en RRMS.

En segundo lugar, a pesar de los números actualmente bajos, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de transcripción de ARN de HERV-W env y pol y la duración de la enfermedad y/o el índice de progresión, cuando se usan los protocolos "Syn" y "pol". Los otros protocolos que utilizan diferentes cebadores y sondas no arrojaron correlaciones significativas con los parámetros clínicos, lo que resalta el valor del protocolo seleccionado, como se muestra en la **Figura 3**.

Esto muestra que una selección de protocolos para la cuantificación del nivel de transcripción de HERV-W del gen env que codifica el subtipo Sincitina (protocolo "Syn", con SEQ ID NO: 14, 15 y 16) o el gen pol en general (protocolo "pol", con SEQ ID NO: 23, 24 y 25) también puede tener un valor de diagnóstico particular en la MS. En este caso, el protocolo de qPCR "syn" y "pol" puede usarse como un biomarcador de la actividad de la enfermedad relacionada con HERV-W (evolutividad de la progresión de la enfermedad) para la estratificación clínica, el seguimiento y la monitorización terapéutica. Esto también puede ser útil para estratificar la "duración frente a la actividad" de la enfermedad en la MS progresiva con qPCR "Syn", lo que aumenta las perspectivas de diferencias en las estrategias terapéuticas que se aplicarán de acuerdo con el nivel de transcripción de HERV-W env "Sincitina" en pacientes con evolución progresiva durante varios años (SPMS, en particular).

Niveles de transcripción relacionados con HERV-W durante 6 meses

Para cada paciente incluido en el estudio, se aislaron PBMC de la muestra de sangre en el día 1 (inclusión), día 2, día 8, día 15 y día 29. A continuación, los pacientes recibieron 5 administraciones mensuales adicionales de GNBAC1 y se aislaron PBMC de la muestra de sangre antes de cada infusión de anticuerpos. Por lo tanto, los siguientes resultados representan la variación de cada transcripción relacionada con HERV-W durante los primeros 6 meses de estudio GNC002.

La segunda administración de GNBAC1 ocurrió en diferentes momentos del día 1, dependiendo de los pacientes. Por lo tanto, la variación media de las transcripciones relacionadas con HERV-W se evaluó con muestras de sangre recogidas antes de cada administración de GNBAC1 solamente.

En la cohorte de 2 mg/kg, se observó una disminución de todos los niveles de transcripción de HERV-W en la 6ª administración de GNBAC1, en comparación con los valores basales en la inclusión (**Figura 4**). Esto se confirma en la cohorte de 6 mg/kg (**Figura 4**). Cuando se agrupan todos los pacientes (cohortes de 2 mg/kg y 6 mg/kg), la disminución se evidencia mejor por los protocolos qPCR HERV-W UNO, UNO2 y pol en todo el estudio GNC002 (**Figura 4**). Esto también se ilustra con la distribución estadística de los valores medidos antes de la primera, tercera y sexta inyección de GNBAC1 en todos los pacientes (**Figura 5**).

Muy inesperadamente, la disminución también está marcada para ARNm pol. Este efecto no es lo que se espera que produzca un anticuerpo que se une específicamente a la proteína HERV-W Env después de ser inyectado una vez al mes durante seis meses en pacientes con una expresión de HERV-W asociada a la enfermedad. Este efecto sobre los ARNm que codifican las enzimas transcriptasa inversa, proteasa e integrasa parece, por lo tanto, único y novedoso para un anticuerpo anti-Env como GNBAC1. Por lo tanto, evidencia un efecto sobre la expresión global de HERV-W y, a través de sus productos codificados en pol, sobre su actividad retroviral replicativa. Por lo tanto, muestra un efecto antirretroviral, en particular, un efecto antirretroviral endógeno dirigido a la familia HERV-W.

En la **Figura 5**, la selección de los cebadores y sondas más precisos para los protocolos qPCR para un monitoreo terapéutico de grupos de pacientes tratados con GNBAC1 o con cualquier fármaco que interfiera con la expresión de HERV-W, es "UNO2" para HERV-W env y "pol" para HERV-W las enzimas que codifican el gen pol. Sin embargo, el cálculo de las proporciones con cifras obtenidas por otros protocolos qPCR también puede revelar un interés diagnóstico o pronóstico.

En este experimento, los niveles de transcripción relacionados con HERV-W en pacientes con MS incluidos en el estudio GNC002 se evaluaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando diferentes conjuntos de cebadores que amplifican diferentes secuencias representativas del gen env de HERV-W y un conjunto de cebadores que amplifican secuencias del pol de HERV-W (dentro de la región de codificación de la transcriptasa

inversa). Las transcripciones de HERV-W investigadas en el presente documento se denominan MSRV-env, HERV-W-UNO, HERV-W-UNO2, HERV-W-Syn y MSRV-pol.

Los resultados indican claramente que estos biomarcadores pueden proporcionar datos bioclínicos sensibles de interés para el diagnóstico de la MS y para el monitoreo terapéutico de las enfermedades asociadas a HERV-W.

Asimismo, los niveles de transcripción relacionados con HERV-W parecen ser más altos en pacientes con SPPM que en pacientes con SPMS, lo que confirma el valor de las pruebas de PCR cuantitativas actuales con los diferentes conjuntos de cebadores para la evaluación bioclínica de pacientes y, más allá, para fines de diagnóstico diferencial entre formas de MS progresiva (SPMS y PPMS).

Dado que todos los niveles de transcripción relacionados con HERV-W disminuyeron durante los primeros 6 meses de GNC002 en las cohortes de 2 mg/kg y 6 mg/kg, esto confirma el valor bioclínico de los conjuntos actuales de cebadores y protocolos qPCR para el monitoreo terapéutico de los pacientes y para una evaluación bioclínica de la eficacia terapéutica.

Finalmente, esto también proporciona evidencia biológica de que el tratamiento con anticuerpos anti-HERV-W Env (como GNBAC1) en pacientes con MS tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de HERV-W, que no se esperaba para el nivel de ARNm de env, pero aún menos para el ARNm de pol. Esto indica claramente una eficacia de este tratamiento de anticuerpos anti-Env contra un retrovirus endógeno asociado con una enfermedad humana, como nunca se ha descrito con retrovirus exógenos humanos.

Ejemplo 2: La inhibición de la proteína codificada por el gen pol del retrovirus endógeno humano tipo W (transcriptasa inversa) se potencia sinérgicamente mediante un tratamiento combinado con el anticuerpo GNBAC1 y AZT.

A. Caracterización antigénica de un cultivo celular que expresa espontáneamente las proteínas gag, pol y env de HERV-W

Material y métodos

Cultivo celular que expresa espontáneamente las proteínas gag, pol y env de HERV-W

Las células CH2 humanas se mantuvieron en medio IMDM (12440053; Lifetech) complementado con suero de ternera fetal al 10 % (10270106; Invitrogen), penicilina/estreptomycin al 1 % (P4333; Sigma) a 37 °C con CO₂ al 5 %. Extracción de proteínas

Extracción de proteínas

Se resuspendieron células CH2 en 500 µl de tampón RIPA (R0278, SIGMA) que contenía cóctel inhibitorio de antifosfatasa cOmplete® (04 693 132001; Roche) y LPG al 0,05 % (326495-22-1; Avanti Polar) a 4 °C, se incubaron durante 2 horas a 26 °C en una plataforma giratoria y se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos a 26 °C. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20 °C.

Transferencia Western

Los extractos de proteínas se diluyeron en tampón Laemmli 2X (Biorad) y se calentaron durante 5 minutos a 100 °C antes de cargar. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio al 7,5 % (TGX, Biorad). Los geles se ejecutaron durante un período de tiempo de 15 minutos a 120 mA en el búfer de ejecución (Life Technologies). Después de la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Biorad), la membrana se lavó dos veces con 1x PBS (Biomérieux) que contenía un tampón Tween20 al 0,05 % (Sigma) y se bloqueó durante 1 hora con el bloque de inicio (Thermo) en una plataforma giratoria a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se usaron de acuerdo con la Tabla 1 en 1x PBS durante 1 hora. La membrana se lavó tres veces y se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con HRP (G21234; lifetech, 1/1000 en 1x PBS) o anticuerpo IgG de ratón (115-035-146; jackson, 1/1000 en 1x PBS). La proteína de interés se detectó con una reacción colorimétrica (Opti 4-CN, Biorad), de acuerdo con el protocolo proporcionado.

Anticuerpos con antígeno dirigido y dilución de anticuerpos: 1) AcP1 policlonal de conejo (SQ09AK001, Squarix), MSRV-Env, 0,5 µg/ml; 2) Suero policlonal de conejo 330110 J77 (330110 J77, InCellArt), poliproteína MSRV-Pol, 1/500; Monoclonal murino 38E12 (250510, Squarix); Poliproteína MSRV-Gag, 1 µg/ml.

Resultados

Como puede observarse a partir de la **Figura 6**, estas células expresan todas las proteínas estructurales de HERV-W, según lo detectado por anticuerpos específicos dirigidos contra proteínas codificadas por gag, pol y env.

Es de destacar que, el anticuerpo anti-gag detecta la poliproteína codificada por HERV-W gag y diferentes proteínas escindidas, incluida una detección más fuerte de la banda de proteína de tipo cápside P30. El patrón detectado por el anticuerpo anti-Env parece más complejo con la detección de monómeros, dímeros y trímeros glucosilados y no glucosilados codificados por HERV-W env, así como la unidad SU o TM escindida alrededor de 45 y 35 KDa. El anticuerpo anti-pol detecta principalmente la enzima transcriptasa inversa escindida, aunque se puede observar una banda de alto peso molecular en la parte superior del gel (no marcada con la estimación de KDa), que correspondería a la poliproteína codificada por HERV-W pol no escindida.

B. La proteína codificada por el gen pol del retrovirus endógeno humano tipo W (transcriptasa inversa) ya no se puede detectar en las células expuestas a un tratamiento combinado con el anticuerpo GNBAC1 y AZT.

Material y métodos

Cultivo celular de cordomas

Se cultivaron conjuntamente células CH1 y CH2 humanas (1:1) para optimizar el crecimiento de células CH2 y se mantuvieron en placas de 6 pocillos (CC7672-7506; CytoOne) a una densidad de 1.10^6 células/pocillo en medio IMDM (12440053; Lifetech) complementado con suero de ternera fetal al 10 % (10270106; Invitrogen), penicilina/estreptomycin al 1 % (P4333; Sigma) a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se trataron con i) AZT (1 µg/ml, A21-69; Sigma), ii) GNBAC1 (300 µg/ml, T950111-A; Polymun), iii) AZT + GNBAC1 o controles correspondientes con tampón GNBAC1 [His 20 mM, sacarosa al 5 % (p/v), Tween 20 al 0,01 % (p/v)].

Extracción de proteínas

Se resuspendieron células CH1 y CH2 en 200 µl de tampón RIPA (R0278, SIGMA) que contenía cóctel inhibidor de antifosfatasa cOmplete® (04 693 132001; Roche) y LPG al 0,05 % (326495-22-1; Avanti Polar) a 4 °C, se incubaron durante 2 horas a 26 °C en una plataforma giratoria y se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos a 26 °C. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20 °C.

Transferencia Western

Los extractos de proteínas se diluyeron (2:1) en tampón Laemmli 2X (Biorad) y se calentaron durante 5 minutos a 100 °C antes de cargar. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio al 7,5 % (TGX, Biorad). Los geles se ejecutaron durante un período de tiempo de 15 minutos a 120 mA en el búfer de ejecución (Life Technologies). Después de la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Biorad), la membrana se lavó dos veces con 1x PBS (Biomérieux) que contenía un tampón Tween20 al 0,05 % (Sigma) y se bloqueó durante 1 hora con el bloque de inicio (Thermo) en una plataforma giratoria a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se usaron de acuerdo con la Tabla 1 en 1x PBS durante 1 hora. La membrana se lavó tres veces y se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con HRP (G21234; lifetech, 1/400 en 1x PBS) o anticuerpo IgG de ratón (115-035-146; jackson, 1/1000 en 1x PBS). La proteína de interés se detectó con una reacción colorimétrica (Opti 4-CN, Biorad), de acuerdo con el protocolo proporcionado. Anticuerpo: Suero policlonal de conejo 330110 J77 (330110 J77, InCellArt), producido contra la poliproteína MSRV-Pol y diluido 1/500.

Como se puede observar en los resultados de este experimento, que se ilustran en la **Figura 7**, las células cultivadas en presencia de la combinación de GNBAC1 y AZT (carril n.º 1) ya no expresan niveles detectables de transcriptasa inversa (RT) de HERV-W. Cuando se expone a AZT solo (Carril n.º 2), se muestra una reducción clara de la expresión de RT de HERV-W por la señal correspondiente reducida teñida por el anticuerpo anti-RT de HERV-W; no obstante, esto sigue siendo un efecto parcial. En el carril n.º 3, la exposición a GNBAC1 solo pareció tener efectos menores sobre la proteína de la transcriptasa inversa codificada por HERV-W pol, tal como se detecta en las presentes condiciones *in vitro*. Como control positivo paralelo, la expresión de la proteína RT de HERV-W de las células expuestas al diluyente GNBAC1 únicamente (tampón de dilución) como tratamiento simulado, muestra la presencia normal de esta banda RT expresada en estas células en el carril n.º 4.

Por lo tanto, en el presente documento se muestra que solo la combinación de ambos anticuerpos GNBAC1 anti HERV-W Env y Azidotimidina (AZT) tuvo el efecto suficiente para inhibir completamente la producción de RT de HERV-W de este cultivo de células humanas que expresan genes gag, pol y env de HERV-W en conjunto, mientras que cada molécula terapéutica solo tuvo un efecto parcial o muy pequeño en esta expresión de HERV-W. Incluso si esto se relaciona con las condiciones de cultivo celular *in vitro*, esto, sin embargo, evidencia un efecto sinérgico obviamente aumentado y mayor sobre la eficacia de la inhibición de la expresión de RT de HERV-W por esta combinación única de una proteína HERV-W Env neutralizante de anticuerpos y de un fármaco antirretrovírico de transcriptasa inversa. No se espera que estas moléculas terapéuticas sinergicen los efectos sobre la expresión de RT de un retrovirus endógeno como HERV-W, sobre todo porque (i) se dirigen específicamente a moléculas y estructuras de proteínas completamente diferentes, (ii) tienen modos de acción completamente diferentes (neutralización de Env mediante epítipo específico dirigido e inhibición de la actividad de la enzima RT) y (iii) uno es

un anticuerpo mientras que el otro es una pequeña molécula química.

Ejemplo 3: Formulación de una solución tampón para la preparación del anticuerpo GNBAC1 adecuada para inyección intravenosa en individuos humanos.

5 Como se menciona en el ejemplo 1, GNBAC1 es un anticuerpo monoclonal IgG4 dirigido a la proteína de envoltura de retrovirus asociada a esclerosis múltiple (MSRV-Env), un miembro de la familia HERV-W de elementos retrovíricos endógenos, por lo tanto, también se conoce como HERV-W Env. GNBAC1 ha mostrado un perfil de seguridad favorable y una farmacocinética lineal en un ensayo clínico de fase I realizado en voluntarios sanos. El
10 ensayo clínico de Fase IIa GNC002 se realizó para evaluar el perfil de seguridad y la farmacocinética de GNBAC1 a 2 y 6 mg/kg en 10 pacientes con MS. GNC002 consistió en un estudio longitudinal de 12 meses, en el cual GNBAC1 se administra mensualmente.
Para fines de administración intravenosa (iv) del anticuerpo GNBAC1, una formulación específicamente adecuada del tampón en el que se solubilizó, almacenó e inyectó a los pacientes, es la siguiente: Histidina 20 mM, sacarosa al
15 5 %, Polisorbato 20 al 0,01 %, pH 6,0.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Geneuro
<120> Fármaco antirretrovírico dirigido a retrovirus endógenos humanos
<130>
25 <160> 28
<170> BiSSAP 1.3
<210> 1
30 <211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 1
35
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10
<210> 2
<211> 7
40 <212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 2
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
45
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
50 <213> *Mus musculus*
<400> 3
Gln Gln Tyr Gln Ser Leu Pro Leu Thr
1 5
55
<210> 4

ES 2 752 131 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <400> 4

Asp Tyr Glu Met His
1 5

10 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 5

Ala Val Ala Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

20 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 6

Thr Val Val Pro Phe Ala Tyr
1 5

25

30 <210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL

35 <400> 7

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

40 <210> 8
<211> 116
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223>VH

5

<400> 8

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

10

<210> 9

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> HC

<400> 9

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20				25						30		
Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Ala	Val	Ala	Pro	Glu	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Ser	Thr	Val	Val	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
		115					120					125			
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130					135					140				
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
145					150					155					160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165				170						175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
225					230					235					240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245					250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
			260					265					270		
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
		275					280						285		
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
	290					295					300				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
305					310					315					320
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				325					330					335	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
			340					345					350		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
	370					375					380				
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
385					390					395					400
Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
				405					410					415	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
			420					425					430		
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
		435					440								

<210> 10
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LC

ES 2 752 131 T3

<400> 10

```

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

```

5 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 11
 ctccagaat tgaagctgta aagc 24

15 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 12
 ggggtgtgca gttgagattt cc 22

25 <210> 13
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sonda/FAM en posición 5' y TAMRA en posición 3'

35 <400> 13
 ttctcaaat ggagcccag atgcag 26

5	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 14 actttgtctc ttccagaatc	20
15	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 15 gcggtagatc ttagtcttgg	20
25	<210> 16 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sonda/FAM en posición 5' y TAMRA en posición 3'	
30	<400> 16 atggagccca agatgca	17
35	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
40	<400> 17 ggcggttagc aagtctaaag	20
45	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
50	<400> 18 atggaacagg tcaactgactc c	21
55	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
60	<400> 19 gtatgtctga tgggggtgga g	21
65		

5	<210> 20 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador <400> 20 ctagtccttt gtaggggcta gag	23
15	<210> 21 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador <400> 21 tgcccatcg tataggagtc t	21
25	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador <400> 22 catgtacccg ggtgagttgg	20
35	<210> 23 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador <400> 23 cctgtacgctc ctgactctc	19
45	<210> 24 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador <400> 24 cttgggctaa tgcctggcc	19
55	<210> 25 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> SONDA/FAM en posición 5' y TAMRA en posición 3' <400> 25 ccaacgtctc aactcacctg g	21
65		

ES 2 752 131 T3

5	<210> 26 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
10	<400> 26 ggtgtgaacc atgagaagta tgac	24
15	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador	
20	<400> 27 tggcatggac tgtggtcatg	20
25	<210> 28 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sonda/VIC en posición 5' y TAMRA en posición 3'	
30	<400> 28 agcctcaaga tcatcagcaa tgcctcc	27
35		

REIVINDICACIONES

1. Preparación combinada o composición que comprende:

- 5 - un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o fragmento del mismo; y
 - un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica;

para su uso como fármaco antirretrovírico dirigido a un virus perteneciente a retrovirus endógenos humanos tipo W (HERV-W), en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la
 10 SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

2. Preparación combinada o composición que comprende:

- 15 - un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o fragmento del mismo; y
 - un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica;

para su uso para prevenir y/o tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2,

en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

25 3. Preparación combinada o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica es azidotimidina (AZT).

4. Un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o un fragmento del mismo y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en un método para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple (MS), esquizofrenia (SZ), trastorno bipolar (BP), unipolar o depresión psicótica, síndrome clínicamente aislado (CIS, con síntomas neurológicos), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, psoriasis, cáncer, pancreatitis inflamatoria y diabetes como la diabetes tipo 1 o tipo 2,

en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende cada una de las 6 CDR como se representa en la SEQ ID NO: 1 para CDR-L1, SEQ ID NO: 2 para CDR-L2 y SEQ ID NO: 3 para CDR-L3, SEQ ID NO: 4 para CDR-H1, SEQ ID NO: 5 para CDR-H2 y SEQ ID NO: 6 para CDR-H3.

5. Un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o un fragmento del mismo y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica como una preparación combinada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha enfermedad es la esclerosis múltiple (MS) o la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP).

6. La preparación combinada o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o un fragmento del mismo y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica como preparación combinada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde dicho anticuerpo o fragmento se selecciona del grupo que consiste en un Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, un diacuerpo y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

7. La preparación combinada o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o un fragmento del mismo y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica como preparación combinada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

8. La preparación combinada o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura de HERV-W (HERV-W Env) o un fragmento del mismo y un fármaco inhibidor de la transcriptasa inversa retrovítica como preparación combinada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde dicho anticuerpo o fragmento comprende:

- la cadena pesada (HC) que tiene la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 9 y
 - la cadena ligera (LC) que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10.

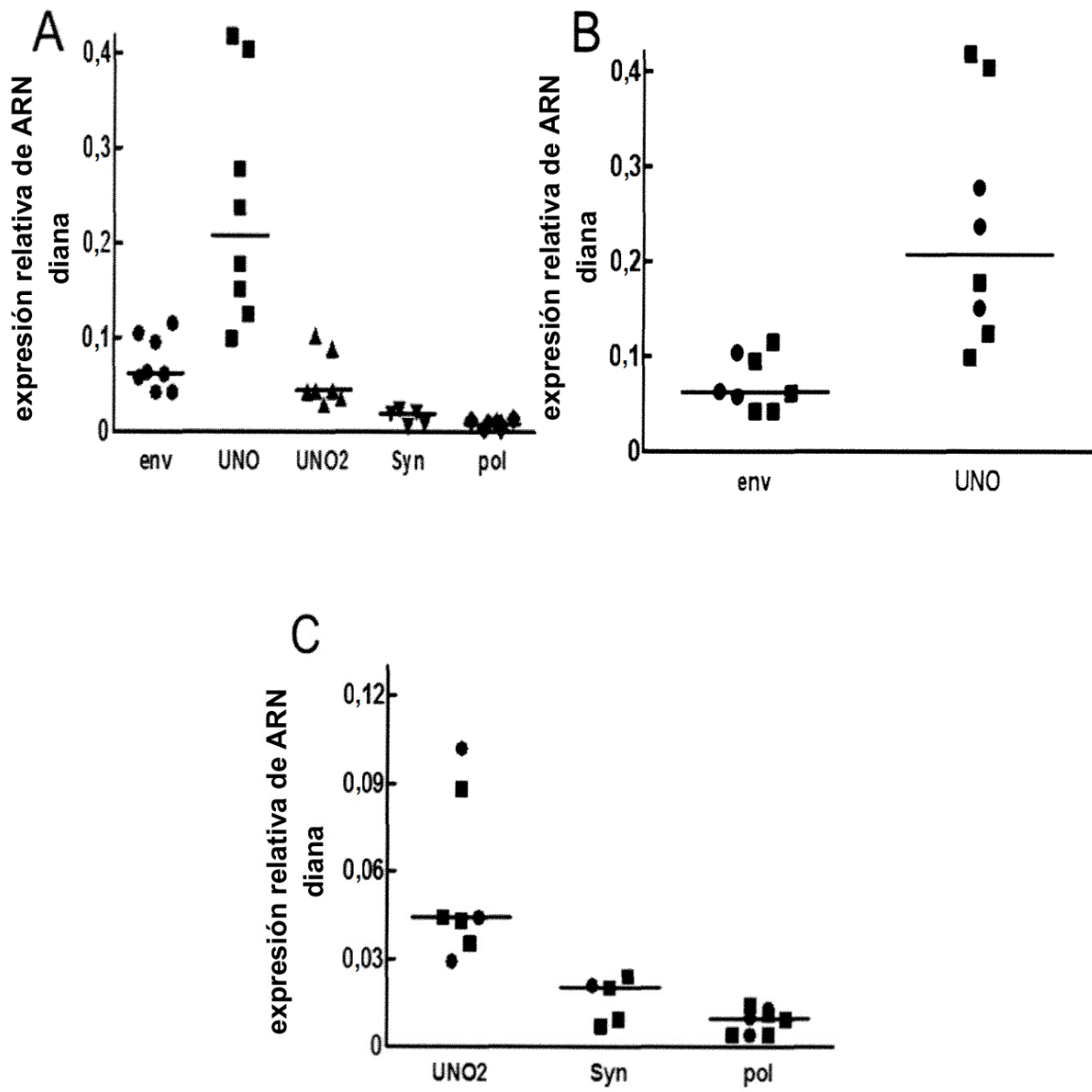


Figura 1

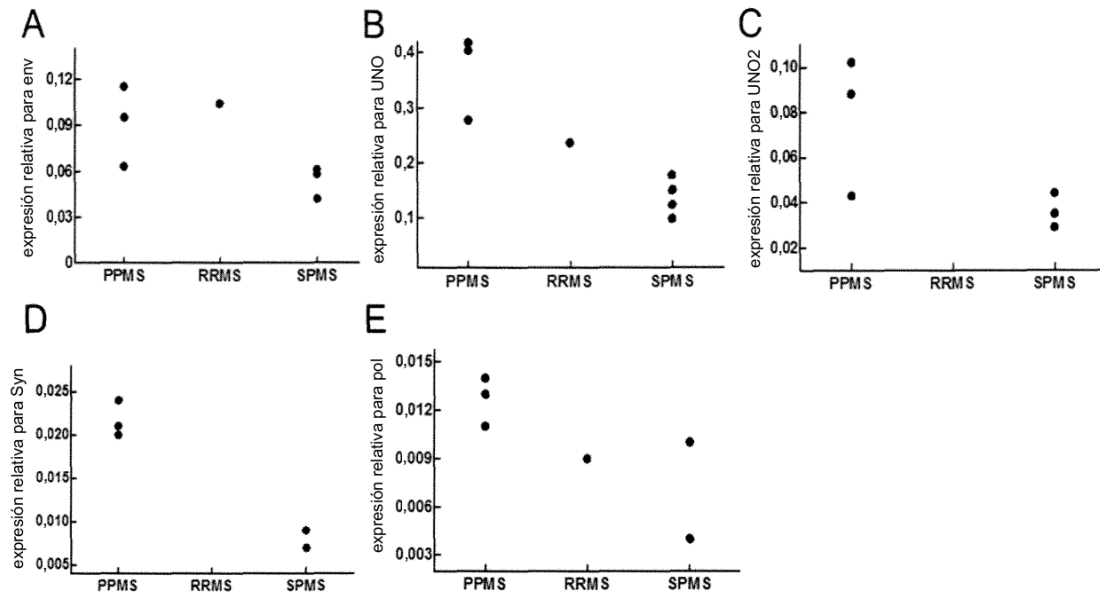


Figura 2

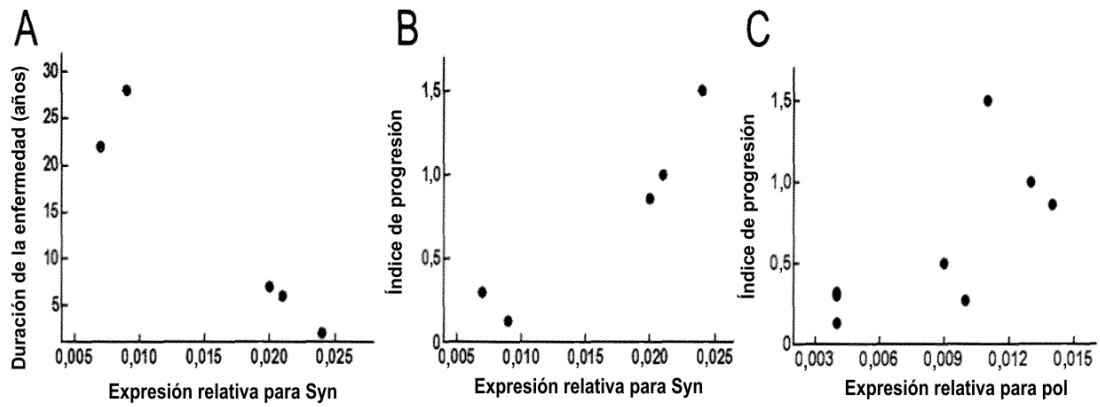


Figura 3

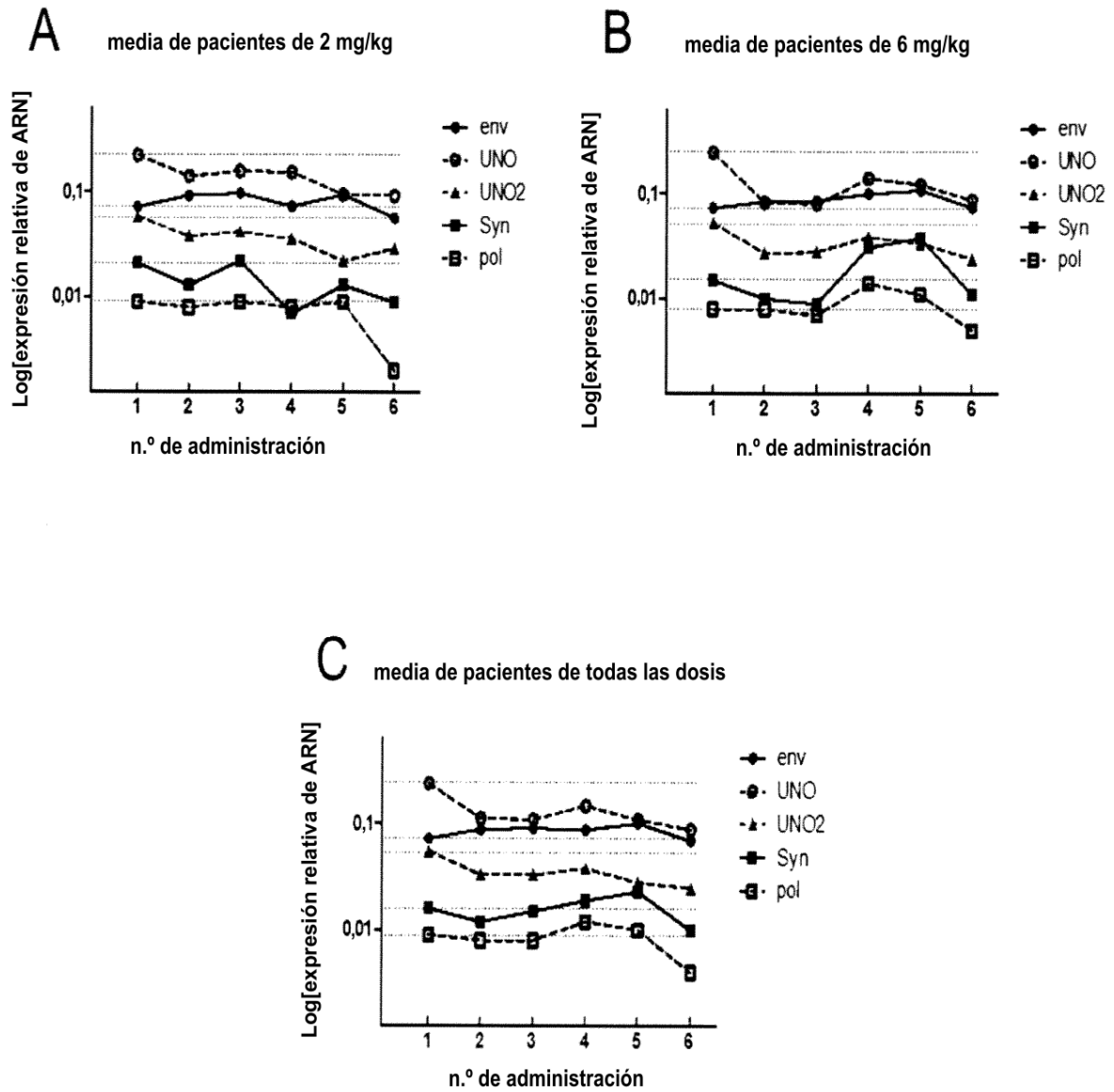


Figura 4

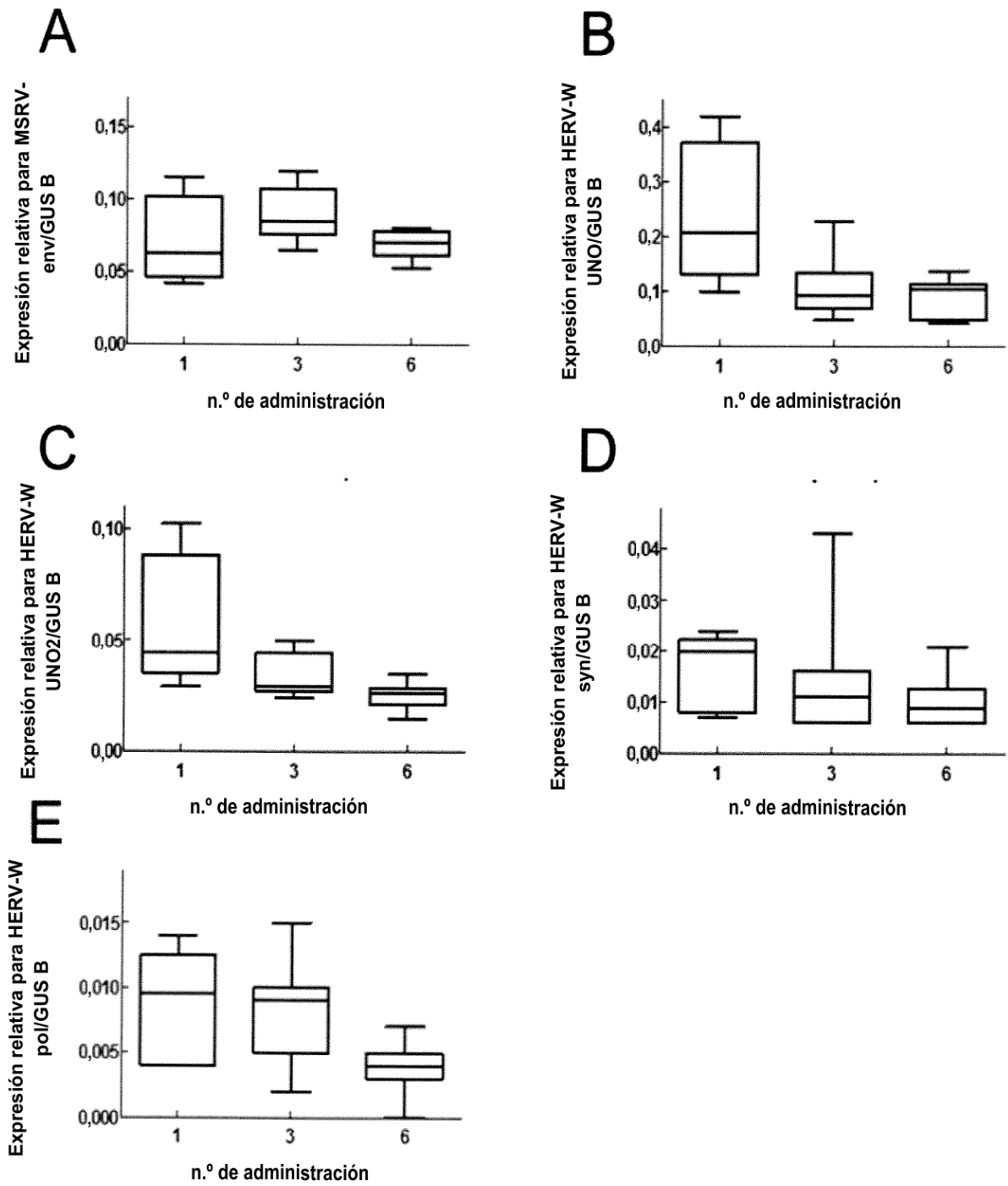


Figura 5

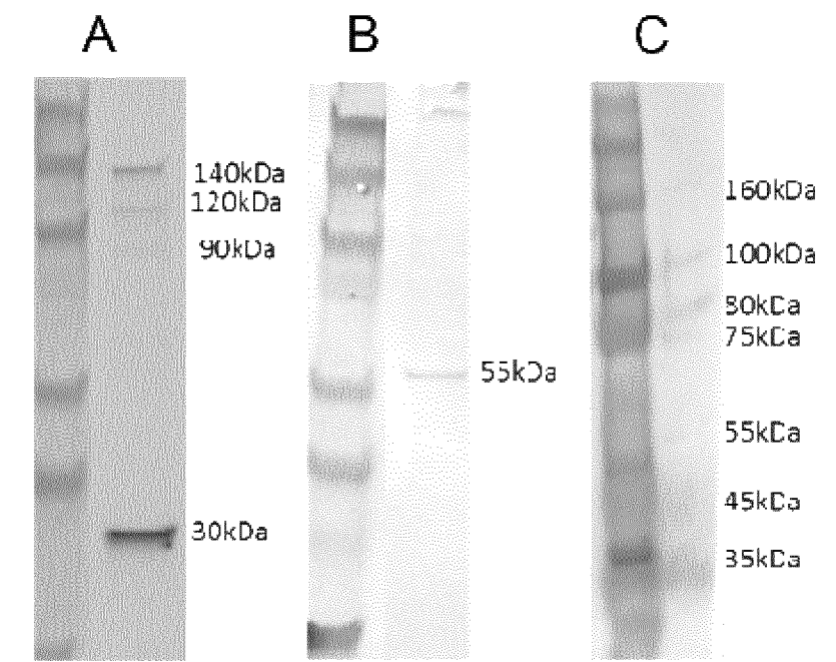


Figura 6

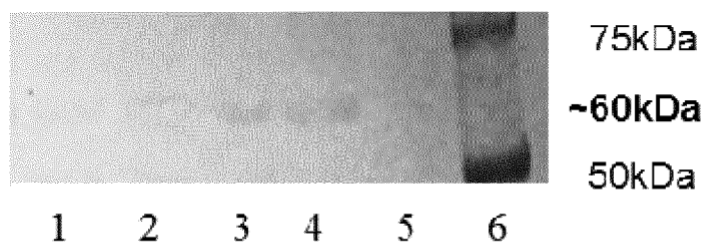


Figura 7