(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 878 248**

(51) Int. CI.:

C07K 16/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 18198309 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 3447070**

(54) Título: **Compuestos para tratar el bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W**

(30) Prioridad:

02.10.2012 US 201261708779 P
28.12.2012 US 201261746792 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

PERRON, HERVÉ;
FIROUZI, REZA;
KÜRY, PATRICK;
FAUCARD, RAPHAËL;
MADEIRA, ALEXANDRA y
JOANOU, JULIE

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Compuestos para tratar el bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W

Sector de la técnica

La presente solicitud se refiere a compuestos y composiciones innovadores para prevenir y/o tratar un mecanismo perjudicial recién descubierto, que bloquea la capacidad de reparación de mielina endógena del sistema nervioso adulto (SN) en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV.

Estado de la técnica

La esclerosis múltiple (EM) abarca dos enfermedades distintas. Una, denominada EM remitente recurrente (RRMS) está caracterizada por una neuroinflamación dirigida por linfocitos con lesiones agudas con actividad neuroinflamatoria visible por señales T1 potenciadas por gadolinio obtenidas con formación de imágenes por resonancia magnética. La otra, EM progresiva, se caracteriza por un desplazamiento a una ausencia de actividad neuroinflamatoria mediada por linfocitos T, es decir, no ni más recurrencia ni más inmunoinflamación cerebral aguda como se ve por lesiones potenciadoras de gadolinio T1 en MRI. La incapacidad del paciente continúa a avanzar debido a la neurodegeneración ligada a un bloqueo de la remielinización.

La mayoría de los fármacos disponibles en la técnica anterior eran para el tratamiento de la neuroinflamación en EM dirigiéndose a linfocitos y a sus funciones inmunoinflamatorias y se dirigieron por lo tanto directamente al tratamiento de RRMS.

Por ejemplo, la solicitud internacional WO2008/096271A2 menciona que promover la remielinización del SNC es una meta en el tratamiento de la forma progresiva de EM, pero no se refiere a compuestos capaces de superar el bloqueo de la remielinización. Solo proporciona compuestos capaces de ralentizar la desmielinización. La solicitud internacional WO2010/003977A1 desvela el uso de un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura HERV-W para el tratamiento de la enfermedad EM asociada a la actividad inflamatoria. Además, los resultados se obtienen de un modelo de ratón de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), que es un modelo de neuroinflamación comúnmente usado para estudiar RRMS. Lang et al. ("The therapeutic potential of monoclonal anti-human endogenous retrovirus W (HERV-W) envelope protein antibody multiple sclerosis : Results from a new EAE-animal model", Human antibodies, IOS PRESS, AMSTERDAM, vol. 17, n.º 1-2, 12 de noviembre de 2008) también trata con el tratamiento de la enfermedad EM con actividad inflamatoria, a saber RRMS, ya que los experimentos se llevan a cabo en modelos de ratones EAE. De la misma manera, Kremer et al. ("The complex world of Oligodendroglial differentiation inhibitors", Annals of neurology, Vol. 69, n.º 4, abril de 2011, páginas 602-618) trata con enfermedades desmielinizantes inflamatorias tales como esclerosis múltiple (EM) y por lo tanto se refiere explícitamente a la enfermedad EM con actividad inflamatoria. Además, el estudio de seguridad y tolerabilidad de un anticuerpo dirigido contra la proteína de envoltura HERV-W (Clinicaltrials.gov-NCT01639300) solo describe cómo se lleva a cabo un estudio de seguridad en pacientes que padecen particularmente la EM progresiva.

Objeto de la invención

Por lo tanto, hasta la presente solicitud, los fármacos disponibles no eran eficientes en pacientes que padecen la enfermedad progresiva, ya que estos pacientes ya no tienen más actividad inflamatoria. No se ha asumido que los fármacos propuestos en la técnica anterior sean eficaces en el tratamiento de la EM progresiva. Por lo tanto, había una necesidad de desarrollar un tratamiento para la esclerosis múltiple progresiva.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un nuevo enfoque terapéutico que combina una inhibición de los efectos patogénicos cadena arriba de Env en células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) junto con una inhibición de los efectores finales cadena abajo de la patogenicidad de Env en la diferenciación de OPC (radicales NO), que ahora se muestra que bloquean la remielinización de enfermedades asociadas con HERV-W que afectan al sistema nervioso.

La presente solicitud también desvela composiciones terapéuticas que comprenden (i) al menos un ligando anti-Env de HERV-W y/o (ii) al menos un fármaco inhibitorio de radicales libres de Óxido Nítrico (NO) para su uso para la prevención y/o el tratamiento del bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión of proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV.

La composición, cuando se combina tanto con ligando como con fármaco(s) inhibitorio de NO, se dirige al inductor de Env cadena arriba así como a los efectores de NO cadena abajo en este proceso recién descifrado produciendo el bloqueo de la remielinización en lesiones del SN.

Además, la acción sinérgica de los dos tipos de compuestos (Env y NO de direccionamiento, respectivamente) aumenta la rapidez y la eficacia de una terapia en pacientes con lesiones no remielinizantes inducidas por la activación de HERV-

W (en particular cuando se asocia con el subtipo MSRV, aislado en partículas de viriones de células MS[1]) y mediante la expresión de su proteína Env en el sistema nervioso.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un ligando anti-Env de HERV-W para su uso para la prevención y/o el tratamiento del bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV.

En la presente divulgación, las expresiones "bloqueo de la diferenciación", "bloqueo de la remielinización" u "obstrucción de la remielinización" se usan para resumir el fenómeno recién descubierto que consiste en (i) la inhibición de la diferenciación de Células Precursoras de Oligodendrocitos (OPCs) inducida por la proteína de envoltura HERV-W (en particular del subtipo MSRV), (ii) la producción resultante de NO a partir de las OPC y (iii) la inhibición resultante de la producción de Mielina por las OPC, como se describe en el Ejemplo 1.

Las enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV se definen como enfermedades asociadas a HERV-W que afectan al sistema nervioso y más particularmente, pero no de una manera limitante: Esclerosis Múltiple (EM), más particularmente Esclerosis Múltiple Remitente-Recurrente (RRMS), la Esclerosis Múltiple progresiva tal como Esclerosis Múltiple Progresiva Secundaria (SPMS) o Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria (PPMS), Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (CIDP[2]), psicosis tales como Esquizofrenia y Trastorno bipolar[6], en los que tan y se describe la alteración de la mielina[3-5].

De forma clásica, las lesiones por la esclerosis múltiple (EM) se atribuyen a una pérdida mediada por el sistema inmunológico de oligodendrocitos y vainas de mielina con daño axonal. Los efectos en las células inmunológicas que están mediados por la proteína de envoltura (Env) del retrovirus asociado a la Esclerosis Múltiple (MSRV) de la familia HERV-W de retrovirus endógenos en asociación con lesiones inflamatorias del sistema nervioso (SN) se han descrito[7]. Sin embargo, una patogenicidad directa de MSRV-Env en células de la glía que implican el bloqueo de la remielinización de placas de EM por células precursoras de Oligodendrocitos (OPCs) se desconocía previamente y nunca se había mostrado.

La presente invención trata con un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso para el tratamiento del bloqueo de la remielinización en la Esclerosis Múltiple progresiva asociado a la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (EV), en el que dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W comprende cada una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) expuestas en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5 y SEQ ID N.º 6.

En una realización particular de la invención, la Esclerosis Múltiple progresiva es Esclerosis Múltiple Progresiva Secundaria (SPMS). En otra realización de la invención, la Esclerosis Múltiple progresiva es Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria (PPMS).

De acuerdo con un aspecto, la inhibición de los efectos patogénicos cadena arriba de Env en células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) se realiza usando un ligando anti-Env de HERV-W. El ligando anti-Env de HERV-W de la presente divulgación se define por su capacidad para unirse a la proteína Env.

El término "unir" o "que se une" al ligando se refiere a una interacción o asociación al menos temporal con o a un antígeno diana, por ejemplo ENV, que comprende fragmentos del mismo que contiene un epítopo.

De acuerdo con la presente divulgación, ENV de HERV-W se refiere a proteína codificada por el gen env de cualquier miembro de la familia HERV-W, incluyendo al subgrupo MSRV como se define a partir de las secuencias identificadas en ARN de partículas retrovirales de EM[14, 23].

El ligando de la presente divulgación también puede definirse como estando comprendido dentro de una proteína scFv recombinante, un fragmento Fab, un anticuerpo, dicho anticuerpo puede ser anticuerpo policlonal, monoclonal, oligoclonal, un anticuerpo quimerizado, modificado por ingeniería genética o humanizado o un anticuerpo humano. En un aspecto particular de la invención, el anticuerpo que comprende el ligando es humanizado o una IgG humana, y más particularmente una IgG1 o una IgG4.

El ligando que se ha mencionado anteriormente comprende al menos una y más preferentemente cada una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) codificadas por las SEQ ID N.º 25, SEQ ID N.º 26, SEQ ID N.º 27, SEQ ID N.º 28, SEQ ID N.º 29, SEQ ID N.º 30.

Por lo tanto, en una realización particular de la presente invención, dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W es un scFv, un fragmento Fab, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo modificado por ingeniería genética o uno humanizado. En una realización particular adicional de la presente invención, dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W es una IgG, más particularmente una IgG1 o una IgG4.

Como se ha indicado anteriormente, el bloqueo de la remielinización también da como resultado la producción de NO a

partir de las células OPC. A continuación otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico para su uso para la prevención y/o el tratamiento del bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV.

Las enfermedades asociadas con la expresión de ENV de HERVW son las que se han definido anteriormente.

En un aspecto más específico de la divulgación, un fármaco inhibitorio de radicales libres de Óxido Nítrico (NO), fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico o fármaco inhibitorio de NO es cualquier fármaco que puede inhibir los efectos biológicos de moléculas de NO, también denominadas radicales NO. Los fármacos inhibitorios de NO se eligen entre Nᵍ-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), S-metil-isotiourea (SMT), ácido fumárico o fumarato de dimetilo (DMF).

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que combina al menos un ligando de Env anti-MSRV/H ERV-W como se ha definido anteriormente y al menos un fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico como se ha definido anteriormente. Esta composición se va a usar para la prevención y/o el tratamiento del bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV, siendo las enfermedades las que se han definido anteriormente.

El producto farmacéutico que contiene un ligando anti-Env de HERV-W como se ha definido anteriormente; y un fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico como se ha definido anteriormente se consideran como un producto de combinación para una administración simultánea, separada o prolongada en el tiempo para la prevención y/o el tratamiento del bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV.

De acuerdo con los resultados que se describen a continuación en modelos de ratón de encefalomielitis alérgica experimental (EAE) inducida por Env, se mostró un efecto sinérgico de la combinación de un ligando anti-Env de MSRV/H ERV-W con al menos una de estas moléculas de inhibición de NO, en comparación con cualquiera de estos agentes terapéuticos administrados solos. Incluso cuando se administra solo, el fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico o el ligando anti-Env de MSRV/H ERV-W muestran eficacia terapéutica con recuperación de deficiencia clínica que se sabe que está asociada con las lesiones de mielina en EAE[8].

Sin embargo, la comparación entre (i) fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico fue ligando anti-Env de MSRV/H ERV-W y la (ii) combinación de al menos un fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico y al menos un ligando anti-Env de MSRV/HERV-W pone en evidencia una gran ventaja del uso de esta combinación en el transcurso del tratamiento.

Por lo tanto, la ausencia de infiltrados y/o lesiones inflamatorios con actividad inflamatoria (por ejemplo, placas inactivas de EM) no excluye el tratamiento del bloqueo de la remielinización inducido por Env en pacientes afectados. Esto es de particular relevancia en pacientes con EM progresiva (formas progresivas primarias o secundarias) conocidas por tener numerosas lesiones sin actividad inflamatoria, que ya no muestran un aumento de gadolinio en la señal de formación de imágenes por resonancia magnética en la mayoría de las lesiones cerebrales y de la médula espinal.

La presente divulgación también describió un método para prevenir y/o tratar el bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV que comprende la administración de al menos un ligando anti-Env de MSRV/HERV-W a un ser humano.

En un aspecto específico, el método comprende adicionalmente la administración de al menos un fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico.

En otro aspecto, la divulgación describió un método para prevenir y/o tratar el bloqueo de la remielinización en enfermedades asociadas con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en particular de su subtipo MSRV que comprende la administración de al menos un fármaco inhibitorio de radicales de Óxido Nítrico a un ser humano.

Descripción de las figuras

Figura 1. **Detección de proteína Env y expresión del receptor TLR4 en tejido de EM.** (A, B) La inmunohistoquímica anti-Env desveló proteína Env (flechas) en NAWM cerca de una lesión activa crónica (B) pero no en materia blanca del cerebro sano (A). (C) OPCs positivas para Olig2 en proximidad cercana a células de la microglía positivas para Env en el borde de una lesión activa crónica. (D-D''') Tejido cerebral de control sano con las células OPC positivas para PDGFRα presentando co-expresión de TLR4 (flechas). (E-E''') OPCs en NAWM cerca de una lesión activa de un paciente con EM que expresa tanto TLR4 como PDGFRα (flechas). Barras de escala: 50 µm.

Figura 2. **Regulación de la expresión de TLR4 durante la diferenciación de OPC.** (A) RT-PCR cuantitativa que muestra una regulación negativa progresiva de la expresión de TLR4 durante la diferenciación espontánea de OPC en trata en cultivo durante un periodo de nueve días. La expresión de GAPDH se usó como gen de referencia. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar obtenida a partir de 3 experimentos independientes, ensayo t (***P < 0,001). (B, B') La inmunotinción anti-TLR4 demostró que después de supresión de TLR4 mediada por ARN horquillado corto (ARNsh), las OPC transfectadas fueron desprovistas de expresión de TLR4 (flecha) asegurando

la especificidad del anticuerpo. Las OPC mostradas se fijaron tres días después de la transfección y las células transfectadas se marcaron con expresión de eGFP. Observar que las células sin transfectar vecinas eran positivas para TLR4. (C-D') Ejemplos representativos de las células OPC doble positivas para galactocerebrósido (GalC)/TLR4 después de tres días (C, C) y las OPC doble positivas para (MBP)/TLR4 de proteína básica de mielina después de seis días (D, D') de diferenciación espontánea en cultivo. Las cabezas de la flecha en (D) apuntan a las OPC más altamente diferenciadas que presentan solamente niveles reducidos de expresión de TLR4 reflejando de ese modo datos de expresión genética que se muestran en (A). Las flechas indican células menos maduras que se expresan fuertemente.

Figura 3. **Efectos proinflamatorios de Env recombinante en las OPC de rata cultivada.** (A, B, C) Todas las estimulaciones de las OPC por Env recombinante en solución (A, soluble en Env), Env recombinante unida a la superficie (B; Env sólida) y Env unida a la membrana (C) expresada en células U343 de glioblastoma transfectadas con pV14Env (D-D') conducen a una fuerte inducción de expresión de iNOS después de ocho horas de estimulación en comparación con los respectivos controles de tampón o con respecto a las OPC cultivadas en presencia de células U343 de glioblastoma transfectadas con pV14ctrl (E-E'). En la preparación de Env recombinante, los niveles de endotoxina fueron < 5 EU/ml tal como se mide con el ensayo LAL. (D-E') Inmunotinciones de anti-Env de células U343 transfectadas con pV14Env y con pV14ctrl que desvelan expresión superficial de Env. (F-G') La morfología oligodendroglial tal como se evalúa mediante 04 inmunotinciones permanece sin alterar después de estimulación con Env recombinante unirá a la superficie mostrada después de un día (F, F') así como después de cinco días (G, G') en cultivo. (H) Análisis espectrométrico indirecto de sobrenadantes de cultivo celular midiendo el nitrito producto de desintegración de NO desveló un aumento significativo de los niveles dependientes de la dosis de NO en muestras de OPC estimuladas con Env recombinante soluble durante 24 h. (I-K) Las citoquinas proinflamatorias tales como TNFα, IL-1β e IL-6 que se somete la regulación positiva después de estimulación con Env recombinante unirá a la superficie. GAPDH se usó como gen de referencia. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y representan 1 de 6 (A), 8 (B), 3 (C), 3 (H) y 8 (I-K) experimentos independientes, respectivamente, ensayo t (***P < 0,001). Barras de escala: 50 µm.

Figura 4. **Comparación de sensibilidad a Env de HERV-W en las células OPC de rata inmadura (un día de edad = OPC) y madura (siete días de edad; "OPCs maduras" u Oligodendrocitos = OL;).** Ambos tipos de células se sometieron a estimulación con 100 ng/ml de Env recombinante soluble. Aunque era significativa en comparación con los controles de tampón iNOS y citoquina, la regulación positiva después de estimulación con Env en los OLs es menos pronunciada en comparación con las células OPC. La expresión de GAPDH se usó como gen de referencia. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y se obtienen a partir de uno de 3 experimentos representativos independientes, ensayo t (***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05).

Figura 5. **Reacciones dependientes de Env de las células OPC humanas.** (A) La estimulación de las células OPC humanas cultivadas con Env unida a la superficie (sólida) y recombinantes soluble (soluble) condujo a una fuerte inducción de la expresión de iNOS después de 24 h de estimulación en comparación con las células tratadas con tampón. La expresión de GAPDH se usó como gen de referencia. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y se obtienen a partir de uno de 3 experimentos representativos independientes, ensayo t (***P < 0,001). (B, B') Las tinciones con inmunofluorescencia de las células OPC humanas positivas para GalC cultivadas desvelan una fuerte señal para TLR4 (que se muestra después de tres días en cultivo). Barras de escala: 50 µm.

Figura 6. **Experimentos de neutralización de la ruta de Env.** (A) La inactivación por calor de Env recombinante condujo a una inducción genética de iNOS en comparación con la Env recombinante nativa después de 8 h de estimulación de las OPC. Ambas preparaciones, Env nativa y Env desnaturalizada (calentar Env) se aplicaron a una concentración de 1000 ng/ml. (B, C) Reducción de la expresión de iNOS en las OPC después de inhibición farmacológica de IRAK1/4 y TRIF, respectivamente. Después de una etapa de incubación previa de 2 h con el inhibidor I, IRAK1/4 3200 nM, o el péptido inhibitorio de TRIF 50 µM, las OPC se estimularon con Env recombinante unida a la superficie (sólida) durante 8 h y posteriormente se sometieron a lisis. (D) Reducción de la expresión de iNOS en las OPC después de bloqueo mediado por anticuerpo del receptor de Env, TLR4. Después de la etapa de incubación previa de 2 h con anticuerpo anti-TLR4 a una concentración de 15 µg/ml a 37 ºC, las OPC se estimularon con rEnv sólida durante 8 h y a continuación se sometieron a lisis. La expresión de GAPDH se usó como gen de referencia. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y se obtuvieron a partir de uno de 3 experimentos independientes representativos cada uno, ensayo t (***P < 0,001, **P < 0,01). (E) Aumento de la localización nuclear de NFκB después de estimulación de las células OPC con Env recombinante unida a la superficie (sólida) durante 8 h. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y se obtienen a partir de uno de 3 experimentos independientes representativos cada uno, ensayo t (****p* < 0.001). (F-G') Inmunotinciones de NFκB representativas de las células OPC estimuladas con tampón (control) y con Env. Barras de escala: 50 µm.

Figura 7. **Generación de las células OPC positivas para 3-nitrotirosina (3-NT).** (A) Las tinciones con inmunofluorescencia desvelaron que después de 24 h de estimulación con Env (Env recombinante unida a la superficie) una cantidad significativamente mayor de las células OPC expresaron el marcador de estrés nitrosativo dependiente de NO, 3-NT, en comparación con las células tratadas con tampón. Como control positivo se usó S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), un donante de NO fuerte. Sin embargo, cuando las células OPC se incubaron

con L-NAME, una molécula inhibitoria de iNOS, a una concentración de 100 µM durante 30 min a 37 ºC antes de la estimulación con Env, la positividad de 3-NT se redujo a niveles de control. El enantiómero inactivo D-NAME no pudo anular la inducción de 3-NT dependiente de Env. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y se obtienen a partir de uno de 3 experimentos independientes representativos, ensayo t (***P < 0,001). (B-F') Inmunotinciones representativas de anti-3-NT de células de control (B, B'), células OPC estimuladas con Env (C, C), células OPC incubadas previamente con L-NAME (D, D'), D-NAME (E, E') y células OPC expuestas a SNAP (F, F'). Barras de escala: 50 µm. (G-G''') Las tinciones con inmunofluorescencia de secciones de tejido de NAWM en paciente con EM demostraron que las células OPC presidentes (marcadas por su expresión del marcador precursor PDGFRα, flechas) pueden experimentar estrés nitrosativo tal como se desvela por su positividad para 3-NT.

Figura 8. **Inhibición dependiente de Env de diferenciación de OPC.** (A, B) Análisis de inmunofluorescencia que demuestra después de un día y tres días de estimulación con Env recombinante unida a la superficie, una número significativamente reducido del número de células OPC expresaban el marcador de mielina temprano CNPasa así como el marcador de mielina tardío MBPas en comparación con células de control. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y se obtienen a partir de uno de 4 experimentos independientes representativos, ensayo t (***P < 0,001). (C-C'') y (D-D''') muestran inmunotinciones de anti-CNPasa y anti-MBP representativas de células OPC estimuladas con control y con Env. (E) La incubación de las células OPC con L-NAME 100 µM en combinación con Env recombinante unida a la superficie durante tres días condujo a la anulación del bloqueo de la diferenciación de OPC mediado por Env como se desvela mediante inmunotinciones anti-MBP. La aplicación de D-NAME no fue capaz de rescatar la expresión de mielina. Los datos se muestran como valores medios +/- desviación estándar y se obtienen a partir de uno de 4 experimentos independientes representativos, ensayo t (***P < 0,001; n.s. no significativo). (F-H') Inmunotinciones de MBP representativas de células OPC estimuladas con Env solo, una combinación de Env y L-NAME y una combinación de Env y D-NAME, respectivamente. Barras de escala: 50 µm.

Figura 9. **Expresión de marcadores de maduración de OPC después de 24 y 72 horas de estimulación en labteks revestidos previamente con MSRV-Env.** MSRV-Env revestido (+ Env-T) indujo una disminución del porcentaje de OPC positivas para CNPasa después de 24 horas de estimulación **(A)**, así como una disminución del porcentaje de OPC positivas para MBP después de 72 horas de estimulación **(B)**, cuando se compara con su tampón de dilución (tampón). Los datos se presentan como Media ± ETM de un experimento evaluado en decaplicados (recuento de 410 a 563 células por un grupo; **p* < 0,05 ensayo t **(A)** y recuento de 364 a 491 células por grupo; **p* < 0,001 ensayo de Suma de Rango de Mann-Whitney **(B)).**

Figura 10. **Expresión de CNPasa en OPC humanas después de 24 horas de estimulación con MSRV-Env y GNbAc1. (A)** MSRV-Env induce una disminución del porcentaje de OPC positivas para CNPasa después de 24 horas de estimulación. GNbAC1 a 50 nM o 200 nM inhibe totalmente el efecto de MSRV-Env, en ambos protocolos de tratamientos de GNbAC1 sometidos a ensayo (GNbAC1-A o GNbAC1-B). Los datos se presentan como Media ± ETM de 2 a 8 experimentos independientes (recuento de 705 a 3878 células por grupo). **(B)** GNbAC1 (50 nM o 200 nM) revestido solo o junto con BSA (1 µg/ml), en ambos protocolos de tratamientos de GNbAC1 sometidos a ensayo (GNbAC1-A o GNbAC1-B) no tiene efecto en el porcentaje de OPC positivas para CNPasa. Los datos se presentan como Media ± ETM de un experimento evaluado en decaplicados (recuento de 399 a 512 células por grupo; $p > 0,05$; ANOVA de una vía).

Figura 11. **Expresión de CNPasa en cultivos de OPC humanas después de 24 horas de estimulación con MSRV-Env y GNbAC1 añadidos al medio de cultivo.** MSRV-Env (3 nM) diluido en el medio de cultivo celular disminuyen de forma significativa la expresión de CNPasa después de 24 horas de tratamiento. GNbAC1 (200 nM) inhibe completamente este efecto, mientras que no muestra ningún efecto solo. Los datos se presentan como Media ± ETM de 2 a 4 experimentos independientes (recuento de 927 a 1913 células por grupo); **p* < 0,001 con respecto a Tampón; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer).

Figura 12. **Expresión de MBP en cultivos de OPC humanas después de 72 horas de estimulación con MSRV-Env y GNbAC1. (A)** MSRV-Env (Env-T) revestido induce una disminución en el porcentaje de OPC positivas para MBP después de 72 horas de estimulación. GNbAC1 a 50 nM inhibe parcialmente el efecto de MSRV-Env, y esta inhibición es completa a 200 nM, en ambos protocolos de tratamientos de GNbAC1 sometidos a ensayo (GNbAC1-A o GNbAC1-B). **(B)** MSRV-Env (3 nM) añadido en el medio de cultivo celular disminuyen de forma significativa la expresión de MBP después de 72 horas de tratamiento. GNbAC1 (200 nM) inhibe completamente este efecto **(B)**.
Los datos se presentan como Media ± ETM de **(A)** 2 a 8 experimentos independientes (recuento de 924 a 4156 células por grupo) **p* < 0,05; ***p* < 0,001 con respecto a tampón; Ψ*p* < 0,001 con respecto a Env-T; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer, y de **(B)** 2 a 4 experimentos independientes (recuento de 1013 a 1834 células por grupo; * *p* < 0,001 con respecto a tampón; Ψ*p* < 0.001 con respecto a Env-T; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer).

Figura 13. **Expresión de marcadores de maduración de OPC después de 24 y 72 horas de estimulación con MSRV-Env y GNbAC1 revestidos.** MSRV-Env revestido induce **(A)** una disminución del porcentaje de OPC humanas positivas para CNPasa después de 24 horas de estimulación así como **(B)** una disminución del porcentaje de OPC humanas positivas para MBP después de 72 horas de estimulación. **(A)** GNbAC1 (200 nM) inhibe totalmente el efecto

de MSRV-Env, en ambos protocolos de tratamientos de GNbAC1 sometidos a ensayo (GNbAC1-A o GNbAC1-B). Los datos se presentan como Media ± ETM de 6 experimentos independientes (recuento de 2805 a 3039 células por grupo; * $p < 0,05$ con respecto a tampón; Ψ$p < 0,05$ con respecto a MSRV-Env; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Student Newman Keuls y **(B)** de 5 a 6 experimentos independientes (recuento de 1671 a 2066 células por grupo; *$p < 0,05$ con respecto a tampón; Ψ$p < 0,05$ con respecto a MSRV-Env; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Dunn).

Figura 14. **La inhibición de la maduración de OPC humanas inducida por MSRV-Env se revierte completamente con GNbAC1.**
MSRV-Env revestido (Env) induce **(A)** una disminución del porcentaje de OPC humanas positivas para CNPasa después de 24 horas de estimulación así como **(B)** una disminución del porcentaje de OPC humanas positivas para MBP después de 72 horas de estimulación. GNbAC1 (200 nM) inhibe totalmente el efecto de MSRV-Env, en ambos protocolos de tratamientos de GNbAC1 sometidos a ensayo (+ GNbAC1 A o + GNbAC1 B). Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas para CNPasa **(A)** o MBP **(B)** y representan la Media ± ETM de 8-14 experimentos independientes (recuento de 3600 a 6800 células por grupo **(A)** y recuento de 2700 a 5800 células por grupo **(B)**). *$p < 0,05$ con respecto a CTRL; $^{\Psi}p < 0,$con respecto a MSRV-Env; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Dunn.

Figura 15. **La inhibición de maduración de OPC humanas inducida por MSRV-Env se revierte completamente con GNbAC1 (datos normalizados).** MSRV-Env se revistió en portaobjetos de cámaras de cultivo antes de sembrar las OPC. GNbAC1 (200 nM) se mezcla con MSRV-Env antes del revestimiento (GNbAC1-A) o se incuba en cámaras de cultivos revestidas con MSRV-Env (GNbAC1-B). Los datos se cuantifican como el porcentaje de células positivas para **(A)** CNPasa o **(B)** MBP y se expresa como el porcentaje de cambio de la condición de CTRL (Tampón MSRV-Env). Los resultados representan la Media ± ETM de 8-14 experimentos independientes (recuento de 3600 a 6800 células por grupo **(A)** y recuento de 2700 a 5800 células por grupo **(B)**). *$p < 0,05$ con respecto a CTRL; $^{\Psi}p < 0,05$ con respecto a MSRV-Env; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Dunn.

Figura 16. **Cinética de puntuación clínica de EAE los Grupos A, B, C y F** (Controles positivos para EAE sin tratar con A, EAE tratada con B con 200 µg de GNbAc1, EAE tratada con C con L-NAME, EAE tratada con F con 200 µg de GNbAc + L-NAME)

Figura 17. **Cinética de puntuación clínica de EAE los Grupos A, B, D y G** (Controles positivos para EAE sin tratar con A, EAE tratada con B con 200 µg de GNbAc1, EAE tratada con D con SMT, EAE tratada con G con 200 µg de GNbAc + SMT)

Figura 18. **Cinética de puntuación clínica de EAE los Grupos A, B, E y H** (Controles positivos para EAE sin tratar con A, EAE tratada con B con 200 µg de GNbAc1, EAE tratada con E con DMF, EAE tratada con H con 200 µg de GNbAc + DMF)

Figura 19. **Cinética del Tiempo en Rotarod a 23 rpm**

Eje X: Días de valores medidos, de acuerdo con el protocolo.
Eje Y: Aumento o pérdida de tiempo en Rotarod, con respecto al Día -7.
A: Grupos A, B, "1 inyección" y "2 inyecciones" de Env; B: Grupos A, B, C y F;
C: Grupos A, B, D y G; D: Grupos A, B, E y H.

Figura 20. **Cinética del Tiempo en Rotarod a 26 rpm**

Eje X: Días de valores medidos, de acuerdo con el protocolo.
Eje Y: Aumento o pérdida de tiempo en Rotarod, con respecto al Día -7.
A: Grupos A, B, "1 inyección" y "2 inyecciones" de Env; B: Grupos A, B, C y F;
C: Grupos A, B, D y G; D: Grupos A, B, E y H.

Figura 21. **Cinética del Tiempo en Rotarod a 29 rpm**
Eje X: Días de valores medidos, de acuerdo con el protocolo.
Eje Y: Aumento o pérdida de tiempo en Rotarod, con respecto al Día -7
A: Grupos A, B, "1 inyección" y "2 inyecciones" de Env; B: Grupos A, B, C y F;
C: Grupos A, B, D y G; D: Grupos A, B, E y H.

Figura 22. **Cinética de puntuación clínica de EAE los Grupos A, B, C y D** (Controles negativos para EAE simulados con A, Controles positivos para EAE sin tratar con B, EAE tratada con C con 200 µg de GNbAc, EAE tratada con D con 500 µg de GNbAc)

Figura 23. **Cinética de puntuación clínica de EAE los Grupos A, B, E y F** (Controles negativos para EAE simulados con A, Controles positivos para EAE sin tratar con B, EAE tratada con D con SMT, EAE tratada con G con 200 µg de GNbAc + SMT)

Figura 24. **Cinética de puntuación clínica de EAE los Grupos A, B, G y H** (Controles negativos para EAE simulados con A, Controles positivos para EAE sin tratar con B, EAE tratada con E con DMF, EAE tratada con H con 200 µg de GNbAc + DMF)

Figura 25. **La cinética de aumento de peso durante el periodo de estudio** (Aumento de peso relativo en comparación con el día antes de la primera inyección de inmunógenos): Grupos A, B, C y D (Controles negativos para EAE simulados con A, Controles positivos para EAE sin tratar con B, C- EAE tratados con 200 µg de GNbAc, EAE tratada con D con 500 µg de GNbAc)

Figura 26. **La cinética de aumento de peso durante el periodo de estudio** (Aumento de peso relativo en comparación con el día antes de la primera inyección de inmunógenos): Grupos A, B, E y F (Controles negativos para EAE simulados con A, Controles positivos para EAE sin tratar con B, EAE tratada con D con SMT, G- EAE tratados con 200 µg de GNbAc + SMT)

Figura 27. **La cinética de aumento de peso durante el periodo de estudio** (Aumento de peso relativo en comparación con el día antes de la primera inyección de inmunógenos): A, B, G y H (Controles negativos para EAE simulados con A, Controles positivos para EAE sin tratar con B, EAE tratada con E con DMF, EAE tratada con H con 200 µg de GNbAc + DMF)

Figura 28. **Cinética del Tiempo en Rotarod a 16 rpm**

Eje X: Días de valores medidos, de acuerdo con el protocolo.
Eje Y: Aumento o pérdida de tiempo en Rotarod, con respecto al Día -7
A: Grupos A, B, C y D; B: Grupos A, B, E y F; C: Grupos A, B, G y H.

Figura 29. **Cinética del Tiempo en Rotarod a 26 rpm**
Eje X: Días de valores medidos, de acuerdo con el protocolo.
Eje Y: Aumento o pérdida de tiempo en Rotarod, con respecto al Día -7
A: Grupos A, B, C y D; B: Grupos A, B, E y F; C: Grupos A, B, G y H.

Figura 30. **Cinética del Tiempo en Rotarod a 29 rpm**
Eje X: Días de valores medidos, de acuerdo con el protocolo.
Eje Y: Aumento o pérdida de tiempo en Rotarod, con respecto al Día -7
A: Grupos A, B, C y D; B: Grupos A, B, E y F; C: Grupos A, B, G y H.

Figura 31. Cinética de puntuación clínica de EAE de todos los grupos durante el periodo de estudio (Controles negativos para EAE simulados con A, controles positivos para EAE tratada de forma simulada con anticuerpos de Isotipo B, EAE tratada con C con 500 µg de GNbAc, EAE tratada con D con Fumarato Sódico y EAE tratada con E con 500 µg de GNbAc + Fumarato Sódico)

Sumario de las abreviaturas usadas

Abreviatura	
3-NT	3-nitrotirosina
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Poliposis coli adenomatosa
C57bl/6	Nombre de una cepa de ratón negro.
CDR	Regiones determinantes de la complementariedad
CIPD	Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica
CNPasa	3'-fosfodiesterasa nucleotídica cíclica
DAPI	diamino-2-fenilindol

(continuación)

Abreviatura	
DMF	fumarato de dimetilo
D-NAME	D-N^G-nitroarginina metil éster
EAE	encefalomielitis autoinmune experimental
eGFP	aumento de proteína fluorescente verde
Env	proteína de envoltura
FBS	suero bovino fetal
FITC	Fluoresceína
GalC	galactocerebrósido
HERV-W	retrovirus endógeno humano de tipo W
huGAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa humana
huiNOS	óxido nítrico sintasa inducible humana
HuSH	Abreviatura para una determinada construcción de ADN
IFA	Adyuvante de Freund incompleto
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRAK1/4	quinasa-1/4 asociada al receptor de interleuquina-1
iv	intravenoso
LAL	lisado de amebrocitos Limulus
LDL	Lípido de baja densidad
L-NAME	N^g-nitro-L-arginina metil éster
LSD	Análisis *a posteriori* de LSD de Fischer = Nombre de ensayos estadísticos
MBP	proteína básica de mielina
MC	Methocel
MOG	Glicoproteína de oligodendrocitos de mielina
EM	Esclerosis Múltiple
MSRV	Retrovirus asociado a Esclerosis Múltiple
NAWM	Materia Blanca de Aspecto Normal
NFκB	potenciador de la cadena ligera κ del factor nuclear de linfocitos B activados
NO	moléculas de óxido nítrico o radicales de óxido nítrico.
SN	Sistema Nervioso
O4	Nombre de un epítopo específico presente en células oligodendrogliales
ODC	ornitina descarboxilasa
OPC	Células precursoras de oligodendrocitos
OPCGS	solución de crecimiento de OPC
OPCM	medio de cultivo de OPC
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PDGFRα	Receptor del factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas de tipo alfa
PFA	paraformaldehído
pGFP	proteína fluorescente verde

(continuación)

Abreviatura	
PTX	toxina Pertussis
QC	Control de Calidad
riNOS	iNOS de rata
RNS	especies reactivas del nitrógeno
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Severa
ETM	error típico de la media
ARNsh	ARN horquillado corto
SMT	S-metil- isotiourea
SNAP	S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
TLR4	Receptor 4 de tipo Toll
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral de tipo Alfa
TRIF	interferón-β de inducción de adaptador que contiene dominio TIR
ΔΔCt	Unidad Estandarizada para cuantificación relativa de ARN

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: El bloqueo de la remielinización inducido por la proteína de envoltura de la familia HERV-W (inhibe la diferenciación de células precursoras oligodendrogliales en lesiones desmielinizadas del sistema nervioso.

1.1 Material y Métodos

1.1.1 Cultivo de células precursoras de oligodendrocitos

Las células precursoras de oligodendrocitos de rata (OPCs) se purificaron como se ha descrito anteriormente[22]. Las OPCs se mantuvieron en medio de proliferación (medio Sato suplementado con 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante y 10 ng/ml de factor AA de crecimiento obtenido a partir de plaquetas humanas recombinantes; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania), mientras que la diferenciación se inició con medio Sato suplementado con suero bovino fetal al 0,5 %. Las células precursoras de oligodendrocitos (hOPC) fetales humanas y los respectivos medios se adquirieron en 3H Biomedical, Uppsala, Suecia. La Env recombinante se produjo y se purificó en PX-Therapeutics (Grenoble, Francia) de acuerdo con las especificaciones de QC de GeNeuro (Ginebra, Suiza) que suministró los lotes de proteína. Los niveles de endotoxina fueron < 5 EU/ml tal como se mide con el ensayo de lisado de amebocito Limulus (LAL). La estimulación de Env se realizó usando tres enfoques diferentes usando i) proteína Env de longitud completa recombinante diluida en medio de diferenciación a 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1000 ng/ml, ii) proteína Env recombinante revestida sobre placas de cultivo celular a una concentración superficial de 17,53 ng/cm^2 y iii) mediante siembra de las OPC en células de glioblastoma U343 transfectadas que sobreexpresan Env, respectivamente. Los experimentos de estimulación de control se realizaron usando la preparación de tampón de Env recombinante (histidina 20 mM, sacarosa al 5 % (p/v), polisorbato 20 al 0,01 % (p/v), pH 6,0) a dilución desiguales. Las mediciones de concentración de NO en sobrenadantes de OPC se realizaron usando un kit de ensayo de óxido nítrico colorimétrico (Merck-Millipore/Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y la absorbancia se determinó 540 nm usando colector de placas Anthos 2001 (Anthos labtec instruments, Salzburgo, Austria). La evaluación de la morfología de OPC se realizó usando un anticuerpo anti-O4 de Merck-Millipore/Chemicon, Darmstadt, Alemania) teniendo en cuenta el diámetro celular y el grado de ramificación del proceso. Los experimentos de inhibidor I de IRAK-1/4 (1-(2-(4-Morfolinil)etil)-2-(3-nitrobenzoilamino)bencimidazol, N-(2-Morfoliniletil)-2-(3-nitrobenzoilamido)-bencimidazol; SigmaAldrich, Hamburgo, Alemania) experiments se realizaron a una concentración de 2400 nM, los experimentos de péptido inhibitorio de TRIF (Invivogen, San Diego, USA) se realizaron a una concentración de 50 µM de acuerdo con los protocolos del fabricante. La inactivación de Env se realizó por exposición de Env recombinante a una temperatura de 123 ºC durante 1 h. Los experimentos del bloqueo del receptor de anticuerpo TLR4 se realizaron a una concentración de anticuerpo de 15 µg/ml. Los experimentos del bloqueo de L-NAME/D-NAME se realizaron a una concentración de 100 µM cada uno; S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) se usó a una concentración de 100 ng/ml.

1.1.2 Precursor de Oligodendrocitos y Transfección de Células de Glioblastoma U343

Las OPCs se cultivaron durante 24 h en medio de proliferación y la transfección se realizó usando el reactivo NanoJuice (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania) usando un ARNsh que codifica vector de supresión de TLR4 basado en el vector HuSH 29 pGFP-V-RS (OriGene, Rockville, Maryland, USA) para prueba de especificidad del anticuerpo anti-TLR4. Para expresión de Env unida a membrana en células de glioblastoma U343, un vector de expresión de citrina[9] para visualización de células transfectadas se combinó con un vector de sobreexpresión de Env (pV14 vector con el nt 1 al nt 1629 de la secuencia de codificación genética de env de tipo HERV-W MSRV - GenBank AF331500.1 – suministrado por Geneuro SA, Suiza) en una proporción de 1:5. Un vector vacío correspondiente se usó como control. La transfección de células de glioblastoma U343 se consiguió usando Lipofectamina (Life Technologies, Darmstadt, Alemania).

1.1.3 Tinciones de Tejido de Esclerosis Múltiple

Para tinciones dobles de Olig2/Env, se cortó tejido de EM humano embebido en parafina fijado con formalina y secciones de 5 µm se desparafinizaron en xileno y se rehidrataron a través de alcohol de calidad de laboratorio en agua destilada. La actividad de peroxidasa endógena se interrumpió por incubación de los portaobjetos en peróxido de hidrógeno al 0,3 % en metanol. A continuación dos portaobjetos se aclararon con agua destilada y se transfirieron a una solución de Tris 10 mM, EDTA 1 mM (pH 9) para conseguir la retirada del antígeno inducido por calor. A partir de ese momento, los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente, se aclararon en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron tanto con anticuerpo 3B2H4 tanto anti-Olig2 (1:300; Merck-Millipore) como anti-Env (1:500, GeNeuro, Ginebra, Suiza) durante una noche a 4 ºC. A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpo de burro-anti-conejo etiquetado con Alexa 488 (1:400; Life Technologies/Molecular Probes, Darmstadt, Alemania) para detectar anticuerpos de cabra-anti-ratón etiquetado con Olig2 y Alexa 555 para visualizar Env. Para dobles tinciones de TLR4/PGRFRα, se cortó tejido congelado de forma instantánea y secciones de 5 µm se incubaron con anticuerpo anti-TLR4 (1:100; Merck-Millipore) y anti-PDGFα (1:50; eBiosciences, San Diego, California, USA) durante una noche a 4 ºC. TLR4 se detectó usando anticuerpos de cabra-anti-ratón etiquetado con Alexa 488 (1:400; Life Technologies/Molecular Probes) y PDGFRα con anticuerpo de conejo-anti-rata biotinilado (1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y estreptavidina etiquetada con Alexa 647 (1:400; Life Technologies/Molecular Probes), respectivamente. Para tinciones nucleares, las secciones se incubaron con solución de tinción de Hoechst (1:100; Sigma-Aldrich, Hamburgo, Alemania) durante 1 minuto y se cubrieron con Vectashield (Vector Laboratories). El análisis microscópico se realizó con un microscopio de barrido láser confocal TCS SP2 AOBS de Leica (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).

1.1.4 Tinciones de Células Cultivadas

Las tinciones de células cultivadas fijadas con paraformaldehído se realizaron como se ha descrito anteriormente[22]. Los anticuerpos primarios se diluyeron como sigue a continuación: anticuerpo anti-TLR4 (1/1000; Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania), anticuerpo 3B2H4 anti-Env (1/500; GeNeuro, Ginebra, Suiza), anticuerpo anti-3'-fosfodiesterasa nucleotídica 2',3'-cíclica (CNPasa) (1/1000; Covance, Princeton, New Jersey, USA), proteína básica anti-mielina monoclonal (MBP; 1/1000; Convance, Princeton, New Jersey, USA), anticuerpo de proteína básica anti-mielina policlonal (1:1000; Millipore, Schwalbach, Alemania), anticuerpo anti-galactocerebrósido (GalC), anticuerpo anti-O4 (ambos a 1/1000; Merck-Millipore, Darmstadt, Alemania); anticuerpo anti-3-NT (1/1000; Abeam, Cambridge, MA, USA) y anticuerpo anti-NFicB (1/1000; Abeam, Cambridge, MA, USA). Anticuerpos conjugados con Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594 (ambos a 1:500,) se usaron para visualización de señales. Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Roche, Basilea, Suiza).

1.1.5 Preparación de ARN, Síntesis de ADNc, y Reacción en Cadena de Polimerasa de Transcripción Inversa Cuantitativa

La purificación de ARN de células cultivadas se realizó usando el procedimiento de RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN aislado se transfirió de forma inversa usando el Kit de Transcripción Inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies/Applied Biosystems). La determinación cuantitativa de los niveles de expresión genética se realizó en un sistema de detección de secuencias 7900HT (Life Technologies/Applied Biosystems) usando la mezcla maestra universal Power SybrGreen (Life Technologies/Applied Biosystems). Las secuencias de cebadores se determinaron usando el software PrimerExpress 2.0 (Life Technologies/Applied Biosystems) y se sometieron al ensayo para la generación del amplicón específico:

TLR4_dir: CTGGGTTTCTGCTGTGGACA (SEQ ID N.º 7)

TLR4_inv: AGGTTAGAAGCCTCGTGCTCC (SEQ ID N.º 8)

riNOS_dir: CTCAGCACAGAGGGCTCAAAG (SEQ ID N.º 9)

riNOS_inv: TGCACCCAAACACCAAGGT (SEQ ID N.º 10)

huiNOS_dir: TGAGGAGCAGGTCGAGGACT (SEQ ID N.º 11)

huiNOS_inv: TGATAGCGCTTCTGGCTCTTG (SEQ ID N.º 12)

huGAPDH_dir: TGGACCTGACCTGCCGTCTA (SEQ ID N.º 13)

huGAPDH _inv: AGGAGTGGGTGTCGCTGTTG (SEQ ID N.º 14)

TNFa_dir: AGCCCTGGTATGAGCCCATGTA (SEQ ID N.º 15)

TNFα_inv: CCGGACTCCGTGATGTCTAAG (SEQ ID N.º 16)

IL1β_dir: GAAACAGCAATGGTCGGGAC (SEQ ID N.º 17)

IL1β_inv: AAGACACGGGTTCCATGGTG (SEQ ID N.º 18)

IL6_dir: GTTGTGCAATGGCAATTCTGA (SEQ ID N.º 19)

IL6_inv: TCTGACAGTGCATCATCGCTG (SEQ ID N.º 20)

GAPDH_dir: GAACGGGAAGCTCACTGGC (SEQ ID N.º 21)

GAPDH_inv: GCATGTCAGATCCACAACGG (SEQ ID N.º 22)

ODC_dir: GGTTCCAGAGGCCAAACATC (SEQ ID N.º 23)

ODC_inv: GTTGCCACATTGACCGTGAC (SEQ ID N.º 24)

GAPDH y ODC se usaron como genes de referencia, y los niveles relativos de expresión genética se determinaron de acuerdo con el método de ΔΔCt (Life Technologies/Applied Biosystems). Cada muestra se midió por cuadruplicado; los datos se muestran como valores de media ± desviación estándar, y el ensayo t se aplicó para determinar la significancia estadística.

1.2 Resultados

1.2.1 Localización de proteína Env cerca de lesiones de EM activas crónicas y en las cercanías de OPCs residentes

Usando análisis inmunohistológicos los investigadores estudiaron la localización de la proteína Env en muestras de tejido cerebral humano. Esto reveló la presencia de una proteína Env bastante abundante en NAWM cerca de las lesiones de EM activas crónicas (CAL, Fig. 1B), así como en los bordes de CALs cerca de las OPCs positivas para Olig2 (Fig. 1C). NAWM en una distancia adicional a las lesiones no mostró una inmunorreactividad de Env discernible (Fig. 1 A). Con el fin de poner en evidencia el impacto potencial de la proteína Env en las OPC residentes y, por lo tanto, en la reparación de la mielina relevante, los investigadores buscaron adicionalmente células OPC doble positivas para TLR4 y receptor alfa del factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGFRa). Los investigadores pudieron detectar las en cerebros sanos (Fig. 1 D-D'") y en NAWM de pacientes con EM (Fig. 1E-E'"). esto demostraba claramente que en el cerebro con EM, las OPCs positivas para TLR4 se pueden detectar en las proximidades de células que expresan Env de HERV-W o de la correspondiente proteína secretada, que las convierte en dianas susceptibles de este agonista patogénico de TLR-4 tal como se ha descrito[10]. Sin embargo, esto constituye un hallazgo inesperado y abre perspectivas de aplicación aún no vistas, ya que previamente se desconocía que TLR4 se expresaba en tales condiciones en las OPCs y aún más, como se resolvió adicionalmente, porque por lo tanto podría no anticiparse que en la proteína de envoltura HERV-W tal como MSRV-Env interactúa directamente con las OPC en esta etapa precisa de diferenciación con efectos impresionantes finales sobre su potencial mielinizante.

1.2.2 Expresión de TLR4 por OPCs de rata y ser humano cultivadas

Los estudios previos habían evidenciado esencialmente un efecto proinflamatorio dependiente de TLR4 en monocitos y células dendríticas[10]. El inmunoetiquetado anti-TLR4 confirmó la expresión de este receptor en la superficie de las células precursoras oligodendrogliales humanas y de rata (Figs. 2C, C' y 5B). Además, la supresión genética específica mediada por ARNsh de TLR4 en las OPCs de rata confirmó la especificidad del inmunoetiquetado previo (Fig. 2B, B'). Con el fin de evaluar la cinética de la expresión del receptor TLR4 de OPC jóvenes a maduras, los investigadores realizaron una tinción conjunta usando anticuerpo anti-galactocerebrósido (GalC), así como anticuerpos anti-proteína básica de mielina (MBP), un marcador para OPC más maduras, después de tres y seis días de diferenciación en cultivo (Fig. 2C-D'). De forma interesante, se encontró que la expresión genética del receptor TLR4 a lo largo del tiempo estaba regulada de forma negativa durante el curso de la diferenciación celular (Fig. 2A), mientras que la detección de proteínas TLR4 específicas solo produjo una señal débil en los puntos de tiempo finales en las OPCs de rata morfológicamente madura (Fig. 2D) en comparación con células más jóvenes.

1.2.3 La estimulación de OPC por Env induce la expresión de citoquinas proinflamatorias y la NO sintasa inducible

La estimulación de las OPCs de rata por proteína Env recombinante disuelta en medio (Env soluble; 100 ng/ml; Fig. 3A), revestida en placas de cultivo celular (Env sólida; Fig. 3B) o sobreexpresada en la superficie de células de glioblastoma

U343 transfectadas (pV14Env La Fig. 3C-E') condujo a un fuerte aumento transcripcional de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), así como a la inducción de citoquinas proinflamatorias tales como TNFα, IL-1β e IL-6 (Fig. 2I-K) en comparación con las condiciones de control (tampón o vector vacío tratado). A su vez, el aumento de la expresión de iNOS condujo a un aumento dependiente de la concentración de Env de su estrés nitrosativo inductor de óxido nítrico (NO) en los sobrenadantes celulares (Fig. 3H). De forma interesante, la morfología de OPC de rata permaneció inalterada durante la estimulación de Env, tal como se muestra con tinciones 04 de oligodendroglía realizadas después de un día y cinco días de exposición a Env (Fig. 3F-G'). También se encontró que las OPC positivas para GalC humanas expresaban TRL4 (Fig. 5B, B') y la estimulación con Env recombinante (tanto en solución como revestida en la superficie de la placa) de forma similar indujo la transcripción de iNOS (Fig. 5A). Además, investigadores observaron que la estimulación de Env no afectaba a la supervivencia de OPC (como se desveló con TUNEL y mediante la cuantificación del número total de células; los datos no se muestran) ni indujo un fenotipo senescente de OPC (investigado por tinciones de β-galactosidasa; los datos no se muestran). La estimulación con Env de OPC de ratas maduras (matOPCs; mantenidas en medio de diferenciación durante seis días) condujo a una reacción proinflamatoria sustancialmente más débil según lo determinado por los niveles de transcripción de iNOS, TNFα, IL-1b e IL-6, en comparación con los efectos sobre OPC inmaduras (Fig. 4). Esta observación está en línea con los niveles de expresión de TLR4 más bajos encontrados en OPC maduras (Fig. 2) y sugiere una sensibilidad superior de las células inmaduras hacia Env en paralelo al nivel de expresión de TLR-4.

1.2.4 Env media sus efectos a través de TLR4 y la respuesta proinflamatoria implica a IRAK-1/4, TRIF y NFkB

Para probar la especificidad de Env hacia TLR4 y arrojar más luz sobre la señalización cadena abajo, los investigadores realizaron una serie de experimentos de control (Fig. 6). La inactivación por calor de Env recombinante antes de la estimulación con OPC condujo a una disminución altamente significativa de la inducción de iNOS en comparación con los controles (Fig. 6A). Se pudo observar una reducción significativa similar de la transcripción de iNOS mediante el bloqueo mediado por anticuerpos de TLR4, confirmando de ese modo la especificidad de Env hacia este receptor y su relevancia con respecto a los efectos proinflamatorios posteriores observados (Fig. 6D). Con el fin de arrojar luz sobre las vías intracelulares después de la activación de TLR4 por Env, los investigadores investigaron las funciones de las dos rutas posteriores conocidas después de la activación de TLR4, la ruta dependiente de MyD88 que implica a IRAK-1/4 (quinasa-1/4 asociada al receptor de interleuquina-1) y la ruta independiente de MyD88 que implica a TRIF (interferón-β inductor del adaptador que contiene dominio TIR). La aplicación del 4 inhibidor I de IRAK-1/ o un péptido inhibidor de TRIF dio como resultado una disminución significativa de los niveles de expresión de iNOS en presencia de Env (Fig. 6B, C) demostrando que la activación de TLR4 mediada por Env conduce a la activación de ambos, dependiente de MyD88 así como la ruta de transducción de señales independiente de MyD88. Ambas rutas pueden converger en la translocación nuclear de NFκB (potenciador de la cadena ligera κ del factor nuclear de linfocitos B activados). Usando anticuerpos anti-NFκB, los investigadores confirmaron que la estimulación de Env conduce a un fuerte aumento de las OPCs con la localización nuclear de NFκB (Fig. 6E-G') proporcionando una explicación para la regulación positiva transcripcional observada de citoquinas proinflamatorias.

1.2.5 Inducción mediada por env del marcador de estrés nitrosativo nitrotirosina

El NO, que aumentó de forma significativa después de la estimulación de Env (véase la Fig. 3H), es una especie reactiva del nitrógeno (RNS). El NO puede reaccionar con una multitud de moléculas intracelulares que incluyen proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que da como resultado la formación de restos de 3-nitrotirosina (3-NT). Los investigadores encontraron que la exposición de las OPCs de rata a la proteína Env recombinante conducía a un fuerte aumento de células positivas para 3-NT en comparación con los controles de tampón (Fig. 7B, B' y C, C') que indican la inducción de estrés nitrosativo mediado por NO. Sin embargo, después de la incubación previa con la molécula inhibidora de iNOS, L-NAME (Nº-nitro-L-arginina metil éster), se observó que la producción de NO disminuía de forma significativa (los datos no se muestran), al igual que la formación de OPC positivas para 3-NT (Fig. 7D, D'). Cuando D-NAME, el enantiómero inactivo de L-NAME, se usó como control negativo, la formación de 3-NT mediada por Env no se vería afectada (Fig. 7E, E'). Por otro lado, la aplicación de SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina), un donante fuerte de NO, sirvió como control positivo y dio como resultado la nitrotirosinilación de casi todas las OPC (Fig. 7F, F'). De manera importante, las OPC positivas para 3-nitrotirosina, desveladas por su expresión del marcador precursor PDGFRα, también se podrían detectar en la NAWM de los cerebros de pacientes con EM (Fig. 7G-G'") indicando que este mecanismo de estrés es de relevancia patológica en la EM.

1.2.6 Env influye en la expresión de mielina de las OPCs

Siguiendo estas observaciones, los investigadores investigaron si la proteína Env puede influir en los procesos de diferenciación oligodendroglial que se muestran necesarios para las actividades de reparación de la mielina. Para esta finalidad, se evaluaron las OPC de rata simuladas por Env para la expresión de las proteínas de mielina CNPasa (3'-fosfodiesterasa nucleotídica 2',3'-cíclica) después de tres días de estimulación con Env y MBP (proteína básica de mielina) después de seis días de estimulación, respectivamente. Los resultados revelaron que Env reducía fuertemente el número de CNPasa y células positivas para MBP (Fig. 8A-D'") a diferencia de la expresión sin cambios del marcador precursor 04 (Fig. 3F-G'). Esto demostró una reacción de diferenciación celular alterada de forma significativa en presencia de la proteína Env. Sin embargo, la adición de L-NAME pero no de D-NAME en paralelo a la estimulación con Env podría rescatar la expresión de MBP (Fig. 8E-H'), lo que evidencia un enlace directo entre la formación de 3-NT a través del estrés nitrosativo y una reducción de la capacidad de diferenciación de OPC.

1.3 Análisis de resultados

Se cree que la remielinización del SN ineficaz en enfermedades desmielinizantes neuroinflamatorias tales como EM se debe principalmente a una capacidad reducida de las OPC residentes para diferenciarse adecuadamente y para remielinizar los axones desmielinizados[11-13], pero no se sabía que una molécula patógena principal y cadena arriba causara este bloqueo de la remielinización. Los estudios previos ya han mostrado que la proteína de envoltura Env de HERV-W, también denominada "elemento retroviral asociado a Esclerosis Múltiple" (MSRV) cuando se obtiene a partir de las correspondientes partículas retrovirales[14], ejerce un efecto proinflamatorio en el sistema inmunitario innato activando células mononucleares que, a su vez, producen citoquinas proinflamatorias importantes[10]. Sin embargo, una relación directa entre Env y una reducción de la capacidad de diferenciación de OPC no se ha previsto hasta ahora, y podría no haberse previsto. En el presente documento los investigadores demuestran que esta proteína Env se puede detectar en tejido del SN afectado por EM y que Env es capaz de interferir con la diferenciación de OPC a través de una presencia desconocida previamente del receptor Env, TLR4, en las OPCs en cierta(s) etapa(s) de diferenciación. Este efecto perjudicial se produce a través de iNOS. Esta respuesta al estrés da como resultado la formación de nitrotirosina y afecta directamente a la expresión de la proteína mielina. De manera interesante, la estimulación de Env no influyó en las tasas de supervivencia de las células OPC y las morfologías celulares permanecieron sin alterar, lo que sugiere que las señales mediadas por Env no se dirigen a elementos del citoesqueleto. Destacando y confirmando la novedad de los presentes hallazgos inesperados, estudios previos han reivindicado una ausencia de TLR4 en células oligodendrogliales en el cerebro humano[15]. Sin embargo, a diferencia de este conocimiento anterior del campo, los investigadores podrían demostrar claramente que TLR4 no solo se expresa en OPC primarias cultivadas (tanto de origen humano como de rata) sino también en OPCs humanas residentes positivas para PDGFRα en tejido de EM. Las diferencias de ese tipo podrían surgir a partir del hecho de que Lehnhardt y sus colaboradores usaron el marcador 04 más general para la detección de células oligodendrogliales, mientras que en su lugar los investigadores confían en el marcador de percursor PDGFR-α recientemente aceptado. Sin embargo, por lo tanto, los investigadores han puesto en evidencia este patrón peculiar de expresión de TLR4 en las OPCs por primera vez, cuando todavía se creía que esto no existía. Además, los investigadores observaron una fuerte regulación negativa de TLR4 durante la maduración de OPC, lo que sugiere que la expresión del receptor y, en consecuencia, la susceptibilidad a Env, se limitan a células inmaduras. Sin embargo, este hallazgo es de relevancia patológica ya que hace que estas células sean capaces de interactuar directamente con la proteína Env que se ha mostrado que se expresa y se libera en lesiones de EM. En vista de estos hallazgos, los investigadores llegan a la conclusión de que la proteína Env de MSRV/HERV-W no solo es un componente inmunopatológico de la EM, sino que también puede ejercer un impacto negativo significativo en las actividades de reparación endógena de la mielina. Por lo tanto, se llega a la conclusión de que una disminución de la capacidad de reparación como se observa en muchos pacientes con EM durante el curso de la enfermedad se debe a la activación de los elementos MSRV/HERV-W[2]. Es de destacar que un estudio anterior describió los efectos experimentales de una proteína Env de HERV-W codificada por una copia defectuosa (incapaz de producir actividad ni partículas de RT ya que no tenía secuencias codificantes en los genes gag y pol) con inserción estable en el cromosoma 7[16]. Esta proteína Env se puede expresar mediante el único gen codificante del elemento 7q de HERV-W (env, o locus ERVW-E1), tiene cuatro aminoácidos de deleción en la parte C-terminal de su dominio de superficie causando aparentemente un enrutamiento celular peculiar y se sabe que tiene expresión *in vivo* al nivel de proteína limitada a la placenta[17, 18]. Esta proteína es, de hecho, un ejemplo de una proteína HERV "domesticada"[17], que ahora desempeña un papel fisiológico en la formación de tejido de sincitiotrofoblastos y, por lo tanto, se denomina "Sincitina"[19]. El correspondiente dominio fusogénico en Env de HERV-W, así como el dominio de unión a TLR4, se pueden conservar más o menos entre los subtipos HERV-W (por ejemplo, MSRV-Env o Sincitina). Su disponibilidad como una proteína de superficie o extracelular con exposición conformacional de un dominio activo está altamente regulada y el papel fisiológico de la Sincitina permanece enterrado en el sincitiotrofoblasto y se limita a la presencia de una placenta. Por lo tanto, parece que una patogenicidad asociada es el sello distintivo de la activación no fisiológica, por ejemplo, por ciertos agentes infecciosos ambientales[20, 21] en seres humanos, o de condiciones transgénicas experimentales *in vitro* o *in vivo*. Se informó que la sincitina se encontraba en la astroglía del SN de individuos con esclerosis múltiple (EM), pero usando un anticuerpo encontrado en cualquier otro lugar se informó de la detección del subtipo MSRV-Env de HERV-W y no Sincitina[22]. Sin embargo, la secuencia de sincitina se podría expresar mediante transgénesis en astrocitos de ratón produciendo la liberación de citoquinas dañinas para los oligodendrocitos[16], pero se desveló que los ratones transgénicos no son viables (comunicación personal de C. Power a H. Perron, simposio de Neurovirologa, San Diego, 2007). Sin embargo, aunque Antony y sus colaboradores encontraron que los oligodendrocitos mielinizantes positivos para adomatosis poliposis coli (APC) eran vulnerables a la citotoxicidad mediada por Sincitina en tales cerebros de ratones transgénicos, los investigadores fueron capaces de demostrar que solamente las OPCs inmaduras son significativamente propensas a señales proinflamatorias mediadas por Env cuando las células maduras no están. Por lo tanto, los resultados de este estudio ahora están apareciendo en resultados de condiciones experimentales usadas relacionadas con sus condiciones de expresión forzada transgénica de una proteína placentaria en células cerebrales. Aunque estos resultados se dedujeron a partir de condiciones artificiales, los investigadores ahora han desvelado un mecanismo perjudicial que se dirige a la capacidad de reparación endógena del sistema nervioso adulto (SN) y no a la patología de la EM como tal, que presenta principalmente una pérdida mediada por el sistema inmunológico de oligodendrocitos y vainas de mielina con daño axonal. De hecho, en la actualidad los efectos mediados por Env en células inmunes en asociación con lesiones inflamatorias del SN están bien documentados[7, 10, 23-25], pero ningún estudio previo había evidenciado una patogenicidad directa de ese tipo de Env de HERV-W en células gliales con una implicación en el bloqueo de la remielinización de placas de EM por las OPC. Los presentes resultados que asocian la inmunohistología cerebral de la EM que muestran una amplia expresión de la proteína Env en placas activas de EM o en

el golpe de lesiones menos activas ahora apoyan un papel de ese tipo en el defecto conocido en la remielinización por OPC en lesiones de EM.

Ejemplo 2: El bloqueo de la remielinización inducido por la proteína de envoltura de la familia HERV-W se trata de forma eficaz con un anticuerpo específico anti-Env.

La proteína de Envoltura de la envoltura de la familia HERV-W (Env, en particular a partir del subtipo de RetroVirus asociado a Esclerosis Múltiple, MSRV-Env) es un inhibidor potente de la capacidad de las OPC no mielinizantes para diferenciarse en oligodendrocitos maduros productores de mielina, que aparece como una etapa crítica en el proceso de remielinización. Los investigadores han investigado el efecto de la proteína MSRV-Env en la expresión de dos marcadores diferentes de la diferenciación de oligodendrocitos:

- CNPasa (3'-fosfohidrolasa nucleotídica 2',3'-cíclica) representa un 4 % de proteínas de mielina totales y está presente en el citoplasma de la vaina oligodendroglial no compactada de axones. La CNPasa es la proteína específica de mielina de la que se supo antes que se sintetizaba mediante el desarrollo de oligodendrocitos.

- MBP (proteína básica de mielina) constituye tanto como un 30 % de proteínas de mielina y desempeñó papel principal en la compactación de mielina en los sistemas nerviosos central y periférico. Aparece de forma secuencial después de la CNPasa tanto *in vivo* con o *in vitro* y es un marcador específico de oligodendrocitos maduros. El objeto del presente estudio fue determinar si el anticuerpo anti-Env específico tal como GNbAC1, un anticuerpo monoclonal lgG4 anti-Env humanizado recombinante, puede bloquear la inhibición de la maduración de OPC inducida por MSRV-Env. De hecho, un efecto de GNbAC1 de ese tipo podría ser indicativo de propiedades de "anti-bloqueo de células remielinizantes" del anticuerpo. Con el fin de someter a ensayos de hipótesis, las OPC humanas en cultivo primario se incubaron con MSRV-Env, con o sin GNbAC1, ya fuera mediante revestimiento de la proteína recombinante en la superficie del cultivo por adición de la proteína en el medio de cultivo. Las expresiones de CNPasa (como un marcador de maduración temprano) y MBP (como un marcador de maduración tardío), se evaluaron mediante inmunocitoquímica después de uno o tres días de estimulación, respectivamente.

En el presente ejemplo, MSRV-Env se refiere a la proteína recombinante MSRV-Env de longitud completa que contiene dominios intracelulares, transmembrana, y extracelulares de la proteína de Envoltura de HERV-W.

Los resultados presentados aquí muestran que las OPC humana se expresan TLR4 de forma específica en su membrana plasmática y demuestran que la proteína recombinante MSRV-Env disminuye de forma específica y significativa el número de células positivas para CNPasa y MBP. Estas observaciones están en línea con las del Ejemplo 1 en OPC humanas y de rata. Además, los experimentos de los investigadores muestran por primera vez que la inhibición (bloqueo) de la maduración de OPC humanas inducida por MSRV-Env se revierte completamente mediante un tratamiento con GNbAC1, lo que demuestra sus propiedades terapéuticas nuevas y previamente inesperadas. En consecuencia esto proporciona una indicación adicional en el tratamiento de formas progresivas de esclerosis múltiple.

2.1 Material y Métodos

2.1.1 Materiales

Materiales usados para cultivo primario de OPC Humanas

	Proveedor	**Referencia**	**Número de lote**
Incubadora celular	ThermoScientific	HePA Class 100	- -
Campana estéril	Fisher Bioblock Scientific	Steril VBH Compact	- -
OPC Humana	3H Biomedical (ScienCell)	1600	10805
OPC Completa	3H Biomedical (ScienCell)	1601	10887
Medio		1652 (OPCGS)	10576
		0503 (P/S)	9846

(continuación)

	Proveedor	Referencia	Número de lote
PBS	Gibco	10010	954270
Matraz T75	Corning	2148R	03412012
Labtek 8 pocillos	Nunc	154534	081711-8-0 081611-8-0
Poli L-Lisina	Sigma-Aldrich	P4707	RNBC2451
Pipetas de 10 ml	Greiner-Bio one	607180	11032401
Pipetas de 5 ml	Greiner-Bio one	606180	11051101

Materiales usados para la evaluación de la expresión de marcadores de maduración en OPC Humanas

	Proveedor	Referencia	Número de lote
PBS	Gibco	10010	954270
Paraformaldehído	Sigma-Aldrich	15,812-7	STBB5309
TritonX100	Fluka	BP151-100	104484
Suero bovino fetal	Sigma-Aldrich	F6178-500ML	090M8404
Anticuerpo Anti-CNPasa	Eurogentec (Covance)	SMI91-R	E11BF00277
Anticuerpo Anti-MBP	Eurogentec (Covance)	SM99	E12DF00468
Anticuerpo Anti- TLR4	AbNOVA	H00007099-M03	11293-1H7
Anticuerpo FITC de Cabra anti-Ratón	Millipore	AP124F	LV1688510
Cubreobjetos	Gerhard Menzel	B7257M	0290880
Medio de montaje Vectashield + DAPI	Vector Laboratories	H1500	X1118
Microscopio Axioscope	Zeiss	- -	- -
AxioCam	Zeiss	- -	- -
Software AxioVision	Zeiss	- -	- -

Materiales usados para la estimulación de OPC con MSRV-Env, GNbAC1 y Tampón MSRV-Env

	Proveedor	Referencia	Número de lote
MSRV-Env Recombinante	PX'Therapeutics	ENV-T	110719-1 (22A)
Tampón MSRV-Env-T	PX'Therapeutics	- -	- -
GNbAC1	Polymun	GNbAC1	T96/bAC1/B1

2.1.2 Protocolos

Incubación de OPC humanas con MSRV-Env, Tampón MSRV-Env y GNbAC1

La MSRV-Env recombinante de longitud completa se produjo y se purificó en PX'Therapeutics (548 aa; 61,44 KDa) (lote 110719-1). La concentración inicial fue 0,6 mg/ml (9,76 µM). El Tampón MSRV-Env (Trizma-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, SDS al 1,5 %, DTT 10 mM) fue proporcionado por PX'Therapeutics. Esta solución se usó como un control negativo. GNbAC1 (Lote T96/bAC1/B1; producción de GMP) se produjo y se purificó en Polymun Scientific, Viena, Austria. La concentración inicial fue 10 mg/ml (68,03 µM).

Las OPC humanas se estimularon con los diferentes tratamientos con soluciones de revestimiento en la superficie de la placa de cultivo celular antes de sembrar las células o añadiéndolas en el medio de cultivo celular después de sembrar las células. En cualquier caso, los portaobjetos de cámara de 8 pocillos Labtek (Nunc) se revistieron previamente con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) durante una noche a 37 ºC.

Revestimiento de los portaobjetos de cámara de 8 pocillos Labtek

Los diferentes tratamientos se diluyeron en PBS en una campana de flujo laminar estéril (Fischer Bioblock, Francia) y los portaobjetos de cámaras de 8 pocillos Labtek 8 (Nunc; 250 µl por pocillo) se revistieron como sigue a continuación:

- MSRV-Env (1 µg/ml) revestido durante 2 horas a 37 ºC
- TAMPÓN MSRV-Env (misma dilución que MSRV-Env) revestido durante 2 horas a 37 ºC
- MSRV-Env + GNbAC1 A1 : mezcla de MSRV-Env (1 µg/ml) y GNbAC1 (7,35 µg/ml = 50 nM) revestida durante 2 horas a 37 ºC
- MSRV-Env + GNbAC1 A2 : mezcla de MSRV-Env (1 µg/ml) y GNbAC1 (29,4 µg/ml = 200 nM) revestida durante 2 horas a 37 ºC
- MSRV-Env + GNbAC1 B1 : MSRV-Env (1 µg/ml) revestido durante 2 horas a 37 ºC, lavado con PBS y posteriormente revestido con GNbAC1 (7,35 µg/ml = 50 nM) durante 1 hora a 37 ºC
- MSRV-Env + GNbAC1 B2 : MSRV-Env (1 µg/ml) revestido durante 2 horas a 37 ºC, lavado con PBS y posteriormente revestido con GNbAC1 (29,4 µg/ml = 200 nM) durante 1 hora a 37 ºC
- GNbAC1 A1 solo : GNbAC1 (7,35 µg/ml = 50 nM) revestido durante 2 horas a 37 ºC
- GNbAC1 A2 solo: GNbAC1 (29,4 µg/ml = 200 nM) revestido durante 2 horas a 37 ºC
- GNbAC1 B1 solo: PBS durante 2 horas a 37 ºC, a continuación revestido con GNbAC1 (7,35 µg/ml = 50 nM) durante 1 hora a 37 ºC
- GNbAC1 B2 solo: PBS durante 2 horas a 37 ºC, a continuación revestido con GNbAC1 (29,4 µg/ml = 200 nM) durante 1 hora a 37 ºC
- BSA (1 µg/ml) revestido durante 2 horas a 37 ºC
- BSA + GNbAC1 A1 : mezcla de BSA (1 µg/ml) y GNbAC1 (7,35 µg/ml = 50 nM) revestida durante 2 horas a 37 ºC
- BSA + GNbAC1 A2 : mezcla de BSA (1 µg/ml) y GNbAC1 (29,4 µg/ml = 200 nM) revestida durante 2 horas a 37 ºC
- BSA + GNbAC1 B1 : BSA (1 µg/ml) revestido durante 2 horas a 37 ºC, lavado con PBS y posteriormente revestido con GNbAC1 (7,35 µg/ml = 50 nM) durante 1 hora a 37 ºC
- BSA + GNbAC1 B2 : BSA (1 µg/ml) revestido durante 2 horas a 37 ºC, lavado con PBS y posteriormente revestido con GNbAC1 (29,4 µg/ml = 200 nM) durante 1 hora a 37 ºC

Cultivo de células precursoras de oligodendrocitos humanos

Las OPC, aisladas de tejido cerebral humano, se adquirieron en ScienCell Research Laboratories (a través de 3H Biomedical, Suecia). Cada vial contiene > 1 x 10^6 células en 1 ml. El medio de cultivo de OPC completo (OPCM) se reconstituyó mediante la adición de solución de crecimiento de OPC (OPCGS), y penicilina/estreptomicina (P/S) Al OPCM de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Sciencell).

El vial que contenía las OPC humanas se puso en a 37 ºC baño con agua y se agitó suavemente mediante rotación hasta que el contenido se descongeló completamente. Las células se volvieron a suspender suavemente con una pipeta Gilson de 1 ml. A continuación, se diluyeron en OPCM completo, y se sembraron en los recipientes de cultivo Labtek de 8 pocillos (7000 células/cm^2= 10000 células por pocillo) revestidos previamente con poli-L-lisina (0,01 %, Sigma) y con (o sin) los tratamientos que se han descrito anteriormente (véase 3.2.1.1) en una campana de flujo laminar estéril (Fischer Bioblock, Francia). Los cultivos se incubaron a 37 ºC; CO_2 al 5 % hasta los experimentos de inmunocitoquímica posteriores. El medio de crecimiento se cambió al día siguiente para retirar el DMSO residual y las células sin unir en los cultivos se trataron durante 72 horas.

Incubación con MSRV-Env en el medio de cultivo

Después de 3 horas de cultivo previo (véase 3.2.1.2) de las OPC humanas en los recipientes de cultivo Labtek De 8 pocillos, las células se incubaron a 37 ºC durante 24 horas o 72 horas en labteks de 8 pocillos (250 µl/pocillo) con la adición de las siguientes soluciones:

- Tampón MSRV-Env, usado como un control negativo, añadido en medio de cultivo celular completo
- MSRV-Env añadido a 3 nM (0,184 µg/ml) en medio de cultivo celular completo
- Mezcla de MSRV-Env (3 nM) + GNbAC1 (200 nM; 29,4 µg/ml) añadida en medio de cultivo celular completo
- GNbAC1 (200 nM) solo añadido en medio de cultivo celular completo

Expresión de TLR4 y marcadores de mielinización en OPC *in vitro*

Después de 24 o 72 horas de incubación, el medio de cultivo celular se retiró y las OPC humanas estimuladas con tratamientos que se han descrito anteriormente (véase 3.2.1) se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA al 4 % en PBS, 250 µl por cámara) a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se lavaron tres veces en PBS (3 x 250 µl por cámara) y los sitios de unión no específicos se saturaron mediante incubación con una solución de suero bovino fetal al 10 % (FBS) en PBS que contenía Triton X100 al 0,1 % (250 µl por cámara) durante 1 hora a 37 ºC. En el caso de tinción de TLR4, las células se incubaron con FBS al 10 % en PBS solo (250 µl por cámara). Después de saturación, los cultivos de OPC se incubaron con soluciones de anticuerpo primario durante una noche a 4 ºC, diluidas en FBS al 10 % en solución de PBS (200 µl por cámara), como sigue a continuación:

- Anticuerpos anti-TLR4 de ratón a 1/1000 (después de 24 y 72 horas de cultivo)
- Anticuerpos anti-CNPasa de ratón a 1/200 (después de 24 horas de estimulación)
- Anticuerpos anti-MBP de ratón a 1/100 (después de 72 horas de estimulación)

Las células se lavaron 3 veces en PBS (3 x 250 µl por cámara), y se incubaron con soluciones de anticuerpo secundario durante 1 hora a 37 ºC (250 µl por cámara), como sigue a continuación:

- Anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con FITC a 1/200

Después de 3 lavados en PBS (3 x 300 µl por cámara) a temperatura ambiente, las cámaras de plástico se separaron de los portaobjetos. A continuación los portaobjetos se montaron con medio de montaje Vectastain® que contenía DAPI (Vectashield). Las tinciones se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio Axioscope (Zeiss).

Análisis de datos

Después de 24 horas de estimulación (o control) con MSRV-Env-T, se hizo el recuento de las células inmunorreactivas para CNPasa en 10 campos por cámara elegidos de forma aleatoria. El porcentaje de células positivas para CNPasa se calculó como:

$$\frac{\textbf{100 x n CNPasa +}}{\textbf{n DAPI}}$$ n CNPasa + = número de OPC inmunorreactivas para CNPasa

Después de 72 horas de estimulación (o control) con MSRV-Env-T, se hizo el recuento de las células inmunorreactivas para MBP en 10 campos por cámara elegidos de forma aleatoria. El porcentaje de células positivas para MBP se calculó como:

$$\frac{\textbf{100 x n MBP +}}{\textbf{n DAPI}}$$ n MBP + = número de OPC inmunorreactivas para MBP

Los datos se presentaron como Media ± ETM de porcentaje de células positivas para CNPasa o MBP. Se realizaron gráficos usando el Software GraphPad, versión 5.00 para Windows (San Diego California USA). Se realizaron ensayos estadísticos no paramétricos usando Sigma Stat (Chicago, IL, USA).

Los siguientes resultados se recogieron durante tres series de experimentos independientes, cada uno de ellos realizados con un nuevo vial de comercial congelado, OPC: OPC ICC 01, OPC ICC 02, y OPC ICC 03.

2.2 Resultados

2.2.1 Expresión de receptores de TLR4 en OPC humanas in vitro

La expresión de TLR4 se evaluó mediante microscopía de inmunofluorescencia. La etapa de saturación realizada sin ningún detergente permite la detección de TLR4 solamente en la superficie celular. Este experimento confirmó la presencia del receptor diana de MSRV-Env en la superficie celular de las OPC humanas después de 24 y 72 horas de cultivo primario (no se muestra).

2.2.2 Expresión de CNPasa y MBP en OPC humanas in vitro

La morfología de OPC humanas *in vitro* se visualizó con microscopía de campo brillante. Las OPC presentaban un cuerpo celular y generalmente dos extensiones celulares. Las expresiones de CNPasa y MBP se confirmaron mediante microscopía de inmunofluorescencia después de 24 horas y 72 horas en cultivo, respectivamente (no se muestra).

2.2.3 Efectos de ENV de MSRV con o sin GNbAC1 en diferenciación de OPC humanas

Efecto de MSRV-Env revestida en expresión de marcadores de maduración en OPC humanas en cultivo primario (OPC ICC 01)

Los objetivos de este primer conjunto de experimentos (OPC ICC 01) fueron establecer las condiciones de cultivo primario de OPC humanas, así como portaobjetos de cámaras de Labtek con revestimiento previo con MSRV-Env y protocolos de inmunotinción de CNPasa y MBP.

Los recipientes de cultivo Labtek se revistieron con 1 µg/ml de MSRV-Env antes de sembrar las OPC humanas. Como un control negativo (tampón), los recipientes de cultivos se incubaron con las mismas condiciones solamente con tampón MSRV-Env.

El porcentaje de células positivas para CNPasa disminuye de forma significativa de un 85 ± 4 % en la condición de control (tampón) a un 69 ± 6 % en las OPC humanas estimuladas durante 24 horas en Labtek revestidas previamente con MSRV-Env (* $p < 0,05$; ensayo t) (Figura 9A).

Después de 72 horas de cultivo con el porcentaje de células positivas para MBP disminuye de forma significativa de un 74 ± 7 % en la condición de control (tampón) a un 25 ± 3 % en Labtek revestidos previamente con MSRV-Env (+Env-T) (* $p < 0,001$ ensayo de Suma de Rango de Mann-Whitney) (Figura 9B). Estos resultados muestran que MSRV-Env inhibe la maduración de las OPC humanas en células mielinizantes *in vitro.*

Efecto de GNbAC1 en la inhibición de la maduración de OPC inducida por MSRV-Env (OPC ICC 02)

Los objetivos de este segundo conjunto de experimentos (OPC ICC 02) fueron confirmar el efecto de MSRV-Env en la diferenciación de OPC humanas, y determinar si MSRV-Env también puede inhibir la diferenciación de OPC humanas cuando la proteína se añade directamente en el medio de cultivo celular. Además, los investigadores también han sometido a ensayo si GNbAC1 puede inhibir los efectos de MSRV-Env en este modelo.

En el caso de estimulación de las OPC humanas en Labtek revestidas previamente con MSRV-Env, los tratamientos con GNbAC1 se evaluaron en dos protocolos diferentes. En primer lugar, los portaobjetos de cultivo Labtek se incubaron previamente con una mezcla de MSRV-Env (1 µg/ml) y GNbAC1 (50 nM o 200 nM) antes de sembrar las OPC (condición GNbAC1-A). El segundo protocolo consistía en un revestimiento secuencial con MSRV-Env (1 µg/ml) seguido de un revestimiento con GNbAC1 (50 nM o 200 nM) antes de sembrar las OPC (condición GNbAC1-B).

Efectos de MSRV-Env y GNbAC1 en la expresión de CNPasa en OPC humanas

Después de 24 horas de estimulación, una disminución significativa del porcentaje de células positivas para CNPasa de un 75 ± 2 % en la condición de control (tampón) a un 55 ± 2 % se observa en Labteks revestidos previamente con 1 µg/ml de MSRV-Env (*$p < 0,001$ con respecto a Tampón; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer). Además, la estimulación en Labteks revestidos previamente con 1 µg/ml de BSA no tiene efecto en la expresión de CNPasa (71 ± 2 %), lo que muestra que el efecto observado con MSRV-Env es específico ya que no se observó con una proteína de control (Figura 10A).

GNbAC1 inhibe de forma significativa la disminución de células positivas para CNPasa inducida en Labteks revestidos previamente con MSRV-Env (Figura 10A). El efecto de GNbAC1 se observa a 50 nM y 200 nM, y en los dos protocolos de tratamiento sometidos a ensayo: (i) condición GNbAC1-A, 50 nM (69 ± 4 %), 200 nM (80 ± 2 %); (ii) condición GNbAC1-B 50 nM (96 ± 3 %) y 200 nM (76 ± 4 %) ($^{\Psi}p < 0,001$,ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fisher). Además, parece que el efecto de GNbAC1 depende de la concentración (Figura 10A).

Los experimentos de control adicionales mostraron que las OPC humanas estimuladas durante 24 horas en Labteks revestidos previamente con GNbAC1 solo (50 nM o 200 nM), o con una mezcla de GNbAC1 (50 nM o 200 nM) + BSA (1 µg/ml) no tenían efecto en la expresión de CNPasa cuando se comparaba con la condición de control (Tampón) ($p > 0,05$;

ANOVA de una vía) (Figura 10B). Estas observaciones se realizaron con los con dos protocolos de tratamiento con GNbAC1 que se han descrito anteriormente (GNbAC1-A 50 nM, GNbAC1 A 200 nM y GNbAC1-B 50 nM).

Este experimento también demuestra que incluso bajas concentraciones de MSRV-Env en solución inducen una disminución significativa del porcentaje de células positivas para CNPasa después de 24 horas, de un 78 ± 2 % en la condición de control (tampón) a un 57 ± 2 % en el grupo de MSRV-Env (*p < 0,001 con respecto a Tampón; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer) (Figura 11). Además, el tratamiento con GNbAC1 (200 nM) antagoniza totalmente la disminución de la expresión de CNPasa inducida por MSRV-Env (76 ± 2 %; $^{\Psi}p$ < 0,001 con respecto a Env-T; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fisher). Es interesante indicar que GNbAC1 200 nM solo (74 ± 2 %) no tiene efecto en la expresión de CNPasa cuando se compara con la condición de control (tampón) (Figura 11).

Efectos de MSRV-Env y GNbAC1 en la expresión de MBP en OPC humanas

Después de 72 horas de estimulación, una disminución significativa del porcentaje de células positivas para MBP de un 76 ± 2 % en controles (tampón) a un 57 ± 1 % se observa en Labteks revestidos previamente con 1 µg/ml MSRV-Env (**p < 0,001 con respecto a Tampón; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer) (Figura 12A). En este experimento, el cultivo de OPC en Labteks revestidos previamente con BSA (1 µg/ml) muestra un porcentaje de células positivas para MBP ligeramente diferente del control (tampón) (69 ± 2 %). Sin embargo, el efecto de BSA también es significativamente diferente del efecto de MSRV-Env (p < 0,001 con respecto a Env-T; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer), y por lo tanto desvela que es un efecto aislado y no influyente en esta serie experimental solamente, dado que no se observa en otros experimentos o con CNPasa en la misma serie.

GNbAC1 inhibe de forma significativa la disminución de células positivas para MBP inducida en Labteks revestidos previamente con MSRV-Env (Figura 12A). Un efecto parcial de GNbAC1 se observa la 50 nM, y una inhibición completa se consigue a 200 nM, y en ambos protocolos de tratamientos sometidos a ensayo: (i) GNbAC1-A 50 nM (69 ± 2 %) y 200 nM (73 ± 2 %) y, (ii) GNbAC1-B 50 nM (68 ± 2 %) y 200 nM (74 ± 2 %) ($^{\Psi}p$ < 0,001 con respecto a Env-T; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fisher). Además, parece que el efecto de GNbAC1 depende de la concentración (Figura 12A).

Este experimento también demuestra una disminución significativa del porcentaje de células positivas para MBP de un 76 ± 2 % en la condición de control (tampón) a un 55 ± 2 % en las células estimuladas con MSRV-Env añadidas en el medio de cultivo (3 nM) durante 72 horas (*p < 0,001 con respecto a Tampón; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fischer) (Figura 12B). Además con el tratamiento con GNbAC1 (GNbAC1 200 nM) inhibe completamente la disminución de la expresión de MBP inducida por MSRV- Env (76 ± 2 %; Ψp < 0,001 con respecto a Env-T; ANOVA de una vía seguido de análisis *a posteriori* de LSD de Fisher) (Figura 12B).

Confirmación de efectos de GNbAC1 en la inhibición de la diferenciación de OPC inducida por MSRV-Env (OPC ICC 03)

Aunque los resultados que se han descrito anteriormente se obtuvieron a partir de una cantidad considerable de datos recogidos con el objetivo de este tercer conjunto de experimentos (OPC ICC 03) fue la replicación completa del efecto de GNbAC1 en series de experimentos totalmente independientes.

Efectos de MSRV-Env y GNbAC1 en expresiones de CNPasa y MBP en cultivos de OPC humanas

Después de 24 horas de estimulación, una disminución significativa del porcentaje de células positivas para CNPasa de un 90 ± 1 % en la condición de control (tampón) a un 71 ± 1 % se observa en Labteks revestidos previamente con MSRV-Env (1 µg/ml) (*p < 0,05; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Student Newman Keuls) (Figura 13A). Como se ha descrito anteriormente, GNbAC1 (200 nM) revierte completamente la inhibición de la expresión de CNPasa inducida por MSRV-Env en los dos protocolos de tratamientos con GNbAC1 sometidos a ensayo (GNbAC1-A: 90 ± 2 %, GNbAC1-B: 91 ± 4 %) (Ψp < 0,05 con respecto a Env-T; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Dunn) (Figura 13A).

Después de 72 horas de estimulación, una disminución significativa del porcentaje de células positivas para MBP de un 78 ± 2 % en la condición de control (tampón) a un 55 ± 3 % se observa en Labteks revestidos previamente con MSRV-Env (1 µg/ml) durante 72 horas (*p < 0,05 con respecto a tampón; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Dunn) (Figura 13B). Como se ha descrito anteriormente, GNbAC1 (200 nM) revierte completamente la inhibición de la expresión de MBP inducida por MSRV-Env en los dos protocolos de tratamientos con GNbAC1 sometidos a ensayo (GNbAC1-A: 80 ± 2 %, GNbAC1-B: 75 ± 2 %) ($^{\Psi}p$ < 0,05 con respecto a Env-T; Kruskal-Wallis ANOVA-1 en Rangos seguido de análisis *a posteriori* de Dunn) (Figura 13B).

Datos combinados de experimentos OPC ICC 02 y OPC ICC 03

Los resultados obtenidos en las dos series de experimentos diferentes (OPCICC02 y OPCICC03) presentados anteriormente, se combinaron en el mismo análisis. Por lo tanto los datos representados de la figura 14 representan de 8

a 14 experimentos independientes para CNPasa (Figura 14A) y MBP (Figura 14B). Este análisis muestra que los efectos de MSRV-Env y GNbAC1 en la diferenciación de las OPC humanas Son altamente reproducible si coherentes.

Con el fin de normalizar la expresión de los datos, la condición de control (tampón) se usó como referencia y se consideró como un 100 %. En resumen, estos resultados muestran que las concentraciones de MSRV-Env usadas en la presente serie inhiben en un 24 % el número de células positivas para CNPasa (CTRL: 100 ± 1 %; ENV: 76 ± 1 %) y un 27 % del número de células positivas para MBP (CTRL: 100 ± 2 %; ENV: 73 ± 2 %). GNbAC1 (200 nM) revierte completamente el efecto de MSRV-Env en la expresión de CNPasa (GNbAC1-A: 102 ± 1 %; GNbAC1-B 101 ± 1 %) (Figura 15A), pero también el efecto en la expresión de MBP (GNbAC1-A: 101 ± 2 %; GNbAC1-B 97 ± 2 %) (Figura 15B).

2.3 Análisis de resultados

En consecuencia, los datos del presente ejemplo muestran que Env de MSRV induce una disminución robusta y altamente reproducible en la expresión de dos marcadores específicos diferentes de maduración de oligodendrocitos. Por lo tanto, Env de MSRV inhibe la diferenciación de precursores de oligodendrocitos humanos en células mielinizantes. Además, en el presente documento los investigadores demuestran claramente que GNbAC1 revierte completamente este efecto perjudicial de Env de MSRV, y restablecer los niveles normales de CNPasa y MBP en este modelo. Estos resultados muestran que GNbAC1 trata el bloqueo de la diferenciación de las OPC inducido por HERV-W/MSRV-Env. Por lo tanto, estos resultados apoyan fuertemente una indicación innovadora de GNbAC1 para tratar lesiones desmielinizadas inducidas por proteínas de envoltura HERV-W. Esto se aplica en particular a las formas progresivas de esclerosis múltiple para las cuales la remielinización es crítica pero no se produce en OPC que rodean lesiones de EM, debido a células positivas para Env persistentes y secreción como se muestra en el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Estudio de los efectos terapéuticos de anticuerpo GNbAC1, L-NAME, SMT, DMF o Fumarato sódico en modelo murino Experimental de Encefalomielitis Alérgica (EAE) inducida con glicoproteína oligodendrocítica de Mielina (MOG) y la proteína de envoltura de MSRV/ HERV-W (Env).

3.A Comparación entre moléculas individuales (monoterapia) y asociaciones de un anticuerpo anti-Env con moléculas pequeñas que inhiben efectores inducidos por Env en bloqueo de OPC (terapia combinada).

3.A.1. Material

Ratones C57BL/6 de Charles River.

MOG 35-55 EspiKem, Srl (compañía Polypeptide); referencia: SC1272.

GNbAc1; lote T950111-8 (anticuerpo de lgG4 humanizado Anti MSRV/HERV-W que comprende cada una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) que se presentan en las SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3 SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5 y SEQ ID N.º 6.

L-NAME (NG-Nitro-L-Arginina Metil Éster) Sigma; referencia: N5751-5G lote BCBF4375V

SMT (S) Hemisulfato de metilisotiourea (Sigma); referencia: M84445-100G lote STBC1003V

Fumarato de dimetilo (DMF) Sigma; referencia: 242926-100G lote 2507VBCBH

Methocel MC Sigma; referencia: 64605-100G lote BCBD9989V

IFA (Sigma) Sigma referencia: F5506-10ML lote:061M8728

PTX (Toxina Pertussis; Calbiochem); Referencia: 516561 lote D00128881

PBS (Solución salina tampón fosfato; Lonza); Referencia 516561; lote; D00128881

Env (P'X Therapeutics); Lotes de producción de proteína purificada validados como sin endotoxina (ensayo de LDL < 5 UI/ml) y bioactivo (ensayos de QC internos de Geneuro).

Aparato Rotarod (LE8200; Bioseb Francia)

3.A.2. Métodos

Los ratones C57BL/6 hembra sin patógenos (6 - 8 semanas de edad) se adquirieron en los laboratorios Charles River y se mantuvieron en las instalaciones para animales durante una semana antes de su inmunización. Un día antes de la inmunización, todos los ratones se han pesado, y a continuación se evaluaron en el Ensayo de Rotarod. Rotarod:
Días de entrenamiento: 9 y 8 días antes de la inmunización. Transferencia de los ratones, en sus jaulas de alojamiento, desde la habitación de mantenimiento a la habitación experimental. Los ratones se habitúan a la habitación experimental

durante 15 min. Durante el periodo de entrenamiento, cada ratón se puso en el rotarod a una velocidad constante (4 rpm) si un ratón se caía, se ponía de nuevo en el rotarod, a continuación los ratones estaban cómodos en el rotarod, los ratones vieron corriendo durante 120 s. Todos los ratones se devolvieron a su jaula, la velocidad se aumentó a 13 rpm y los ratones se pusieron de nuevo en el rotarod durante 120 s. Todos los ratones se devolvieron a su jaula, la velocidad se aumentó a 19 rpm y los ratones se pusieron de nuevo en el rotarod durante 120 s. El entorno de la habitación experimental se mantuvo constante entre sesiones de ensayo con respecto a temperatura e intensidad de la luz.

Días de ensayo:

1 día antes de cada inmunización, los ratones se transfirieron en sus jaulas de alojamiento, desde la habitación de mantenimiento a la habitación experimental. Los ratones se habituaron a la habitación experimental durante 15 min. A continuación los ratones recibieron dos ensayos a 10 niveles crecientes de velocidad, que variaban de 7 a 40 rpm. Los retrasos individuales antes de caerse del rotarod (para los dos ensayos a cada nivel de velocidad) se registraron hasta 60 s. Por lo tanto, el entrenamiento y el rendimiento en el sistema Rotarod se determinaron para cada animal.

Los resultados del ensayo ROTAROD se expresan como cinética de la media de puntuaciones individuales para cada grupo con ETM indicada con barras, para cada día del ensayo y para cada velocidad del ensayo dentro del rango de discriminación para alteración neuromotora en las presentes condiciones (de 16 a 29 rpm).

Se calculan para cada ratón individual, para cada día de ensayo y para cada valor de velocidad, como el aumento o pérdida relativa de tiempo o en el Rotarod (antes de caer), en comparación con el primer día de ensayo a la misma velocidad (D-7, antes de comenzar la inducción de la enfermedad en los grupos relevantes). El valor se calcula como "Tiempo en Rotarod el día X" - "Tiempo el Día-7 para el mismo ratón a la misma velocidad". Las Figuras ilustran la cinética para los diferentes grupos en todo el periodo de estudio, para valores de velocidad discriminatoria relativa representativos cuando se validan para diferenciar los animales enfermos de los sanos en las condiciones de los investigadores (por ejemplo, valores de velocidad demasiada elevada o demasiado baja Ya se ha hecho dos para los sanos que caen inmediatamente o para los enfermos capaces de mantener un movimiento lento).

Los datos iniciales de pesos y rendimientos sirvieron como referencias para los investigadores, en un entorno en el que cada animal ha sido su propio control, antes de calcular los valores medios y desviaciones estándar por grupo. En cada jaulas se alojaron de forma homogénea diferentes grupos de animales, de acuerdo con la información correspondiente proporcionada antes de cada serie experimental.

Evaluación Clínica

Los animales se pesaron y se puntuaron clínicamente 5 días por semana de acuerdo con los siguientes criterios: 0 = sin signos; 1 = parálisis de la cola o hiperreflejo de la pata(s) trasera(s) o debilidad unilateral de la pata trasera; 2 = debilidad bilateral de la pata trasera o la pata delantera; 3 = más parálisis unilateral o déficit principal; 4 = parálisis completa de la pata trasera o la pata delantera; 5 = más parálisis parcial o déficit principal de patas opuestas; 6 = moribundo o muerto. Éstos se adaptaron a partir de criterios convencionales, con el fin de reflejar la inducción más rápida de lesiones cerebrales y del cordón cervical con este modelo.

Los ratones expresaron 3 veces a la semana el Lunes, el Miércoles y el Viernes durante todo el experimento.

Para las series experimentales del Ejemplo 3.A, los grupos se definieron como sigue a continuación.

Todos los grupos de 6 (seis) ratones se han inyectado primero por s.c. en el cuello el día 0 y a continuación en los costados dorsales los días 7 y 14; con 200 µg de MOG/ratón + 60 µg de MSRV-Env + IFA.

El Grupo A fue el grupo de control positivo de EAE inducida por MSRV-Env sin ningún tratamiento.

Para los Grupos G a H, los tratamientos con GNbAc1, L-NAME, SMT y DMF solos o en combinación con GNbAc1 con las dosis que se indican a continuación, se han iniciado el día 12 después de la inmunización cuando la progresión de los síntomas clínicos de EAE ya se observaba. El anticuerpo humanizado GNbAc1 se administró una vez, pero L-Name o SMT se administró cada 4 días hasta la finalización del estudio el día 29. Con respecto a los Grupos E y H, atribuidos para el tratamiento con DMF, los investigadores han determinado previamente el volumen de consumo diario de agua por cada ratón y se ha determinado que (en la condición de los investigadores), cada ratón consumió aproximadamente 3,5 ml de agua potable al día. Por lo tanto, basándose en esta medición, una dosis de 1 mg de DMF+ Methocel al 0,08 % por ratón se añadió a 3,5 ml de agua potable diariamente.

350 ng de toxina Pertussis (PTX) por animal se inyectaron (i.p.) en todos los grupos el mismo día después de cada inyección de inmunógeno, y se replicó 2 días más tarde, como es habitual en protocolos de EAE con el fin de facilitar la migración de linfocitos a través de la barrera hemato - encefálica.

Presentación resumida de los Grupos experimentales del Ejemplo 3.A

Grupo	**MOG (µg)**	**Env**	**Diluyente**	***PTX***	**GNbAc1**	**L-NAME**	**SMT**	**DMF**	**n = 48**
A: EAE Sin tratar	200	+	I FA	+	-	-	-	-	6
B: GNbAc1	200	+	I FA	+	+	-	-	-	6
C: L-NAME	200	+	I FA	+	-	600 µg/ 500 µl de IP	-	-	6
D: SMT	200	+	I FA	+	-	-	1 mg en 500 µl de IP	-	6
E: DMF	200	+	I FA	+	-	-	-	1 mg + Methocel al 0,08 % en 35 ml de agua potable. Diario.	6
F: GNbAc1 + L-NAME	200	+	I FA	+	+	600 µg/ 500 µl de IP	-	-	6
G: GNbAc1 + SMT	200	+	I FA	+	+	-	1 mg en 500 µl de IP	-	6
H: GNbAc1 + DMF	200	+	I FA	+	+	-	-	1 mg + Methocel al 0,08 % en 35 ml de agua potable. Diario.	6

3.A.3 Resultados:

Observaciones clínicas:

La puntuación de signos clínicos y el peso se evaluaron regularmente como se ha descrito anteriormente. La cinética de puntuación de EAE durante el periodo de estudio se representa en las Figuras 16, 17 y 18.

Una evolución regular y persistente de puntuaciones clínicas de EAE tales como hiperreflexia, parálisis de la cola, debilidad de la extremidad posterior, debilidad de la extremidad anterior y parálisis parcial se pudo registrar en todos los ratones hasta el final o la experiencia en el grupo A (control positivo para EAE) y hasta el día 12 en otros grupos que se habían tratado el día 12 con anticuerpo humanizado de GNbAc1 (grupo B) o anti radicales libres (grupo C, D, E) solo o los grupos que se han tratado de forma simultánea con GNbAc1 y anti radicales libres (grupos F, G, H).

Observaciones después del tratamiento: Los signos clínicos en el grupo B tratado solo una vez con GNbAc1 disminuyeron ligeramente hasta el día 29. En los grupos tratados solamente con L-NAME, SMT, se pudo observar una recuperación irregular, pero con una reducción de la progresión de EAE. Se debería mencionar que, en el día +16, la inyección de SMT se interrumpió.

Con respecto a los grupos F, G y H tratados de forma simultánea con GNbAc1 y L-NAME, SMT and DMF respectivamente, y la recuperación fue mucho más significativa y en particular en los grupos G y H. Estos resultados sugieren que los efectos sinérgicos aceleran y aumentan de forma significativa la recuperación de los síntomas de EAE. También merece la pena mencionar que el tratamiento con estas sustancias no causó ninguna anomalía en ningún grupo de ratones (incluyendo los ratones de control sometidos a ensayo por separado).

De acuerdo con los resultados que se presentan en las Figuras 16, 17 y 18, los investigadores pueden resumir que:

- la puntuación clínica más elevada (peor evolución de enfermedad) se pone en evidencia en animales sin tratar (grupo A). Los animales tratados solamente con GNbAC1 (grupo B) mejoran después de su inyección (comenzando a partir del día 12).

- los grupos tratados solamente con L-Name o SMT presentaban puntuaciones de recuperación y cinética más bajas que el grupo B.

- el grupo E tratado con DMF y el grupo F tratado con anticuerpo GNbAC1 (dosis individual de 200 µg) combinado con L-NAME presentaba una recuperación equivalente al final del estudio.

- el grupo G tratado anticuerpo GNbAC1 combinado con SMT y el grupo H tratado con anticuerpo GNbAC1 combinado con DMF presentaba una recuperación significativamente mejor al final del estudio y una cinética más temprana de mejora clínica que todos los otros grupos. Esto demuestra la ganancia sinérgica de la combinación de GNbAC1 y SMT, o GNbAC1 y DMF, para un resultado terapéutico significativamente mejorado.

Ensayo de Rotarod

En primer lugar se debería hacer explícito que los Grupos etiquetados como "1 iny" y "2 iny" en la Figura 19 corresponden a animales de control inyectados solamente una vez (1) o dos veces (2) con proteína Env y antígeno MOG, en comparación con las tres inyecciones de proteína Env y antígeno MOG necesarias para inducir EAE clínicamente evidente al igual que en todos los otros grupos. Representan ratones de control para Env por debajo del umbral patogénico y sin inducción de enfermedad clínica. Confirman que con el fin de tener todos los animales sometidos a ensayo con diversos tratamientos inducidos para desarrollar una sintomatología y evolución de EAE aguda y severa, fue necesario este patrón de tres inyecciones. Por lo tanto, los efectos terapéuticos observados en los animales tratados son relevantes para una eficacia del tratamiento en condiciones de enfermedad en desarrollo y evolucionando.

De acuerdo con los resultados que se presentan en la Figura 19 con puntuación de Rotarod a 23 rpm, los investigadores pueden observar que:

- El esfuerzo físico a 23 rpm ha alcanzado un umbral suficiente para resolver las disfunciones sensoriales y motoras principales en animales: el grupo A sin tratar tiene el resultado y cinética peores, mientras que los animales a los que se les inyecta solamente una o dos veces ("1 iny o 2 iny") tienen síntomas significativamente más leves y una evolución mucho mejor. El déficit clínico peyorativo y progresivo del grupo B sin tratar confirma que la enfermedad y las correspondientes lesiones del SN eran muy activas con 3 inyecciones de Env. Por lo tanto, todos los otros grupos con diversos tratamientos se sometieron a una inducción de la enfermedad potente similar con Env.

- El Grupo B con EAE tratada con una sola inyección de 200 µg de GNbAC1 ha recuperado una puntuación similar a la de los ratones de control sin inducción de enfermedad con baja exposición a Env, al final del periodo de estudio.

- El efecto más digno de atención, en estas condiciones, se pone en evidencia para el grupo G tratado con anticuerpo GNbAC1 combinado con SMT que parece que tiene una curva de cinética de recuperación sorprendente que termina con la mejor puntuación de todos los grupos al final del estudio. Esto demuestra el aumento sinérgico de la combinación de GNbAC1 y SMT para un resultado terapéutico significativamente mejorado.

- El Grupo D tratado solamente con SMT también presenta una mejora de la cinética y resultados (último punto del periodo de estudio), aunque en menor medida.

De acuerdo con los resultados que se presentan en la Figura 20 con puntuación de Rotarod a 26 rpm, los investigadores pueden observar que:

- El esfuerzo físico a 26 rpm confirma que estas condiciones están por encima del umbral requerido dentro del presente experimento para resolver las funciones sensoriales y motoras principales en animales: el grupo A sin tratar tiene el resultado y cinética peores, mientras que los animales a los que se les inyecta solamente una o dos veces ("1 iny o 2 iny") tienen síntomas significativamente más leves y una evolución mejor (puntuaciones muy buenas al final del periodo de estudio para el grupo "1 iny").

- El Grupo B con EAE tratada con una sola inyección de 200 µg de GNbAC1 ha recuperado una puntuación similar a la de los grupos D, G, C, E y H y a la de los controles de "2 iny", al final del periodo de estudio.

- El efecto más digno de atención, en estas condiciones, se pone en evidencia para el grupo F tratado con anticuerpo GNbAC1 combinado con L-NAME que parece que tiene una curva de cinética de recuperación sorprendente que termina con la mejor puntuación de todos los grupos al final del estudio. El Grupo C tratado solamente con L-NAME también presenta una mejora de la cinética y resultados, aunque en menor medida. Esto demuestra el aumento sinérgico de la combinación de GNbAC1 y L-NAME para un resultado terapéutico significativamente mejorado.

De acuerdo con los resultados que se presentan en la Figura 21 con puntuación de Rotarod a 29 rpm, los investigadores pueden observar que:

- El esfuerzo físico a 29 rpm todavía confirma que estas condiciones están por encima del umbral requerido para resolver las funciones sensoriales y motoras principales en animales: el grupo A sin tratar tiene el resultado y cinética peores, mientras que los animales a los que se les inyecta solamente una o dos veces ("1 iny o 2 iny") tienen síntomas significativamente más leves y una evolución mejor con buenas puntuaciones similares al final del estudio.

- El Grupo B con EAE tratada con una sola inyección de 200 µg de GNbAC1 ha recuperado una puntuación similar a la de los ratones de control sin inducción de enfermedad con baja exposición a Env, al final del periodo de estudio.

- El efecto más digno de atención, en estas condiciones, se pone en evidencia para el grupo F tratado con anticuerpo GNbAC1 combinado con L-NAME que todavía parece que tiene una curva de cinética de recuperación buena que termina con la mejor puntuación de todos los grupos (final del estudio). El Grupo C tratado solamente con L-NAME presenta una mejora de la cinética y resultados, aunque en menor medida.

- Otro resultado digno de atención general es la mejor a regular de ratones del grupo B tratados solamente con GNbAC1, que siempre presentó puntuaciones estabilizadas y/o mejoradas en gran medida en comparación con los animales sin tratar (grupo A) en todas las condiciones (ensayos de 16 a 29 rpm).

Sin embargo, esta eficacia evidente desveló en gran medida el énfasis por la combinación de GNbAc1 con L-NAME o SMT. También se mejoró con la combinación con DMF, pero con cinética más lenta. De todos modos, esto no impide una mejora más elevada con dosis optimizadas y con un tratamiento a plazo más largo.

Por lo tanto, en todas las condiciones de ensayo (incluyendo puntuación clínica) la combinación de SMT, L-NAME o DMF con GNbAC1 proporciona una ventaja significativa para recuperación clínica y funcional, con respecto al uso de cualquier molécula terapéutica administrada sola. Tomadas de forma individual, parece que las moléculas pequeñas tienen efectos más bajos y bastante transitorios, mientras que el GNbAC1 tiene efectos de larga duración que proporcionan una mejor recuperación al final del estudio en comparación con estos fármacos pequeños, que de ese modo muestran una eficacia prolongada.

Al verse mejorada de forma significativa la cinética y la amplitud de la recuperación final con las combinaciones, ahora se muestra una ventaja del uso de una combinación de los presentes agentes terapéuticos para sus efectos enérgicos y dirigidos en la recuperación final *in vivo.* Esto demuestra una indicación para una eficacia clínica más temprana y más potente en la enfermedad en seres humanos.

3.B. Comparación de la eficacia terapéutica de dos dosificaciones de anticuerpo anti-Env administrados solo como monoterapia, o en combinación con fármacos anti-NO.

3.B. 1 Materiales y Métodos:

Cuando no se especifica, todos los materiales y métodos son cómo se describieron para el Ejemplo 3A.

Grupos experimentales

Presentación resumida de los Grupos experimentales del Ejemplo 3.B

Grupo	MOG 200 µg	ENV 60 µg	DILUYENTE	PTX 350 ng	GnbAc1	SMT	DMF
A ctrl -	+	/	IFA	+	/	/	/
B ctrl +	+	+	IFA	+	Placebo	/	/
C GNbAc1	+	+	IFA	+	200 µg	/	/
D GNbAc1	+	+	IFA	+	500 µg	/	/
E SMT	+	+	IFA	+	200 µg	+	/
F SMT	+	+	IFA	+	500 µg	+	/
G DMF	+	+	IFA	+	200 µg	/	+
H DMF	+	+	IFA	+	500 µg	/	+

Todos los ratones recibieron tres inyecciones s.c. en el cuello a DO, en el costado dorsal a D7 y D14. Aquí, a los ratones del Grupo A se les inyectaron 200 µg/ratón de MOG e IFA solo, sin Env, constituyendo de ese modo un grupo de control negativo sin EAE en la presente serie (ctrl -). El grupo de control positivo con EAE sin tratar en la presente serie se representa con el Grupo B (ctrl +). A otros grupos se les inyectaron 200 µg de MOG/ratón + MSRV-ENV (60 µg) + IFA, con tratamientos como se ha indicado en la presentación resumida que se ha mencionado anteriormente. Los tratamientos se han comenzado el día 12 después de la inmunización en sus grupos correspondientes.

Los Grupos C, E, G recibieron 200 µg de GnbAc1 en J12; los Grupos D, F, H recibieron 500 µg de GnbAc1 en J12; el Grupo B recibió solamente solución tampón de GNbAc1.

Los Grupos E y F decidieron inyección I. P de SMT (200 mg/ratón) dos veces a la semana en J12, J14, J19, J21, J26 y J28.

Para los Grupos G y H que reciben DMF, los investigadores han determinado previamente el volumen de Consumo de agua diaria por cada ratón y se ha observado que (en la condición de los investigadores), cada ratón consumía aproximadamente 3,5 ml de agua potable al día. Por lo tanto, basándose en esta medición, una dosis de 2 mg de DMF+ Methocel al 0,08 % por ratón se añadió al 3,5 ml de agua potable al día.

Para cada velocidad de ensayo de rotarod, los resultados se validaron cuando las curvas que correspondían a los ratones sin tratar EAE inducida por Env (Grupo B, que representa controles positivos con EAE sin tratar) mostraban un déficit significativo en comparación con los controles simulados (Grupo A, inmunizado con MOG diluido en IFA sin proteína Env). Los resultados se consideraron "no interpretables" cada vez que tal criterio no se emparejaba, dado que las correspondientes condiciones técnicas y experimentales no pasaban el control de calidad basándose en esta divergencia significativa de curvas de grupos de "EAE positiva con respecto a negativa".

Después del día 20, se realizó una inyección intravenosa (I.V.) con 20 µg de MSRV-Env en solución salina fisiológica para crear una estimulación aguda sistémica por la proteína MSRV-Env en todos los ratones, cuando se había obtenido una mejora clínica significativa (similar a una remisión) con la mayoría de los tratamientos en ratones con EAE. Esto se realizó el día D21, para ratones de los grupos B, D, F y H, o en el día D22, para ratones de los grupos A, C, E y G. Esto se realizó con el fin de estudiar la respuesta de los diferentes grupos a una antigenemia de Env aguda y para evaluar diferencias eventuales en la eficacia protectora de diversos tratamientos.

3.B.2 Resultados:

Observaciones Clínicas

La puntuación de signos clínicos y peso se evaluaron regularmente como se ha descrito anteriormente. La cinética de puntuación clínica de EAE durante el periodo de estudio se representa en las Figuras 22, 23 y 24. Las curvas de peso, que indican un aumento de peso relativo en comparación con el día antes de la primera inyección de inmunógenos, se presentan en las Figuras 25, 26 y 27.

Ensayo de Rotarod

Los resultados de los ensayos de Rotarod se presentan a diferentes velocidades (16; 26; 29 rpm) en las Figuras 28, 29 y 30.

Esta serie de experimentos se dirigían a la influencia de un medio (200 µg) con respecto a elevado (500 µg) de anticuerpo GNbAC1 terapéutico como una monoterapia y se hicieron comparaciones similares cuando se combinaba con SMT y de DMF.

La comparación global de las curvas de puntuación clínica durante el periodo de estudio se han validado dado que (i) la EAE inducida por Env sin tratar (grupo B) tiene la evolución más peyorativa y (ii) los controles inmunizados de forma simulada sin EAE (grupo A) no tienen señales clínicas detectables durante el periodo precedente a la inyección intravenosa (I.V.) de Env en el día 20.

Hasta esta inyección iv en el día 20, todos los grupos tratados eran notable y marcadamente diferentes de la EAE inducida por Env sin tratar. En el Día 20, los grupos tratados con diferentes simétricas de enfermedad durante el periodo de estudio presentaban una puntuación comparable con un valor medio por debajo de 0,5, lo que indica un período de revisión en todos los grupos tratados. Que confirmó una eficacia de todas las dosificaciones de anticuerpo y de todas las combinaciones sometidas a ensayo con cualquiera de DMF o SMT.

A partir de ese momento, la estimulación con inyección intravenosa (iv) de proteína Env en el día 20, imitó a un pico de expresión de Env y su liberación en el torrente sanguíneo, tal como se esperaba durante el inicio de una recaída nueva y severa de la enfermedad de origen natural. Como se muestra en las Figuras 22, 23 y 24, tiene diferencias significativas en la potencia terapéutica de los diferentes productos y dosis:

1) GNbAC1 desveló ser muy eficaz para transmitir resistencia a este pico de antigenemia de Env a dosificación de 500 µg (grupo D), pero una alteración clínica transitoria se observó con una dosificación de 200 µg (grupo C).

2) En el caso de combinación con SMT, no se observaron variaciones significativas de la puntuación clínica en ambas dosificaciones de GNbAC1 (grupos E y F). Por lo tanto SMT transmitió un aumento de la resistencia a la estimulación IV con MSRV-Env a ratones tratados con la dosificación más baja de GNbAC1 (200 µg) en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo solo a esta dosis más baja (Grupo C).

3) Los ratones tratados con DMF mostraron resistencia clínica a este pico de antigenemia cuando también se trataron con el grupo de dosificación de GNbAC1 más elevado (grupo H) pero falló en la prevención de la alteración clínica en

la dosificación más baja (grupo G). Por lo tanto DMF no transmitía un aumento de la resistencia a la estimulación IV con MSRV-Env a ratones tratados con la dosificación más baja de GNbAC1 (200 µg). Los ratones tratados con DMF y la dosificación de GNbAC1 más elevada (500 µg, en el Grupo H) presentaban una resistencia comparable con la de los ratones tratados solamente con GNbAC1 a la misma dosis (Grupo D).

4) Las curvas que indican el aumento de peso durante el periodo de estudio en todos los grupos muestran de manera sorprendente que el grupo D, tratado con GNbAC1 a 500 µg, presentaba el mejor punto final.

5) GNbAC1 a 200 µg (grupo C) o DMF con GNbAC1 solo con la dosificación más elevada (grupo H), proporcionó puntos finales equivalentes a los de los controles simulados.

Esto indica que, más allá de una eficacia relativa de diversos tratamientos mostrados con cinética de puntuación clínica:

- el anticuerpo GNbAC1 solo a la dosificación más elevada (500 µg) presentó la mejor eficacia clínica. También tenía un efecto positivo en la salud global de animales tal como se desvela con la cinética de aumento de peso.

- cuando se combina con GNbAC1 a la dosis más baja (200 µg), se desveló que SMT transmitía un aumento significativo de la eficacia al tratamiento, con resistencia completa a la estimulación final IV con MSRV-Env.

Esto indica que GNbAC1 desvela el tratamiento más potente, ya que proporcionan los mejores resultados con la dosis más elevada (500 µg) pero que, a su dosis más baja (200 µg), está potenciado fuertemente por la combinación con SMT que evitaba de forma eficaz el agravamiento clínico después del pico de antigenemia de Env creado por la inyección iv al final del estudio.

Además, estos resultados también sugieren que las dosificaciones más elevadas de GNbAC1, solo o en combinación con la presente dosificación de DMF, podrían mejorar un aumento significativo de la eficacia terapéutica en la salud general (de acuerdo con las curvas de aumento de peso).

Sin embargo, una sinergia eventual de SMT o DMF con GNbAC1 a la dosis más elevada, si existiera, no se puede observar dado que el anticuerpo solo ya proporciona una eficacia terapéutica máxima en las presentes condiciones de inducción de enfermedad y actividad en ratones con EAE.

En paralelo, los análisis de Rotarod confirman de manera objetiva, a todas las velocidades relevantes (Figuras 28A, 29A y 30A), que la dosificación más elevada de GNbAC1 (500 µg/ratón) es significativamente el producto más eficaz (dado solo) para mejorar el déficit neurológico de los ratones con EAE inducida por Env tratados.

El ensayo de Rotarod también confirma los efectos sinérgicos de SMT con GNbAC1, a la vez que muestra una mejora neurológica de animales tratados con la dosis más baja de GNbAC1 combinada con SMT lo que muestra una mejora neuromotora significativa a 26 y 29 rpm (Figura 29B y 30B). A 16 RPM (Figura 28B), no parece que la velocidad más baja proporcione una potencia discriminatoria suficiente para poner en evidencia este aumento clínico durante el periodo estudiado.

Por último, los resultados de Rotarod muestran una mejora en ratones con EAE inducida por Env con DMF a ambas dosificaciones de GNbAC1, pero esto llega a ser claramente significativo solamente a 29 rpm (Figura 30C).

En consecuencia, teniendo en cuenta los resultados de este ensayo objetivo y automatizado que evalúa el rendimiento neurológico de los animales, parece que GNbAC1 es claramente un tratamiento robusto cuando se proporciona en una base de inmunoterapia como en este momento, en el ejemplo 3.B. Los efectos sinérgicos con moléculas anti-NO, como se observa con GNbAC1 a la dosis más baja con SMT, también se ponen claramente en evidencia e indican un aumento terapéutico potente. Esto debe existir con diversas dosificaciones de GNbAC1, pero no se pudo observar en las presentes condiciones con los efectos ya máximos de 500 µg de GNbAC1.

3.C. Comparación entre anticuerpo anti-Env o Fumarato sódico solo (monoterapia), y anticuerpo anti-Env con Fumarato sódico (terapia combinada).

3.C.1 Material y Métodos

Material

Artículo	**Proveedor**	**Referencia**	**lote**
C57bl/6	Charles River	/	BEV13587
MOG	polipéptido	SC1272	TD02019C
MSRV-Env	PX'Therapeutics	24A	2-20120803
IFA	Sigma	F5506-10ML	061M8728
PBS	Lonza	BE17-516F	1MB118
PTX	Calbiochem	516561	D00128881
GNbAc1	(Geneuro)		T950111-8
Fumarato de dimetilo	Sigma	42926-100G	2507VBCBH
ROTAROD	BIOSEB	LE8200	/
Ctrl de isotipo CIMAher			911028

Grupos experimentales

Grupo	**MOG (µg)**	**ENV**	**Diluyente**	**PTX**	**GNbAc1**	**Anticuerpo de control de isotipo**	**Fumarato sódico**	**n = 28**	**Tratamiento**
A) -ctrl	200	-	IFA	+	Placebo	-	-	5	
B) EAE Ctrl de isotipo	200	+	IFA	+		500 µg de placebo/IP	-	5	
C) EAE GNbAC1	200	+	IFA	+	500 µg /IP	-	-	7	
D) EAE Fum Na2	200	+	IFA	+	Placebo	-	10 mg en 3,5 ml de agua potable Diariamente	4	Día +12 fum Na2 hasta el final del experimento
E) EAE GNbAC1 + fum Na2	200	+	IFA	+	500 µg /IP	-	10 mg en 3,5 ml de agua potable Diariamente	7	Día +12 fum Na2 hasta el final del experimento

3.C.2 Resultados:

Observaciones clínicas:

La puntuación de signos clínicos y el peso se evaluaron regularmente como se ha descrito anteriormente. La cinética de puntuación de EAE durante el periodo de estudio se representa en la Figura 31.

El Grupo A que representa controles negativos inyectados con IFA, MOG sin proteína Env y una inyección de placebo de anticuerpo que consistía en su tampón diluyente, nunca presentó síntomas clínicos significativos durante el periodo de estudio.

Una evolución de las puntuaciones clínicas de EAE se pudo registrar hasta el día 12 en grupos que se habían tratado en el día 12 con anticuerpo humanizado GNbAc1 (grupo C) o con Fumarato sódico, radicales libres de anti Óxido Nítrico relacionados con DMF (anti-NO), solo en el grupo D o de forma simultánea con GNbAc1 en el grupo E.

Aquí de forma interesante, solamente los grupos que han recibido el anticuerpo GNbAC1 a dosis elevada (C y E) han

mostrado una reversión significativa de sus curvas de puntuación clínica y un punto final mejorado de forma significativa al final del estudio. El Grupo D tratado con solamente Fumarato sódico solamente no desveló ninguna mejora clínica significativa en comparación con el Grupo B tratado con un anticuerpo de control de isotipo ineficaz (solapamiento de las barras de error en las curvas). Una evolución regular y persistente de las puntuaciones clínicas de EAE se pudo registrar en todos los ratones hasta el final del experimento en el grupo B (EAE inducida por Env) tratados con el anticuerpo de control de isotipo sin especificidad para la proteína Env. Esto indica que los efectos terapéuticos observados con GNbAC1 son específicos para este anticuerpo en particular y no se relacionan con la inyección de ningún anticuerpo humanizado con el mismo isotipo que, por ejemplo, podría no dirigirse al mismo epítopo.

Por lo tanto este último ejemplo muestra que:

- El Grupo A de control sin inyección de proteína Env se comportó como controles sanos sin signos clínicos, a pesar de una inyección de todos los otros componentes necesaria para simular la EAE inducida por Env (IFA y MOG) así como para simular la inyección de anticuerpo (Diluyentes del Anticuerpo); la administración simulada de Fumarato sódico soluble en agua siendo implícitamente proporcionada por el agua potable normal.

- La puntuación clínica más elevada (peor evolución de la enfermedad) se pone en evidencia en animales tratados con el anticuerpo de control de isotipo irrelevante (grupo B). Por lo tanto esta inyección de anticuerpo de isotipo simulado en presencia de proteína Env desveló la producción de un control de EAE positivo con una evolución de EAE habitual.

- El Grupo D tratado con Fumarato Sódico solamente tenía un mal resultado al final del estudio, similar al del Grupo B tratado con un anticuerpo de control ineficaz.

- Los Grupos C y E tratados con dosis elevada de anticuerpo GNbAC1 solo o en combinación con Fumarato Sódico presentaban una recuperación equivalente y significativamente buena al final del estudio. La mejoría clínica apareció desde el día 15, después de que hubiera comenzado el tratamiento.

En el presente documento, ya que el Fumarato Sódico solo no tenía efecto y ya que parece que la cinética de la curva de los grupos C y E es equivalente, el efecto terapéutico observado en estos dos grupos debe ser producido total y solamente por GNbAC1 mientras que se desvela que el Fumarato Sódico es ineficaz.

3.D Análisis de Resultados generales del Ejemplo 3

En conclusión, solos o combinados, los tratamientos con anticuerpo específico anti-Env, tal como GNbAc1 y compuestos de radicales libres anti-óxido nítrico (anti-NO), tales como DMF, SMT o L-Name, son ventajosos porque tratan el bloqueo de la actividad potencial de remielinización por la proteína de envoltura HERV-W, en particular MSRV-Env, *in vitro* e *in vivo.*

GNbAc1 a dosificación elevada (500 µg / ratón de aproximadamente 20-25 g) también desveló una eficacia particular en comparación con la dosis más baja (200 µg), cuando se administraba solo como una monoterapia en los presentes ejemplos.

REFERENCIAS:

1. Perron H, Garson JA, Bedin F, *et al.* Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 7583-8.
2. Perron H, Germi R, Bernard C, *et al.* Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. Mult Scler. 2012; 18: 1721-36.
3. Bruno S, Cercignani M y Ron MA. White matter abnormalities in bipolar disorder: a voxel-based diffusion tensor imaging study. Bipolar Disord. 2008; 10: 460-8.
4. Goghari VM. Rehm K, Carter CS y MacDonald AW. Sulcal thickness as a vulnerability indicator for schizophrenia. Br J Psychiatry. 2007; 191: 229-33.
5. Stevens JR. Neuropathology of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry. 1982; 39: 1131-9.
6. Perron H, Hamdani N, Faucard R, *et al.* Molecular characteristics of Human Endogenous Retrovirus type-W in schizophrenia and bipolar disorder. Transl Psychiatry. 2012; 2: e201.
7. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, *et al.* Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbetal6 T-lymphocyte activation. Virology. 2001; 287: 321-32.
8. Delarasse C, Smith P, Baker D y Amor S. Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. Immunology. 2013.
9. Heinen A, Kremer D, Gottle P, *et al.* The cyclin-dependent kinase inhibitor p57kip2 is a negative regulator of Schwann cell differentiation and in vitro myelination. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 8748-53.
10. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H y Marche PN. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Thl-like responses. J Immunol. 2006; 176: 7636-44.

11. Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R y Trapp BD. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med. 2002; 346: 165-73.
12. Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J y Bruck W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. Brain. 2008; 131: 1749-58.
13. Kremer D, Aktas O, Hartung HP y Kury P. The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. Ann Neurol. 2011;69: 602-18.
14. Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, *et al.* Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. Virology. 1999; 260: 1-9.
15. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, *et al.* Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 8514-9.
16. Antony JM, van Marle G, Opii W, *et al.* Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. Nat Neurosci. 2004; 7: 1088-95.
17. Bork P, Brown NP, Hegyi H y Schultz J. The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. Protein Sci. 1996; 5: 1421-5.
18. Blond JL, Beseme F, Duret L, *et al.* Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. J Virol. 1999; 73: 1175-85.
19. Mi S, Lee X, Li X, *et al.* Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature. 2000; 403: 785-9.
20. Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, *et al.* Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis. JNeurovirol. 2006; 12: 65-71.
21. Ruprecht K y Perron H. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. JAMA. 2005; 293: 2089; author reply -90.
22. Roebke C, Wahl S, Laufer G, *et al.* An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3. Retrovirology. 2010; 7: 69.
23. Perron H, Germi R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C y Farinelli L. Human Endogenous Retrovirus type W Envelope expression in blood and brain cells provides new insights into Multiple Sclerosis disease. Multiple Sclerosis journal. 2012; DOI: 10.1177/1352458512441381.
24. Perron H y Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. Clin Rev Allergy Immunol. 2010; 39: 51-61.
25. Firouzi R, Rolland A, Michel M, *et al.* Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. J Neurovirol. 2003; 9: 79-93.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso para el tratamiento del bloqueo de la remielinización en Esclerosis Múltiple progresiva asociada con la expresión de la proteína de envoltura HERV-W (ENV), en el que dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W comprende cada una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que se presentan en las SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 5, y SEQ ID N.º 6.

2. Un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W es un scFv, un fragmento Fab, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo modificado por ingeniería genética o uno humanizado.

3. Un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W es una IgG.

4. Un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W es una IgG1.

5. Un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo anti-Env de HERV-W es una IgG4.

6. Un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la Esclerosis Múltiple progresiva es Esclerosis Múltiple Progresiva Secundaria (SPMS).

7. Un anticuerpo anti-Env de HERV-W para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la Esclerosis Múltiple progresiva es Esclerosis Múltiple Progresiva Primaria (PPMS).

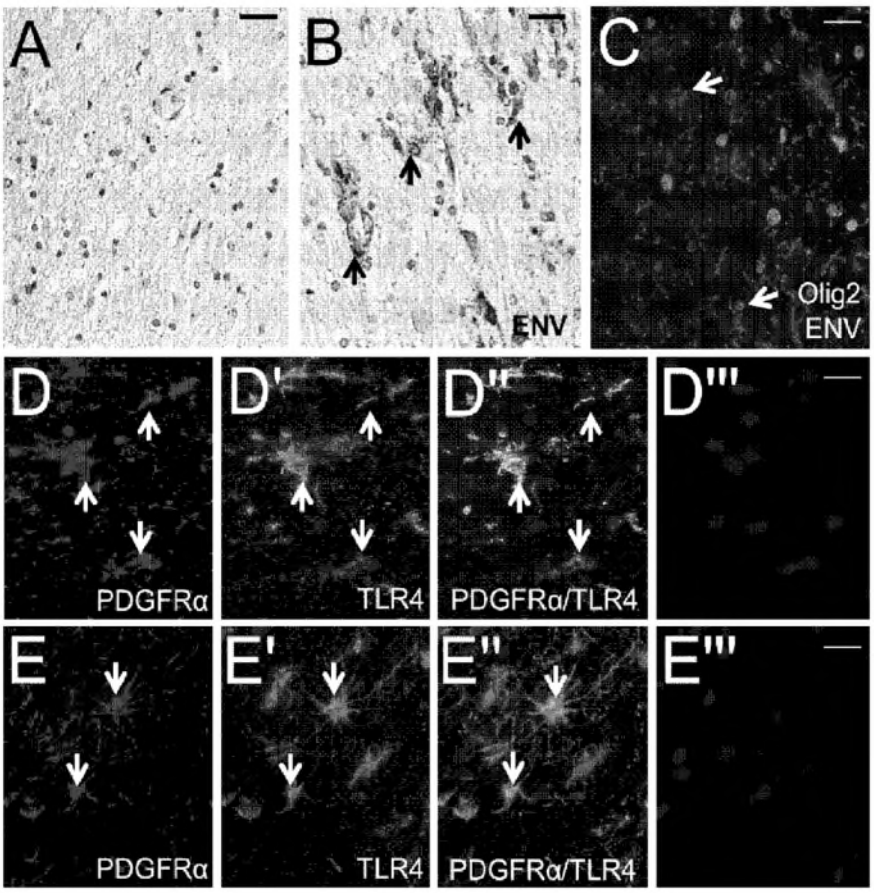

A
B
ENV
C
Olig2
ENV
D
PDGFRα
D'
TLR4
D''
PDGFRα/TLR4
D'''
E
PDGFRα
E'
TLR4
E''
PDGFRα/TLR4
E'''

FIGURA 1

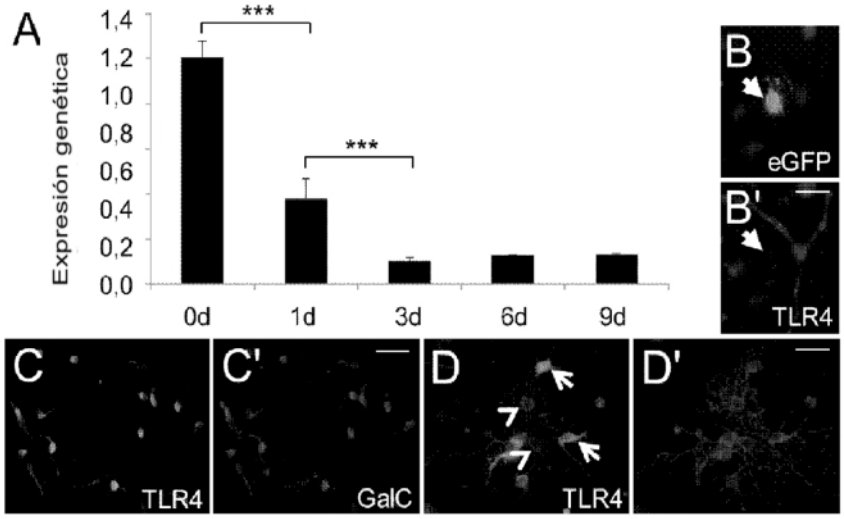

A
Expresión genética
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
0d
1d
3d
6d
9d
B
eGFP
B'
TLR4
C
TLR4
C'
GalC
D
TLR4
D'

FIGURA 2

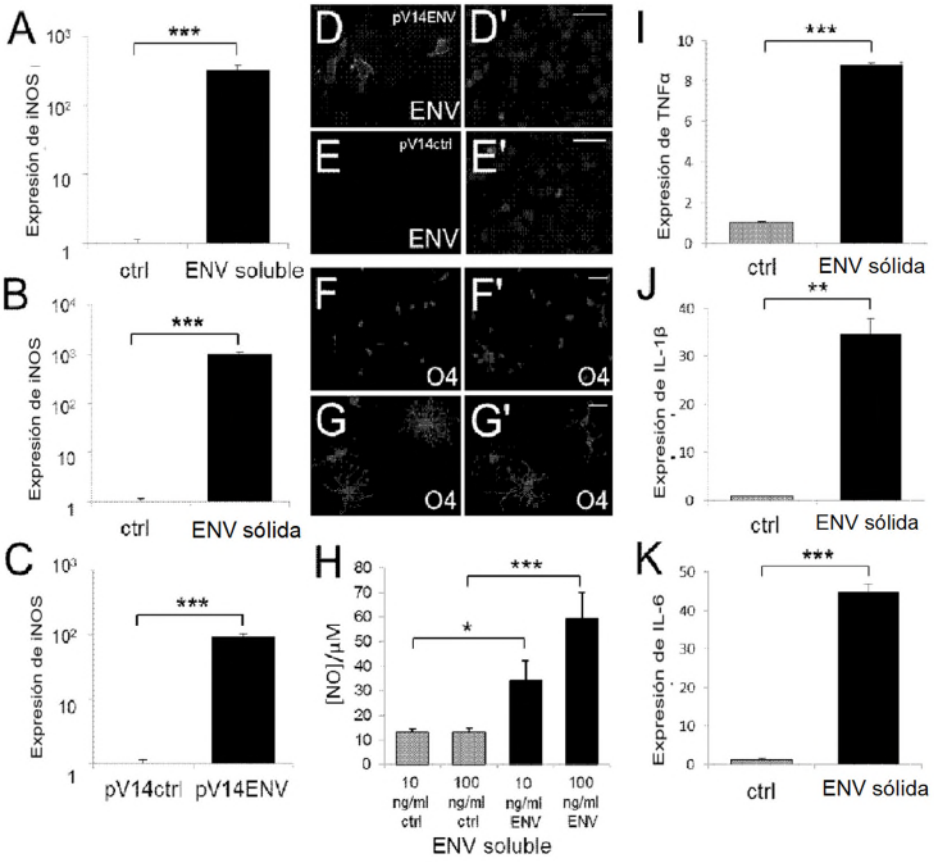

A
Expresión de iNOS
***
ctrl
ENV soluble
B
Expresión de iNOS
***
ctrl
ENV sólida
C
Expresión de iNOS
***
pV14ctrl
pV14ENV
D
pV14ENV
ENV
D'
E
pV14ctrl
ENV
E'
F
O4
F'
O4
G
O4
G'
O4
H
[NO]/[N]
*
***
10 ng/ml ctrl
100 ng/ml ctrl
10 ng/ml ENV
100 ng/ml ENV
ENV soluble
I
Expresión de TNFα
***
ctrl
ENV sólida
J
Expresión de IL-1β
**
ctrl
ENV sólida
K
Expresión de IL-6
***
ctrl
ENV sólida

FIGURA 3

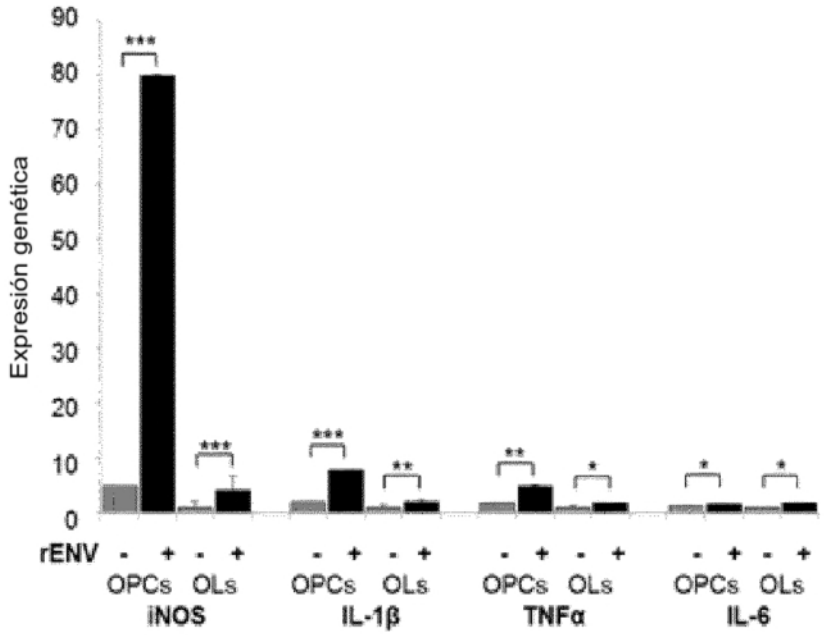

Expresión genética
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
***
***
**
**
*
*
*
rENV - + - + - + - + - + - + - + - +
OPCs OLs OPCs OLs OPCs OLs OPCs OLs
iNOS
IL-1β
TNFα
IL-6

FIGURA 4

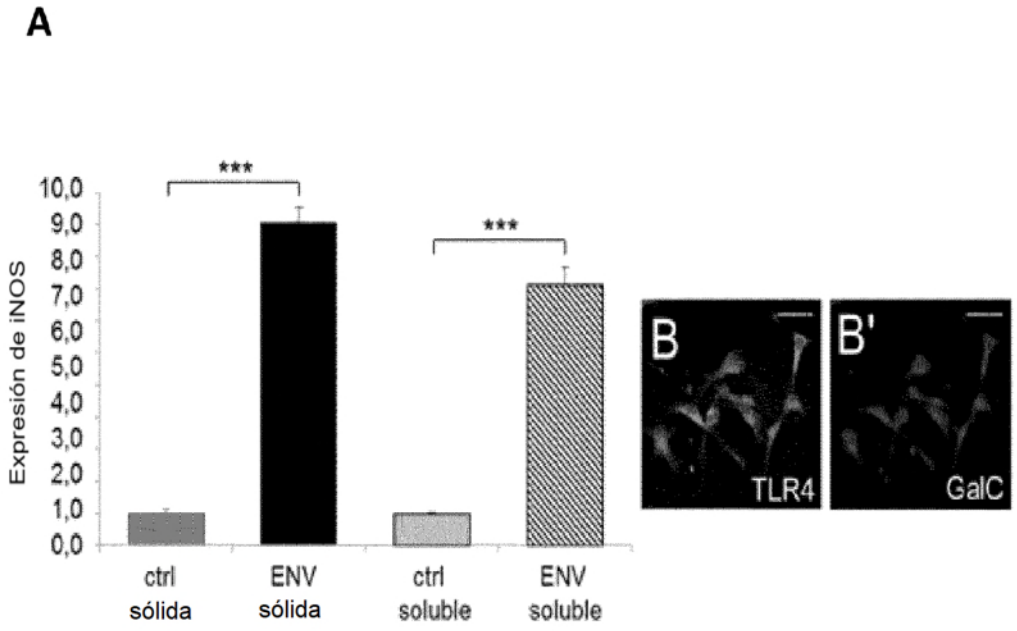

A
***
***
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Expresión de iNOS
ctrl sólida
ENV sólida
ctrl soluble
ENV soluble
B
TLR4
B'
GalC

FIGURA 5

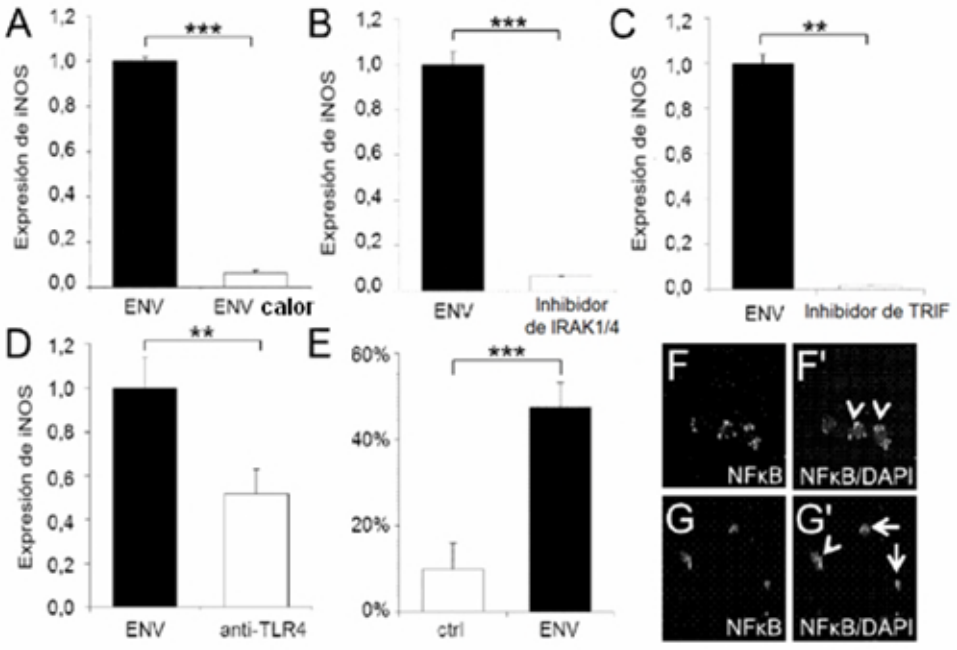

A
B
C
D
E
F
F'
G
G'
Expresión de iNOS
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
**
ENV
ENV calor
Inhibidor de IRAK1/4
Inhibidor de TRIF
anti-TLR4
60%
40%
20%
0%
ctrl
NFκB
NFκB/DAPI

FIGURA 6

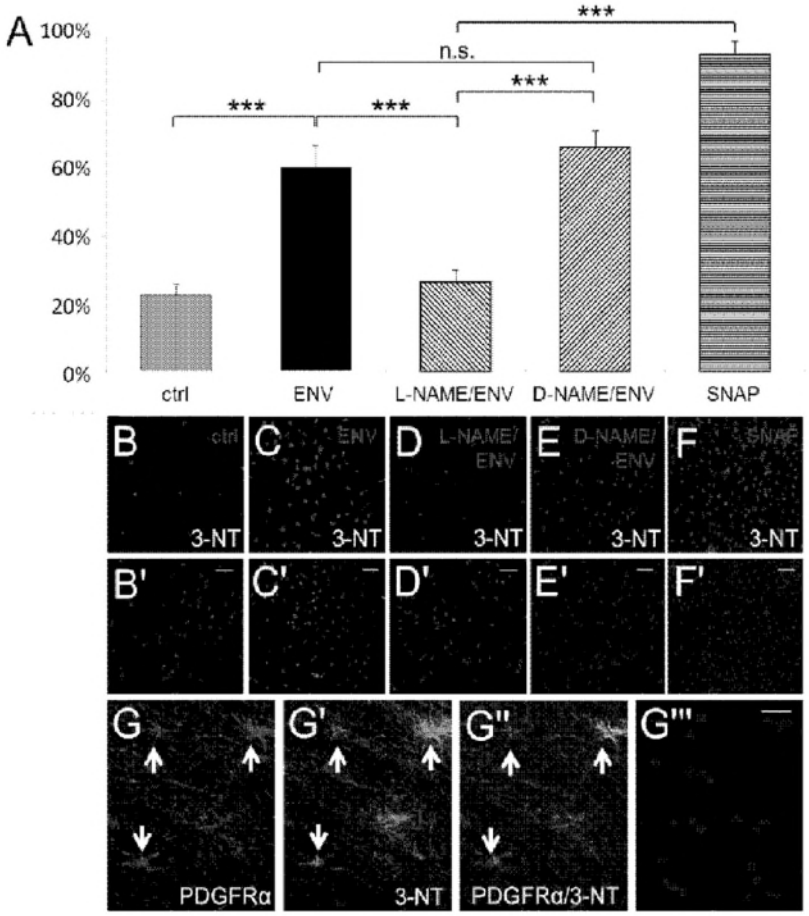

A
100%
80%
60%
40%
20%
0%
***
n.s.
***
***
***
ctrl
ENV
L-NAME/ENV
D-NAME/ENV
SNAP
B
ctrl
3-NT
C
ENV
3-NT
D
L-NAME/ ENV
3-NT
E
D-NAME/ -ENV
3-NT
F
SNAP
3-NT
B'
C'
D'
E'
F'
G
PDGFRα
G'
3-NT
G''
PDGFRα/3-NT
G'''

FIGURA 7

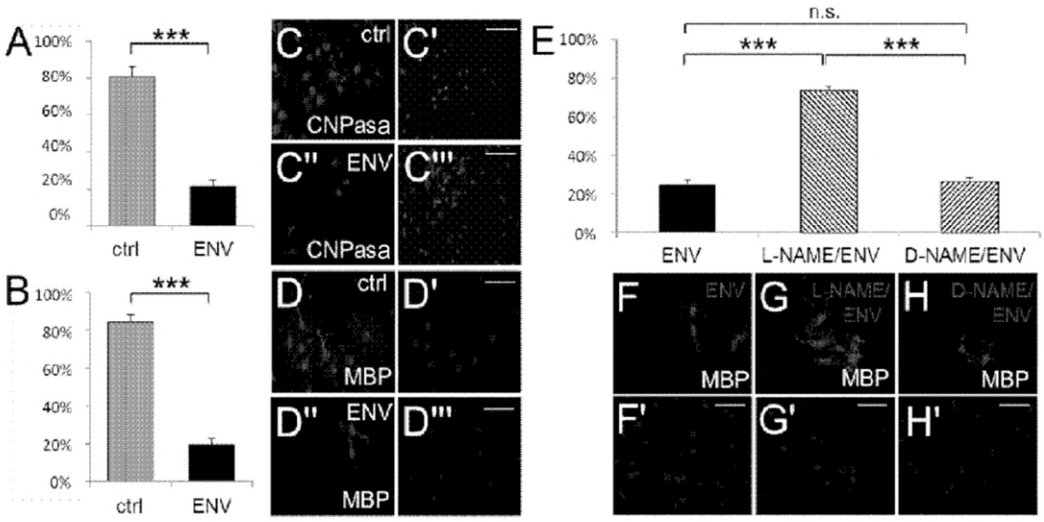
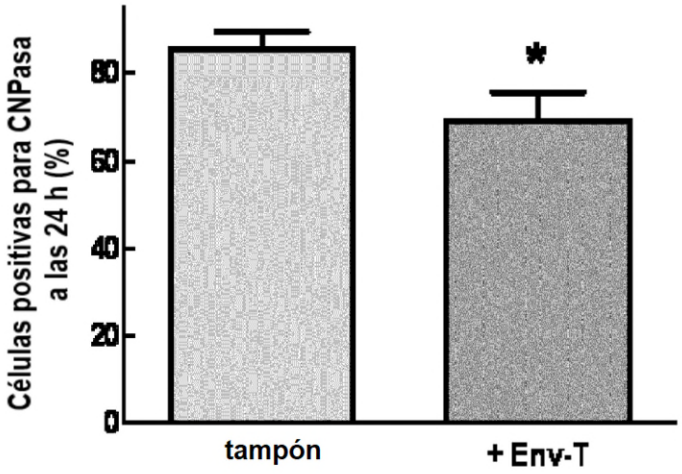

A
100%
80%
60%
40%
20%
0%
***
ctrl
ENV
B
100%
80%
60%
40%
20%
0%
***
ctrl
ENV
C
ctrl
CNPasa
C'
C''
ENV
CNPasa
C'''
D
ctrl
MBP
D'
D''
ENV
MBP
D'''
E
n.s.
***
***
100%
80%
60%
40%
20%
0%
ENV
L-NAME/ENV
D-NAME/ENV
F
ENV
MBP
G
L-NAME/
ENV
MBP
H
D-NAME/
ENV
MBP
F'
G'
H'

FIGURA 8

A


Células positivas para CNPasa a las 24 h (%)
0
20
40
60
80
*
tampón
+ Env-T

B

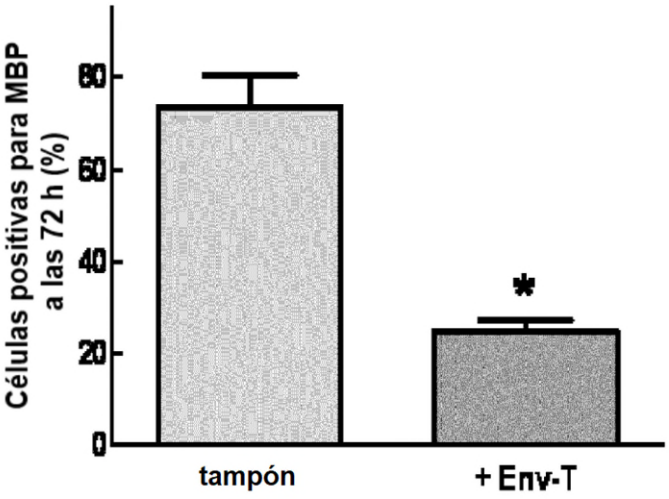
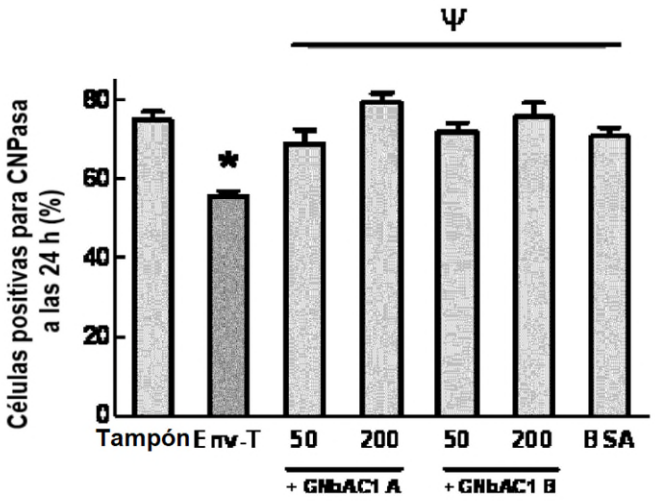

Células positivas para MBP a las 72 h (%)
0
20
40
60
80
*
tampón
+ Env-T

FIGURA 9

A


Ψ
Células positivas para CNPasa a las 24 h (%)
0
20
40
60
80
*
Tampón
Env-T
50
200
50
200
BSA
+ GNbAC1 A
+ GNbAC1 B

B

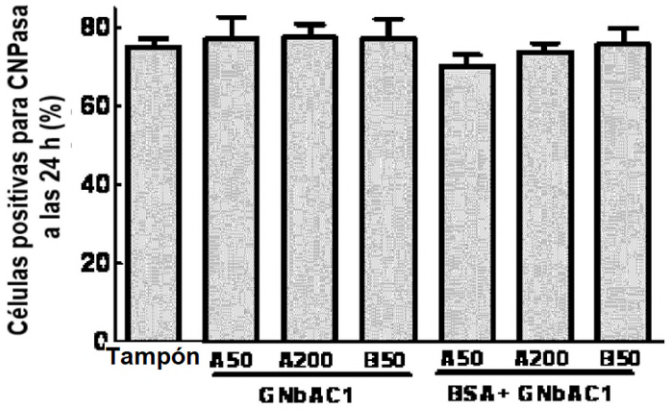

Células positivas para CNPasa a las 24 h (%)
0
20
40
60
80
Tampón
A50
A200
B50
A50
A200
B50
GNbAC1
BSA+ GNbAC1

FIGURA 10

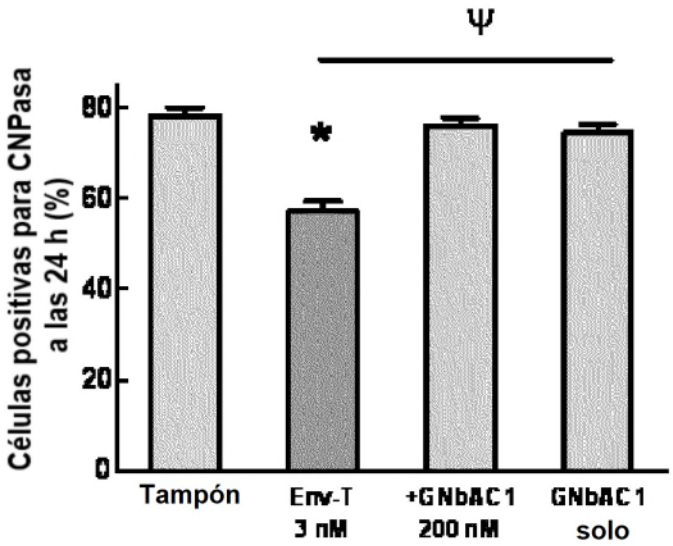
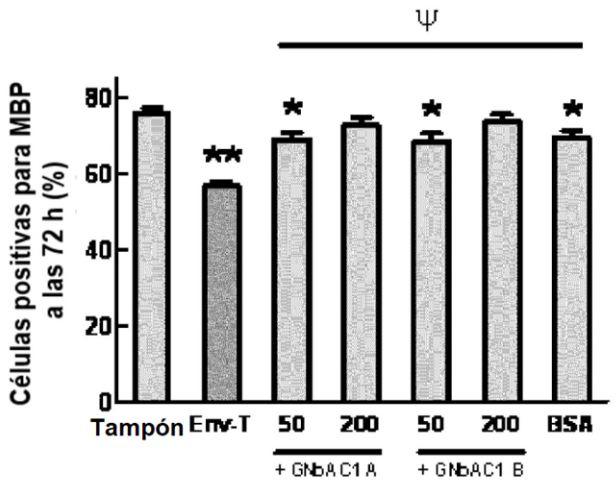

Ψ
Células positivas para CNPasa a las 24 h (%)
80
60
40
20
0
*
Tampón
Env-T 3 nM
+GNbAC1 200 nM
GNbAC1 solo

FIGURA 11

A


Ψ
Células positivas para MBP a las 72 h (%)
80
60
40
20
0
*
**
*
*
Tampón
Env-T
50
200
50
200
BSA
+ GNbAC1 A
+ GNbAC1 B

B

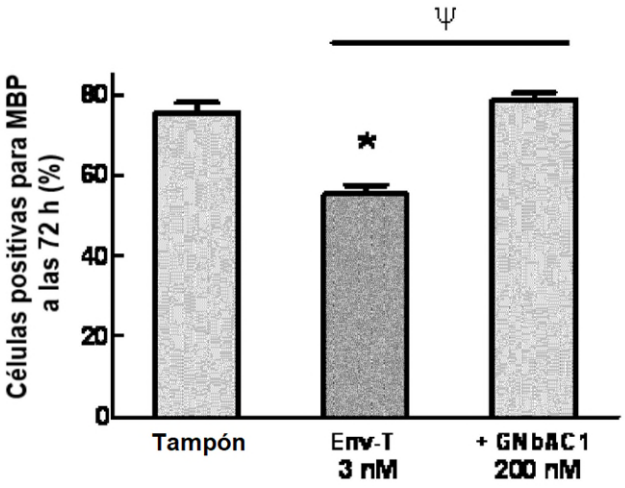
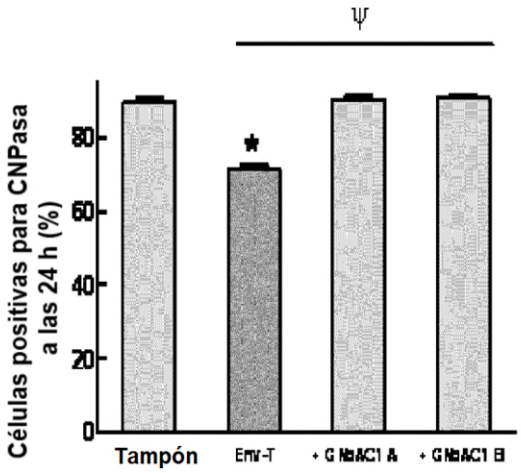

Ψ
Células positivas para MBP a las 72 h (%)
80
60
40
20
0
*
Tampón
Env-T
3 nM
+ GNbAC1
200 nM

FIGURA 12

A


Ψ
Células positivas para CNPasa a las 24 h (%)
0
20
40
60
80
*
Tampón
Env-T
+ GNbAC1 A
+ GNbAC1 B

B

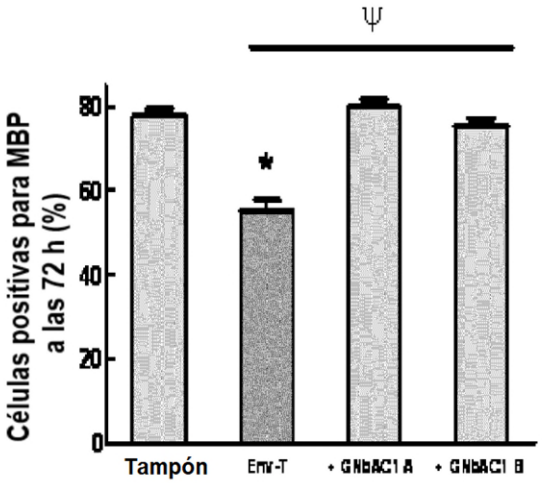
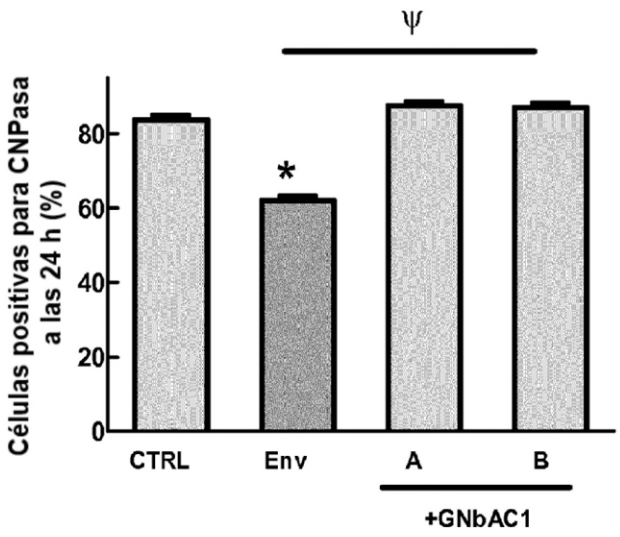

Ψ
Células positivas para MBP a las 72 h (%)
0
20
40
60
80
*
Tampón
Env-T
+ GNbAC1 A
+ GNbAC1 B

FIGURA 13

A


ψ
Células positivas para CNPasa a las 24 h (%)
80
60
40
20
0
*
CTRL
Env
A
B
+GNbAC1

B

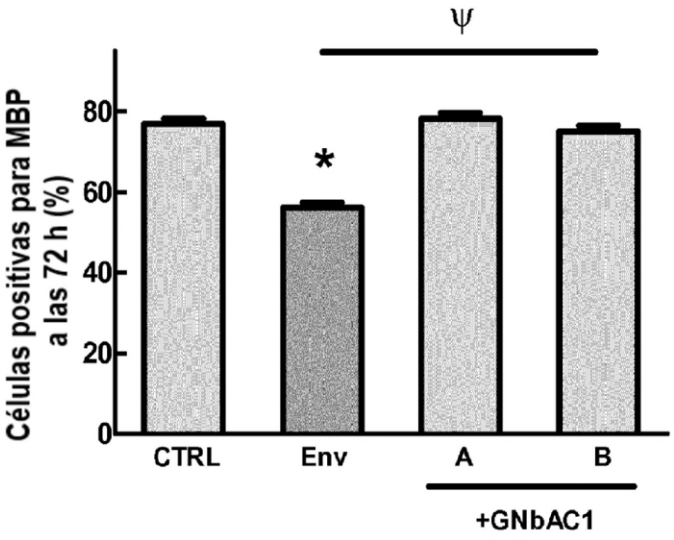
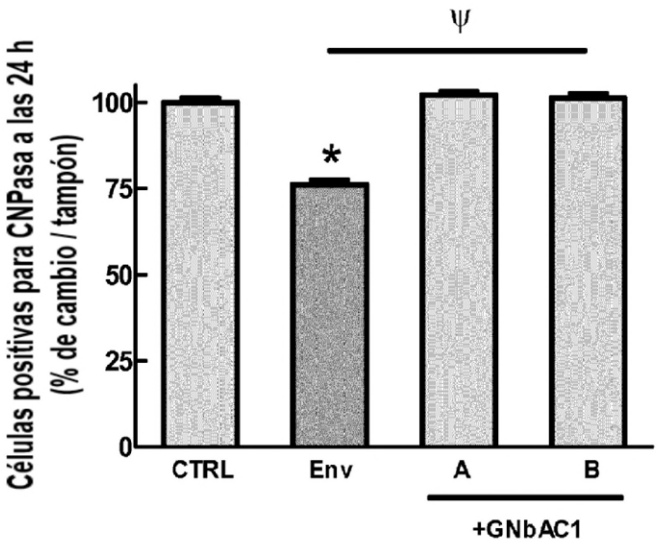

ψ
Células positivas para MBP a las 72 h (%)
80
60
40
20
0
*
CTRL
Env
A
B
+GNbAC1

FIGURA 14

A


Ψ
Células positivas para CNPasa a las 24 h
(% de cambio / tampón)
100
75
50
25
0
*
CTRL
Env
A
B
+GNbAC1

B

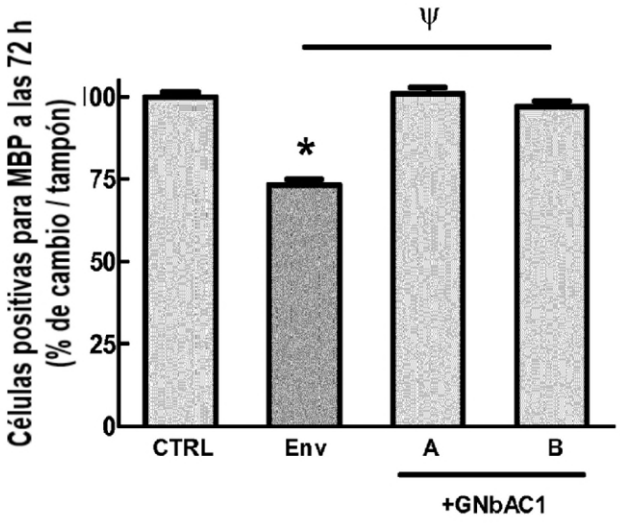

Ψ
Células positivas para MBP a las 72 h
(% de cambio / tampón)
100
75
50
25
0
*
CTRL
Env
A
B
+GNbAC1

FIGURA 15

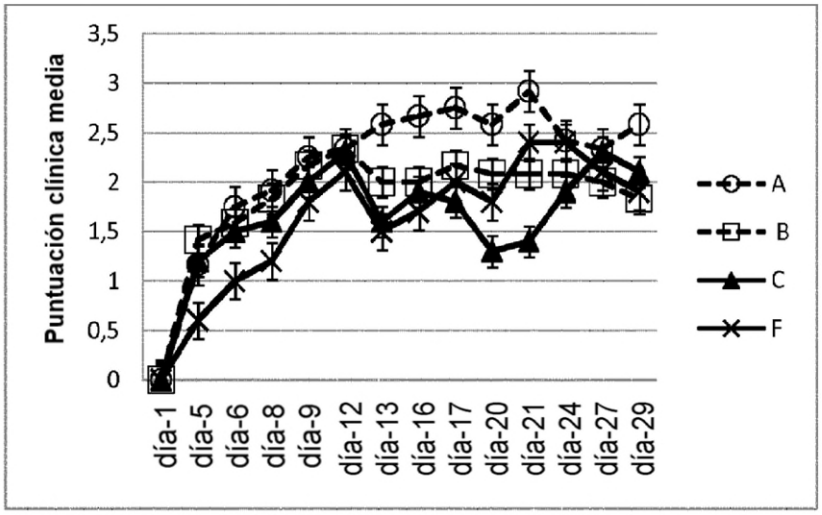


FIGURA 16

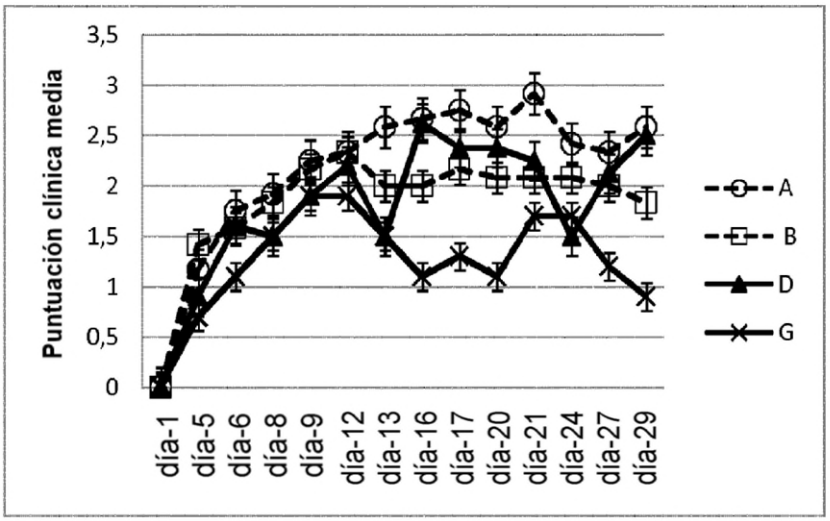


FIGURA 17

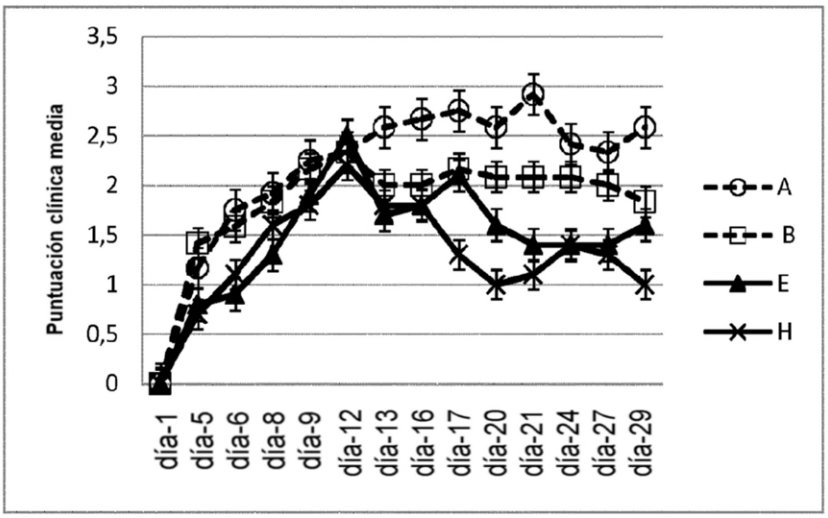
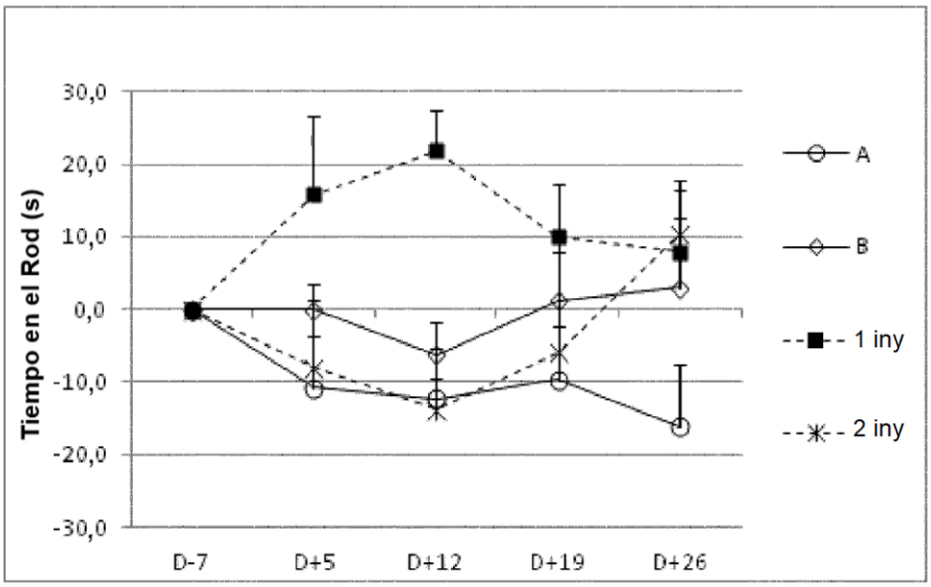

Puntuación clínica media
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
día-1
día-5
día-6
día-8
día-9
día-12
día-13
día-16
día-17
día-20
día-21
día-24
día-27
día-29
A
B
E
H

FIGURA 18

A


30,0
20,0
10,0
0,0
-10,0
-20,0
-30,0
Tiempo en el Rod (s)
D-7
D+5
D+12
D+19
D+26
A
B
1 iny
2 iny

B

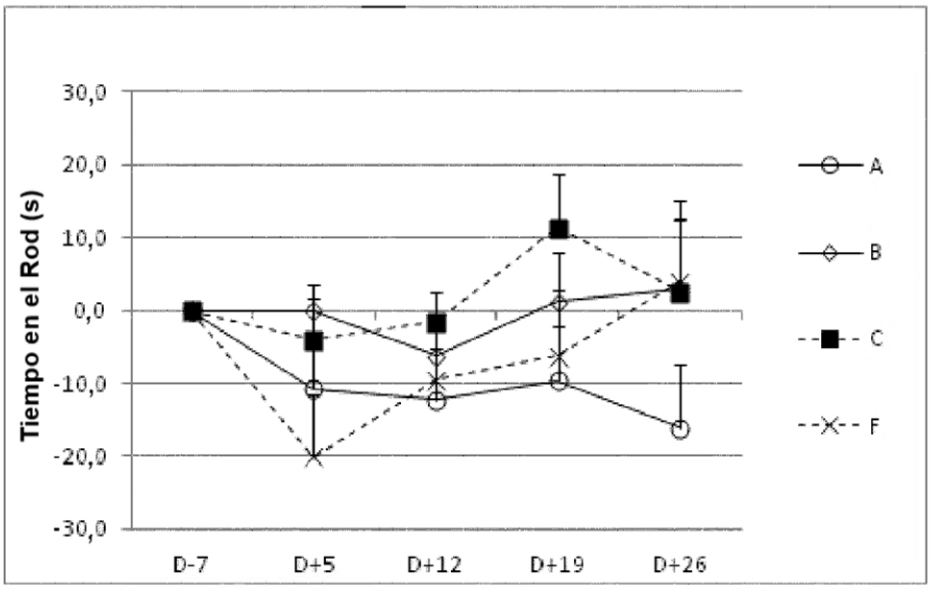
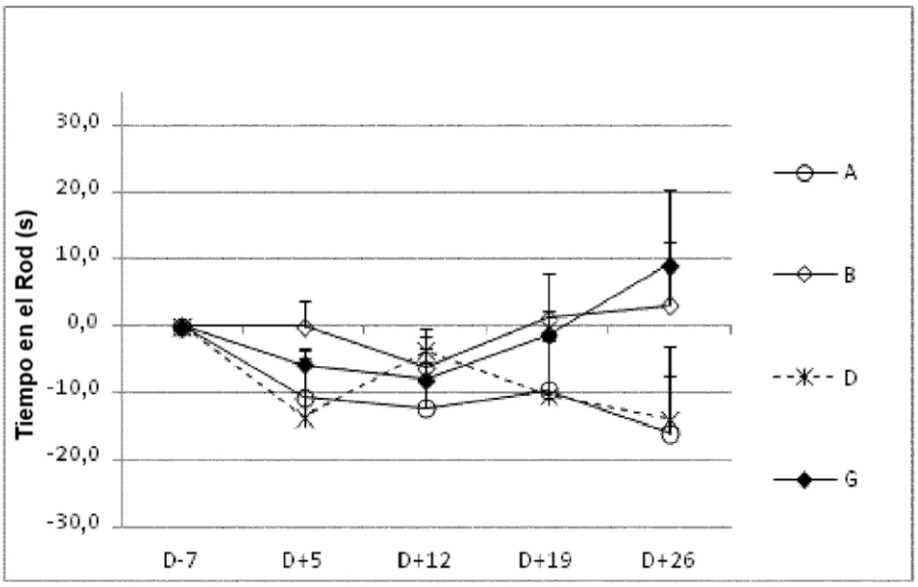

30,0
20,0
10,0
0,0
-10,0
-20,0
-30,0
Tiempo en el Rod (s)
D-7
D+5
D+12
D+19
D+26
A
B
C
F

FIGURA 19

C



D

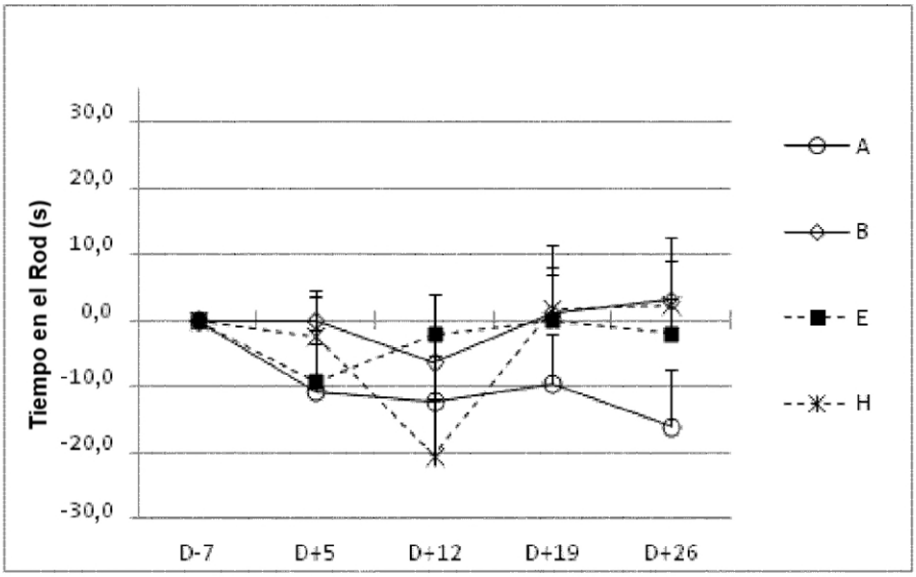
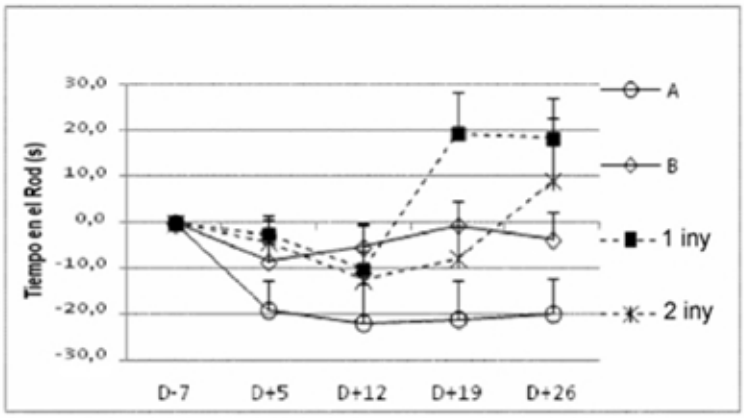


FIGURA 19 (cont.)

A


Tiempo en el Rod (s)
30,0
20,0
10,0
0,0
-10,0
-20,0
-30,0
D-7
D+5
D+12
D+19
D+26
A
B
1 iny
2 iny

B

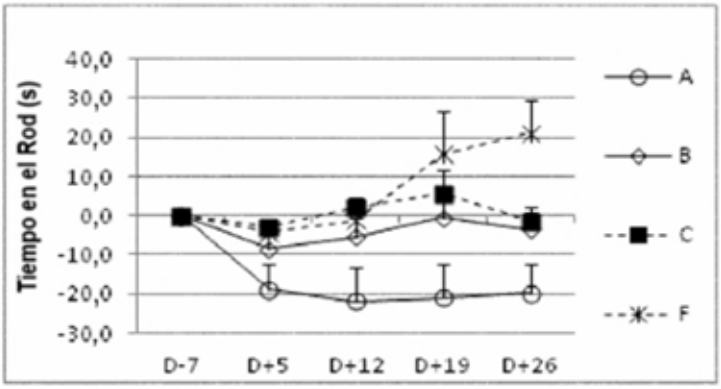
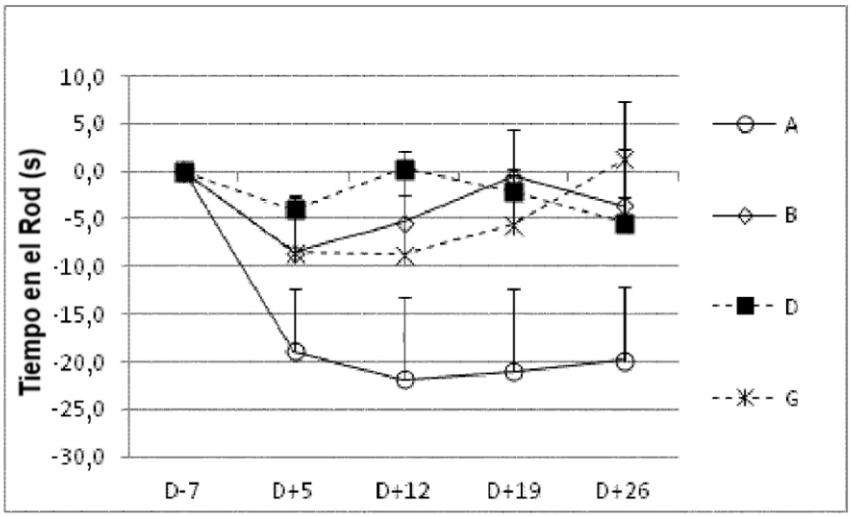

Tiempo en el Rod (s)
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
-10,0
-20,0
-30,0
D-7
D+5
D+12
D+19
D+26
A
B
C
F

FIGURA 20

C



D

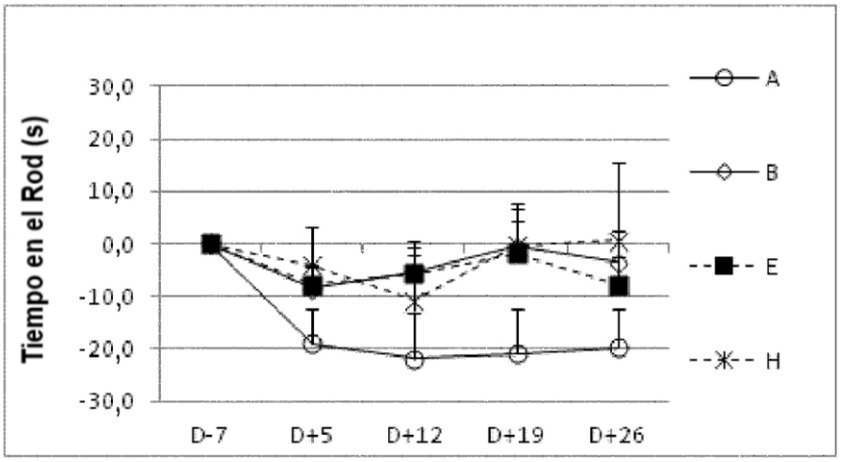
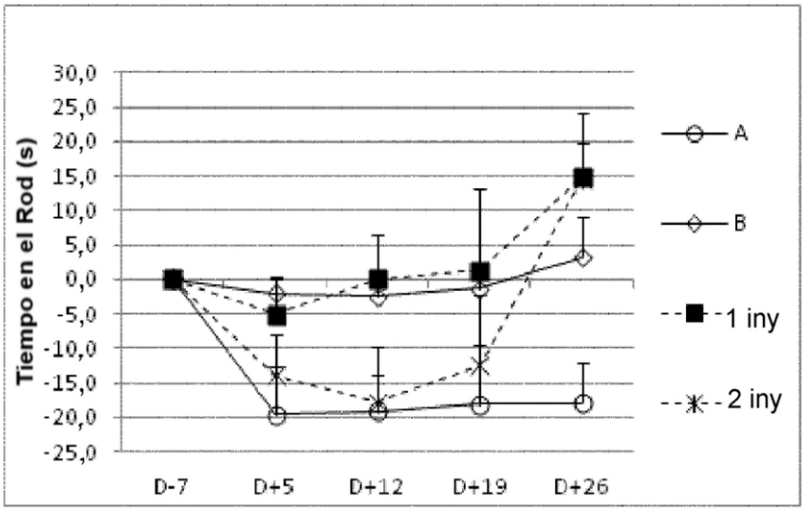


FIGURA 20 (cont.)

A


30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
-5,0
-10,0
-15,0
-20,0
-25,0
Tiempo en el Rod (s)
D-7
D+5
D+12
D+19
D+26
A
B
1 iny
2 iny

B

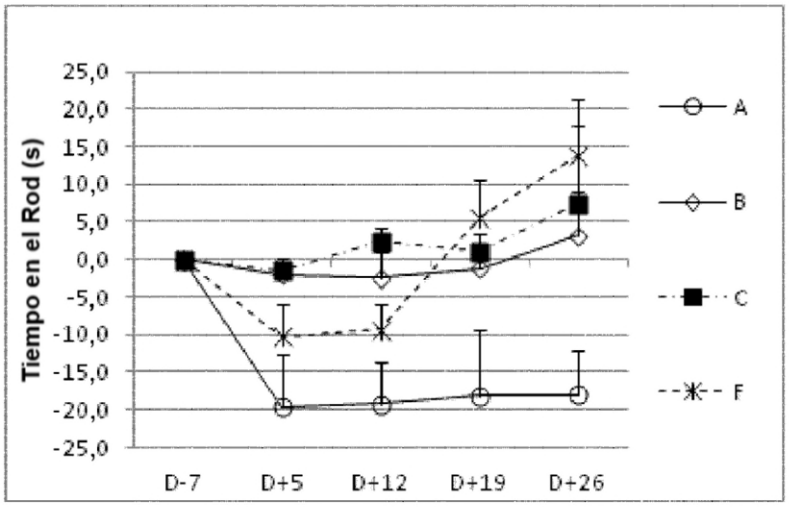
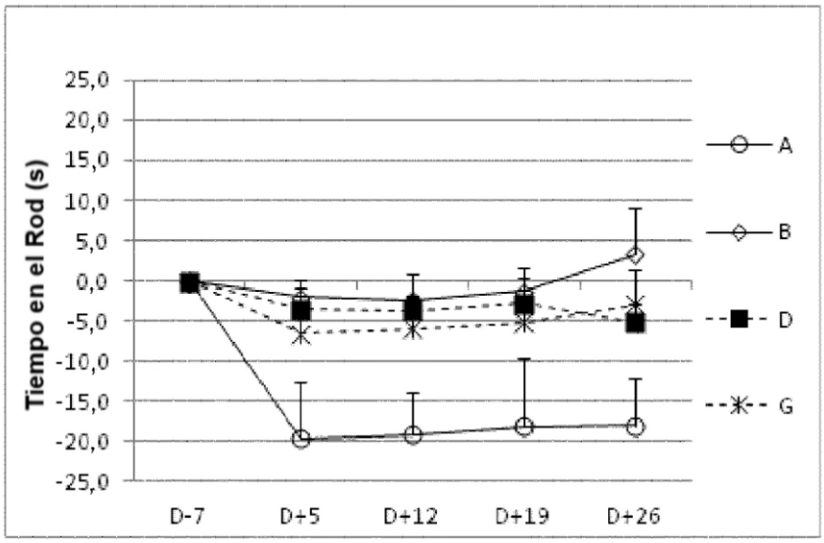

25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
-5,0
-10,0
-15,0
-20,0
-25,0
Tiempo en el Rod (s)
D-7
D+5
D+12
D+19
D+26
A
B
C
F

FIGURA 21

C



D

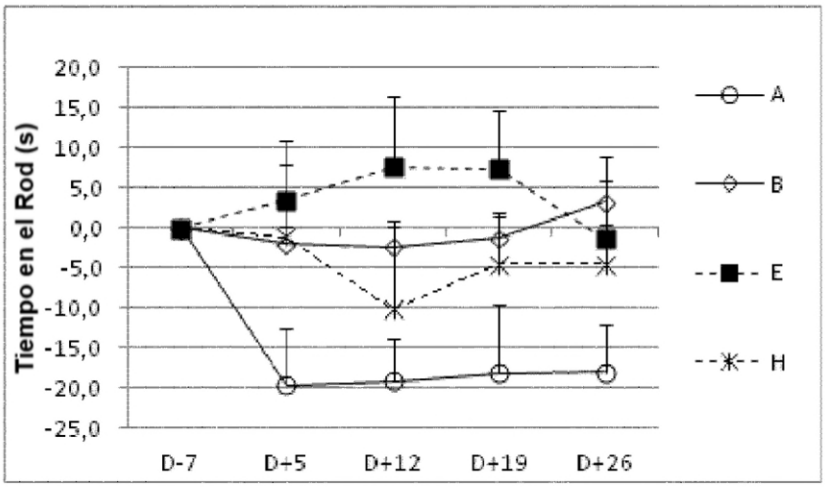


FIGURA 21 (cont.)

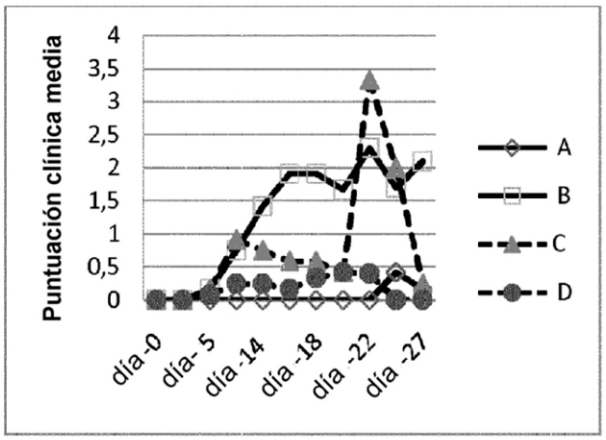


FIGURA 22

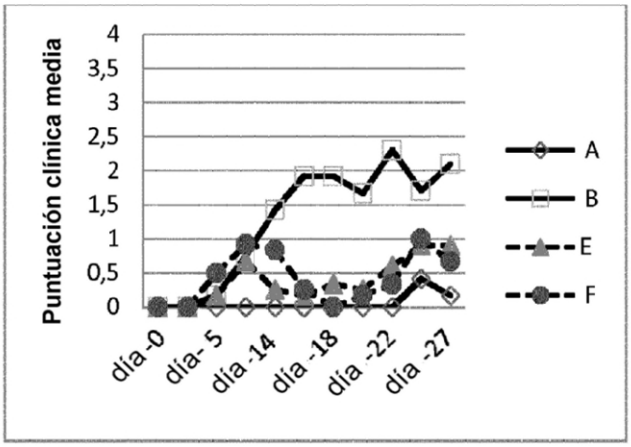


FIGURA 23

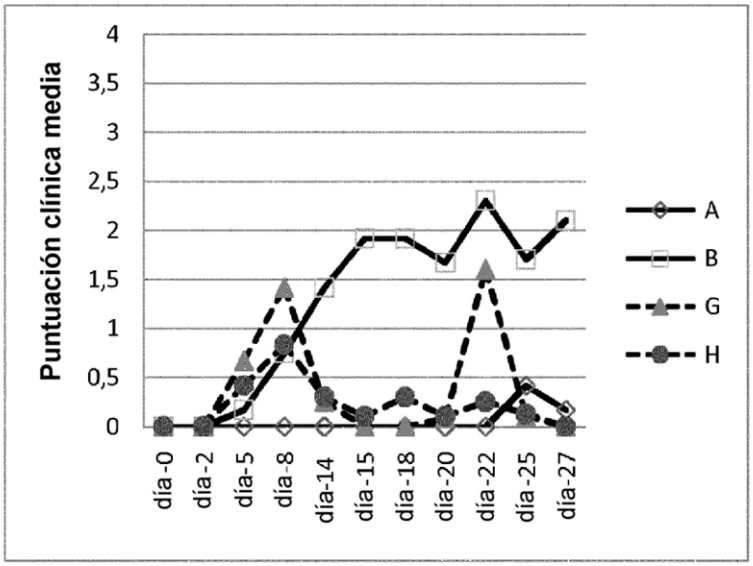


FIGURA 24

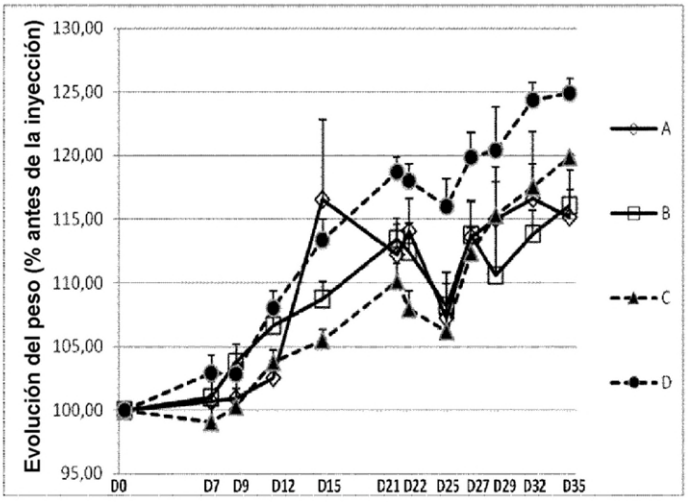


FIGURA 25

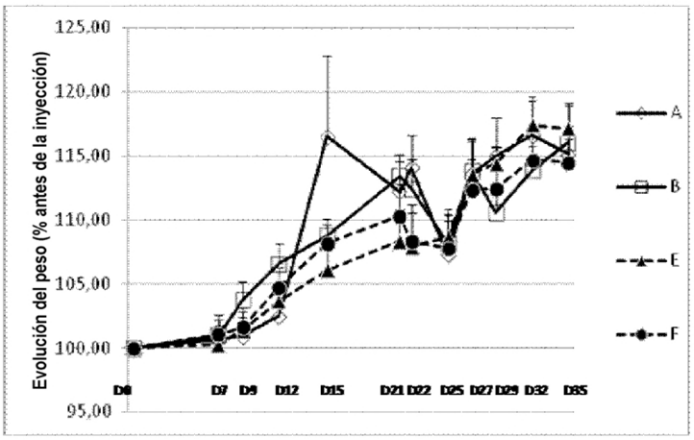


FIGURA 26

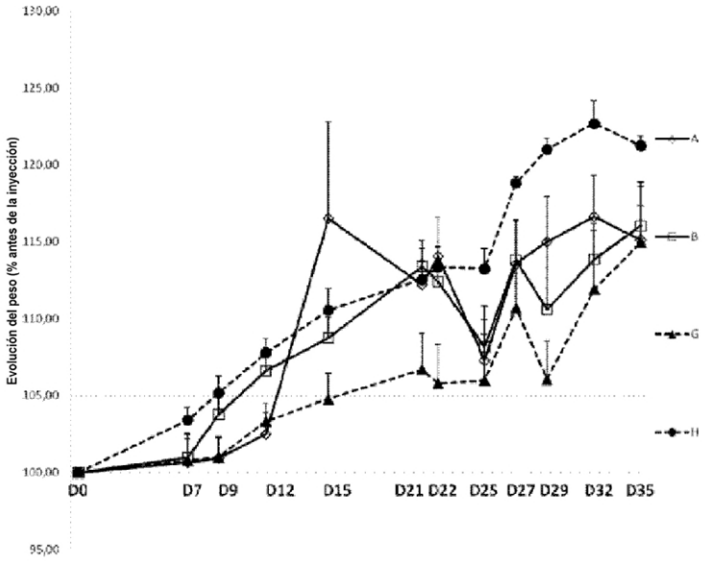
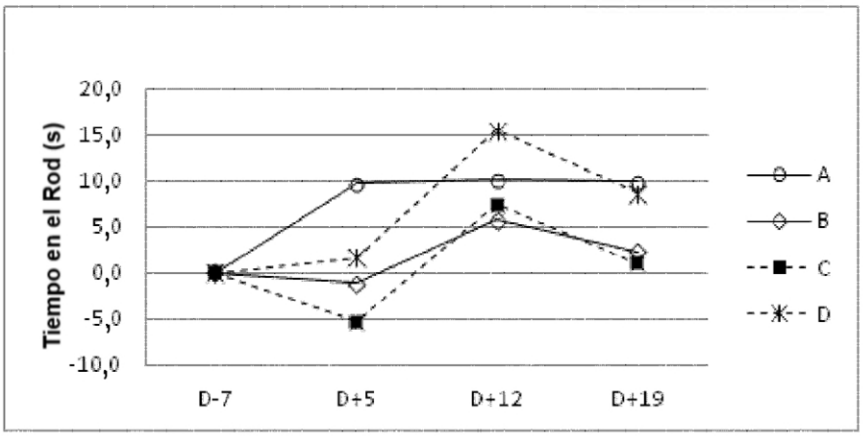


FIGURA 27

A


20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
-5,0
-10,0
Tiempo en el Rod (s)
D-7
D+5
D+12
D+19
A
B
C
D

B

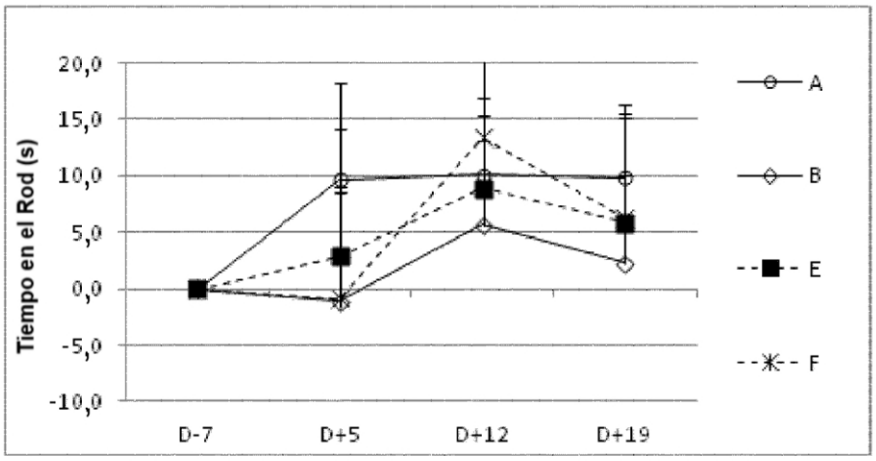

20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
-5,0
-10,0
Tiempo en el Rod (s)
D-7
D+5
D+12
D+19
A
B
E
F

FIGURA 28

C

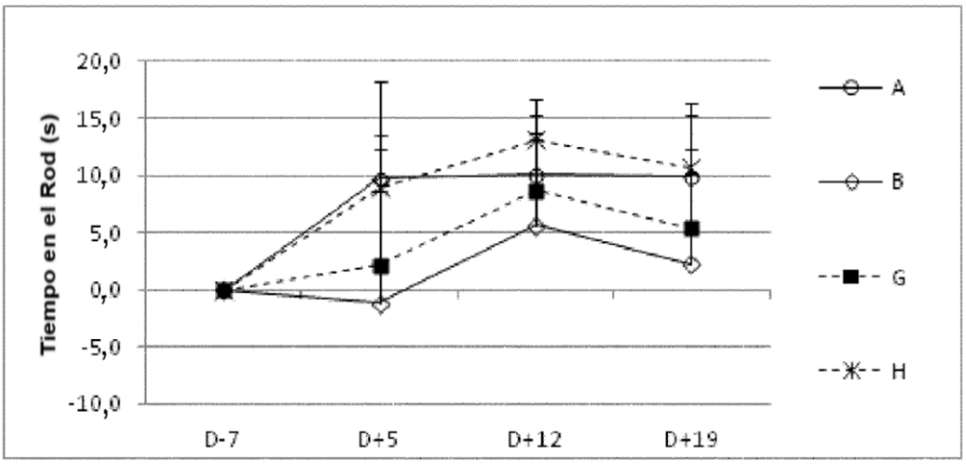
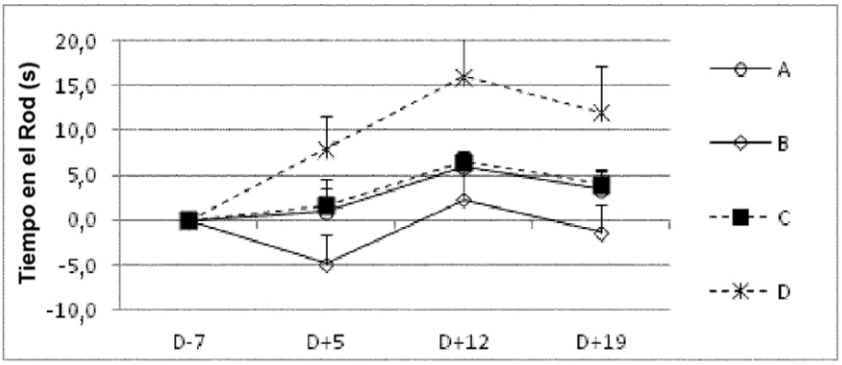
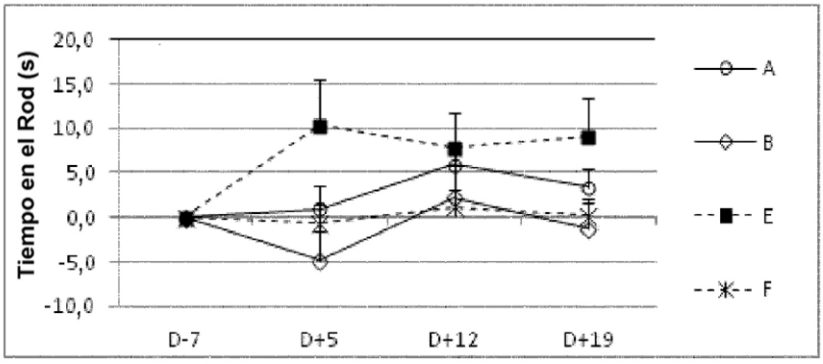


FIGURA 28 (cont.)

A



B



C

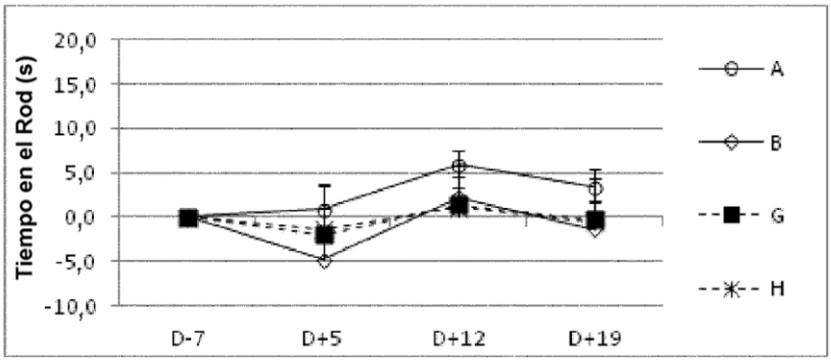
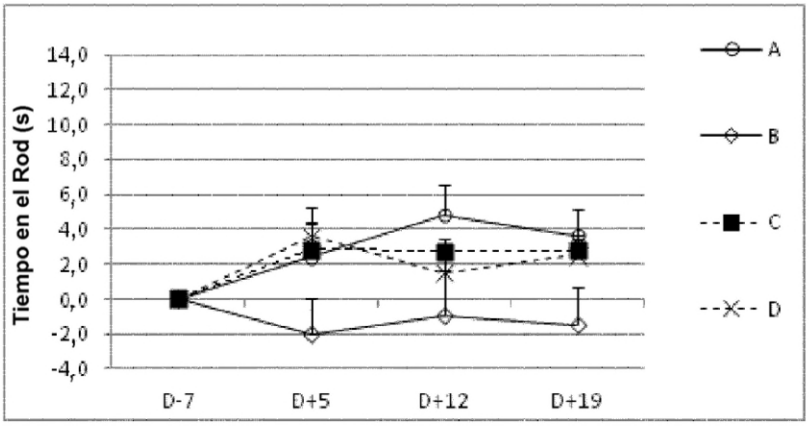
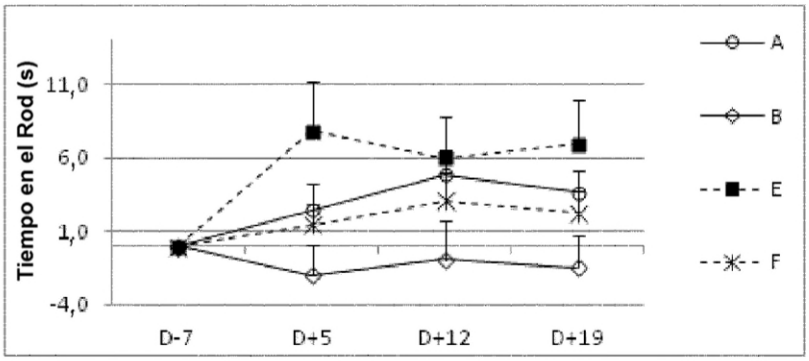


FIGURA 29

A



B



C

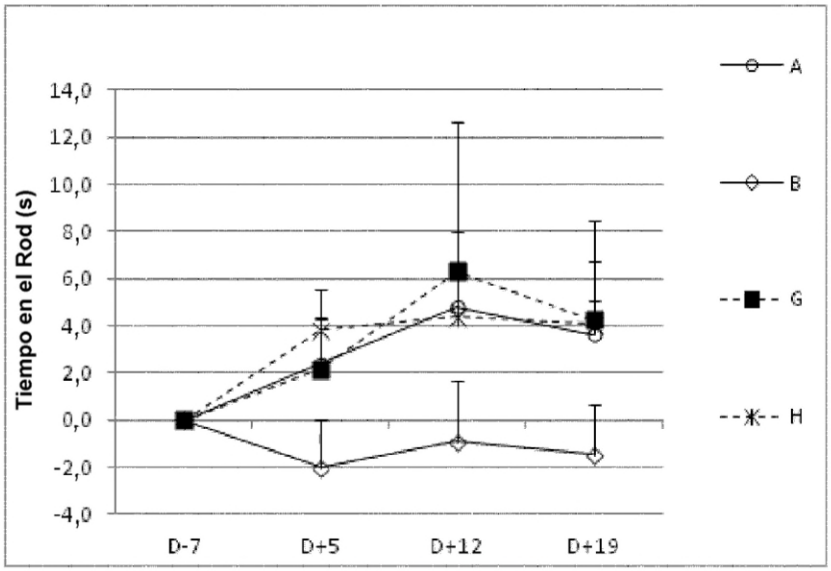


FIGURA 30

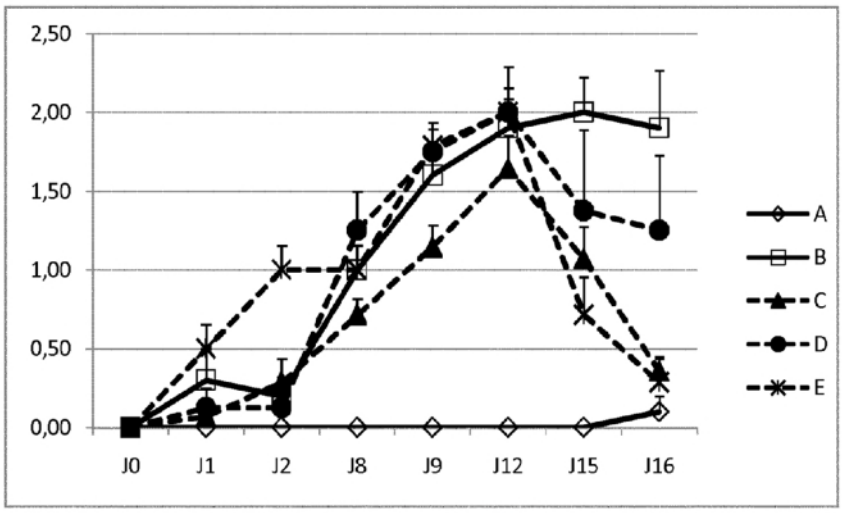


FIGURA 31