

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 726**

51 Int. Cl.:
C07K 14/15 (2006.01)
C12N 15/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00960783 .9**
96 Fecha de presentación: **01.09.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1212359**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.06.2002**

54 Título: **Procedimiento de detección de la expresión de una proteína de cubierta de un retrovirus endógeno humano y utilizaciones de un gen que codifica para esta proteína**

30 Prioridad:
01.09.1999 FR 9911141
15.09.1999 FR 9911793

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2012

73 Titular/es:
BIO MERIEUX
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY L'ETOILE, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)

72 Inventor/es:
MALLET, François;
COSSET, François-Loic;
BLOND, Jean-Luc;
LAVILLETTE, Dimitri;
BOUTON, Olivier y
RUGGIERI, Alessia

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 376 726 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de la expresión de una proteína de cubierta de un retrovirus endógeno humano y utilizations de un gen que codifica para esta proteína.

5 Los retrovirus son unos virus envueltos que contienen unas espículas glicoproteicas codificadas por los virus en su superficie. Estas glicoproteínas de cubierta se sintetizan en forma de precursores poliproteicos (pre-env) que son escindidos después por unas proteasas celulares en proteína de superficie madura (SU) y en proteína transmembranaria (TM). Las glicoproteínas de cubierta están implicadas en la entrada de los virus en las células huésped. Reconocen específicamente y se unen a unos receptores de superficie celular y son necesarias para la fusión de la cubierta viral y de las membranas celulares del huésped. El receptor y la cubierta son unas moléculas multiméricas u oligoméricas. Para todos los virus envueltos las interacciones de las glicoproteínas de cubierta con el o los receptores celulares conducen a unas reordenaciones conformacionales de la cubierta necesarias para la exposición del péptido de fusión. La fusión tiene lugar en la superficie de la célula o en unas vesículas celulares que siguen la vía de endocitosis del virión. Además, para permitir la entrada del virus, una fusión mediada por las proteínas de superficie puede, en ciertas condiciones, provocar una fusión célula con célula con el resultado de la formación de células multinucleadas gigantes o sincitio. La formación de sincitio se realiza mediante por lo menos dos vías: un virión se puede fusionar simultáneamente con dos células, se habla entonces de fusión "from without", o una célula infectada que expresa las glicoproteínas de cubierta a su superficie puede fusionar con una célula adyacente (fusión "from within").

Los determinantes de la cubierta y la secuencia de los acontecimientos que causan los cambios conformacionales de la cubierta durante unos procesos de fusión "from without" están bien documentados para los ortomixovirus que necesitan un entorno ácido de las vesículas de endocitosis para su entrada (Skehel, J. J. *et al.*, PNAS, 79:968-972 (1982)). Para los retrovirus, para los cuales la vía de entrada es independiente del pH, los determinantes precisos y las etapas, que condujeron al reconocimiento del receptor hasta la activación de la fusión no están todavía dilucidados. Otros retrovirus son conocidos por inducir una fusión célula a célula ("fusion from within") tales como el virus de la leucemia felina, el virus del tumor mamario del ratón, el virus de la reticuloendoteliosis aviar, VIH y SIV.

30 Por otra parte, Fefferey S. Jones y Rex Risser (Journal of Virology, Ene. 1993, p. 67-74) han demostrado que las glicoproteínas de cubierta del virus de la leucemia murina ecotrópica (MuLV) de tipo salvaje, bajo la dependencia del LTR viral, eran capaces de inducir la formación de sincitio en unas células de rata XC en ausencia de virión (fusión "from within").

35 Según les consta a los inventores, no se ha demostrado jamás ningún poder fusogénico, en un proceso de fusión "from within" de las glicoproteínas de cubierta de un retrovirus endógeno humano.

Unos autores han emitido la hipótesis que la cubierta retroviral endógena de ERV3, un retrovirus endógeno humano parecido a MLV (Moloney Leukemia Virus), podría estar implicada *in vivo* en la elaboración de la placenta por medio de un proceso de fusión (Patrick J. W. Venables *et al.*, Virology, 211, 589-592 (1995)) pero este fenómeno no se ha demostrado jamás *in vitro*. Por otra parte, los estudios sobre el polimorfismo de *env* ERV3, sobre unos individuos de origen caucásico, han permitido poner en evidencia la presencia de una mutación en la región (SU) de la cubierta ERV3 que genera un codón de terminación precoz presente en el estado de homocigoto en 1% de la población estudiada, sin que estos individuos presenten ninguna anomalía del embarazo o del desarrollo placentario (Nathalie de Parseval y Thierry Heidmann, Journal of Virology, Vol. 72, nº 4, páginas 3442-3445 (1998)), poniendo así en duda la hipótesis emitida anteriormente.

Los presentes inventores han demostrado ahora *in vitro* que la glicoproteína de cubierta de HERV-W no modificada, expresada bajo la dependencia de un promotor, preferentemente un promotor heterólogo, posee unas propiedades fusogénicas.

HERV-W es una familia de retrovirus endógenos humanos multi-copia descrita recientemente, denominada así debido a la homología entre el sitio de fijación del cebador de la transcripción inversa y el de los retrovirus aviares que utilizan el ARNt Trp. No se ha evidenciado ninguna entidad competente para su replicación. Se ha verificado la funcionalidad de una región promotora y, entre diferentes tejidos humanos sanos testados, su expresión parece estar restringida a la placenta mediante transferencia Northern (J. L. Blond *et al.*, Journal of Virology, Vol. 73, nº 2, páginas 1175-1185 (1999)). En el cromosoma 7 existe un único marco de lectura abierto que codifica para una cubierta retroviral potencialmente funcional. Un clon ADNc que corresponde aparentemente a un transcrito subgenómico y que contiene la secuencia de la cubierta completa se aisló a partir de material placentario (clon cl. PH74, GenBank AF072506, cuya secuencia se identifica por SEC ID nº 2). Los estudios filogenéticos efectuados al nivel proteico indican que la proteína de cubierta es de tipo D. La secuencia SEC ID nº 2 dada al final de la descripción corresponde por lo tanto a la secuencia nucleotídica en ADNc completa del clon cl. PH74 cuya secuencia proteica se identifica mediante SEC ID nº 1.

65 Env HERV-W posee todos los "atributos" de una cubierta retroviral: en particular, un péptido líder, las dos subunidades características SU y TM separadas por un sitio de escisión por las furinas y, al nivel de su TM, posee

un péptido de fusión hidrófobo, una región inmunosupresiva y una región carboxilo transmembranaria seguida de una cola citoplásmica larga. La expresión de Env HERV-W se ha evidenciado en la placenta.

Los experimentos realizados por los inventores muestran que ENV HERV-W provoca, mediante fusión de célula con célula, la formación de sincitio en diferentes estirpes celulares testadas de origen humano y símico. El fenómeno de fusión observado depende del reconocimiento de receptor(es) específico(s), tal como se muestra de manera directa durante transfecciones y de manera indirecta durante cocultivos de células transfectadas con otros tipos celulares. Los presentes inventores han identificado por otro lado el receptor específico de Env HERV-W mediante un enfoque de competición que se basa en la propiedad de interferencia de las cubiertas retrovirales, bloqueando unos receptores celulares mediante una proteína de cubierta diferente de Env HERV-W, impidiendo así la formación de sincitio. El receptor identificado por los presentes inventores es el receptor hATB^o de los retrovirus de mamíferos de tipo D expresado en las células humanas (Rasko E. J. *et al.* PNAS, 1999, 96: 2129-2134 y Taylor C. S. *et al.* J. Virol., 1999, 73(5): 4470-4474). El procedimiento de puesta en evidencia de este receptor se describe en uno de los ejemplos.

Se describe en él un procedimiento de detección de la expresión de una proteína o de un polipéptido de cubierta de un retrovirus endógeno humano, según el cual la proteína o el polipéptido presenta una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia SEC ID nº 1 o un fragmento de SEC ID nº 1, o una secuencia que presenta, para cualquier sucesión de 20 aminoácidos, por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90% o también por lo menos 95% de similitud con la secuencia SEC ID nº 1 o con un fragmento de SEC ID nº 1, y según el cual se detecta el poder fusogénico de dicha proteína o de dicho fragmento en unas células de un tejido celular o de un cultivo celular, mediante la puesta en evidencia de la formación de sincitio.

Se describe asimismo un procedimiento de detección de la expresión de una proteína o de un polipéptido de cubierta de un retrovirus endógeno humano, según el cual la proteína o el polipéptido presenta una secuencia polipeptídica que presenta, para cualquier sucesión de 20 aminoácidos, por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90% o también por lo menos 95% de similitud con la secuencia SEC ID nº 1, y según el cual se detecta el poder fusogénico de dicha proteína en unas células de un tejido celular, o de un cultivo celular mediante la puesta en evidencia de la formación de sincitio.

Dicha proteína o dicho péptido presenta una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia SEC ID nº 1 o un fragmento de SEC ID nº 1, o una secuencia que presenta, para cualquier sucesión de 20 aminoácidos, por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90%, o también por lo menos 95% de similitud con la secuencia SEC ID nº 1 o con un fragmento de SEC ID nº 1.

Se entiende evidentemente que dicha proteína o dicho polipéptido, o sus fragmentos, si no presentan una similitud completa con SEC ID nº 1 o sus fragmentos, deben poseer un poder fusogénico, preferentemente por lo menos igual o superior al de SEC ID nº 1 o sus fragmentos.

Si los fragmentos de la proteína o del polipéptido anterior presentan una identidad completa con los fragmentos de SEC ID nº 1, entonces el tamaño de estos fragmentos puede ser inferior a 20 aminoácidos, por ejemplo puede ser de aproximadamente 10 aminoácidos, incluso de aproximadamente 5 aminoácidos.

Las variaciones previstas en la secuencia polipeptídica de la proteína o del polipéptido o de sus fragmentos, comprenden las variaciones relacionadas con el polimorfismo, pero también las modificaciones tales como sustitución(es), deleción(es) y adición(es) susceptibles de ser aportadas a dicha secuencia polipeptídica para obtener una proteína, un polipéptido o uno de sus fragmentos que posee un poder fusogénico, en particular por lo menos igual o superior al de SEC ID nº 1 o sus fragmentos.

El análisis del polimorfismo se puede realizar mediante el método SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), que es un método electroforético que permite objetivar, con la ayuda de diferencias de migración, la presencia de por lo menos una mutación que discrimine dos secuencias cortas (inferiores a 250 pb). Así, tal como se ilustra en la figura 4, después de la amplificación sobre el ADN total con la ayuda de los cebadores U6198 y L6186 o U6189 y L6186, es posible analizar el polimorfismo de la cubierta localizada sobre el cromosoma 7 con la ayuda del juego de cebadores representado (U6302 y L6321), que permite generar un conjunto de 10 fragmentos solapantes de tamaño adecuado. El polimorfismo de uno de los sub-fragmentos se puede poner en evidencia asimismo mediante técnicas de secuenciación, llegado el caso de cartografía de restricción, o más sencillamente mediante una técnica de hibridación sándwich de tipo ELOSA que permite discriminar hasta una mutación puntual (Cros P. *et al.*, solicitud de patente europea EP 0 486 661).

Unos ejemplos de secuencias Env HERV-W polimorfas están representados en la figura 1 adjunta, estando las secuencias de ADN correspondientes representadas en la figura 2. Estas figuras representan la alineación de secuencias proteicas y nucleicas obtenidas mediante secuenciación de clones procedentes de tres individuos diferentes.

Por otra parte, se ha estudiado el polimorfismo de LTR que dirige la transcripción del gen *env* situado en el

cromosoma 7. Se observan dos grupos de LTR 5' cuyas secuencias nucleicas obtenidas mediante secuenciación de dos clones procedentes de dos individuos diferentes están representadas y alineadas en la figura 3.

5 Una selección juiciosa de cebadores ha permitido amplificar específicamente en el cromosoma 7, a partir de ADN humano total, un fragmento nucleico que contiene la totalidad de la información U3RU5-gag-pol-env-U3RU5, con la ayuda de los cebadores U6198, L6186 o exclusivamente la secuencia env-U3RU5 con la ayuda de los cebadores U6189, L6186. Dicho enfoque es posible, por ejemplo, utilizando un cebador que solapa la zona de unión entre la secuencia retroviral (U3 más arriba, U5 más abajo) y la secuencia flanqueante no retroviral contigua. Por ejemplo, el
10 cebador L6186 solapa la región U5 3' terminal y la secuencia no retroviral corriente abajo. A partir de dicho producto de PCR que aísla la secuencia de interés de la mezcla de las secuencias HERV-W presentes en el genoma humano, es posible realizar un análisis del polimorfismo.

15 Así, la presente invención tiene por objeto un procedimiento para detectar la expresión de una proteína de cubierta del retrovirus endógeno humano HERV-W que comprende o que consiste en SEC ID nº 1, mediante una célula seleccionada de entre las células óseas, las células musculares, las células placentarias, las células endoteliales, en particular de los vasos sanguíneos, las células epiteliales, las células gliales y las células tumorales o resultantes de estirpes celulares tumorales, según el cual

20 se pone en contacto dicha célula con una célula indicadora que expresa el receptor hATB^o de la proteína de cubierta de HERV-W, y

se observa la formación de sincitio,

25 indicando la formación de sincitio la expresión.

De manera preferida, dicha proteína presenta por lo menos una de las características siguientes:

- está codificada por el gen *env* del retrovirus endógeno HERV-W;
- está codificada por un marco abierto de lectura situado en el cromosoma 7 del genoma humano;
- 30 - presenta una secuencia polipeptídica que consiste en SEC ID nº 1.

De manera preferida, el polipéptido presenta una secuencia polipeptídica que empieza en el aminoácido 448 y termina en el aminoácido 538 de SEC ID nº 1 o una secuencia polipeptídica que presenta, para cualquier sucesión de 20 aminoácidos, por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90% y también por lo menos 95% de similitud con la secuencia polipeptídica que empieza en el aminoácido 448 y termina en el aminoácido 538 de SEC ID nº 1. Preferentemente, consiste en una secuencia polipeptídica que empieza en el aminoácido 448 y termina en el aminoácido 538 de SEC ID nº 1. El polipéptido que responde a la definición anterior es un elemento de regulación que puede conferir o restituir su capacidad fusogénica a una cubierta retroviral no reputada fusogénica en un ensayo de fusión célula-célula.

40 Las células de dicho tejido o de dicho cultivo celular en las que se busca poner en evidencia el poder fusogénico están ventajosamente seleccionadas de entre las células óseas, las células musculares, las células placentarias, las células endoteliales, en particular de los vasos sanguíneos, las células epiteliales, las células gliales y las células tumorales o resultantes de estirpes celulares tumorales.

45 Tal como se ilustrará en los ejemplos siguientes, la detección del poder fusogénico de dicha proteína o de dicho polipéptido se puede aplicar según por lo menos cualquiera de los dos protocolos siguientes.

50 Según un primer protocolo, se obtiene un vector de expresión de dicha proteína o de dicho polipéptido a partir del cual la expresión de la proteína, del polipéptido o de su gen está bajo la dependencia de un promotor, preferentemente un promotor fuerte; se transfectan unas células mediante el vector obtenido para obtener unas células productoras, que expresan en su superficie dicha proteína o dicho polipéptido; y se observa la formación de sincitio o la ausencia de formación de sincitio.

55 Según un segundo protocolo, se obtiene un vector de expresión de dicha proteína o de dicho polipéptido a partir del cual la expresión de la proteína, del polipéptido o de su gen está bajo la dependencia de un promotor, preferentemente un promotor fuerte; se transfectan unas células mediante el vector obtenido para obtener unas células productoras, que expresan en su superficie dicha proteína o dicho polipéptido; se co-cultivan unas células nativas indicadoras que expresan en su superficie un receptor de dicha proteína en presencia de dichas células productoras; y se observa la formación de sincitio o la ausencia de formación de sincitio.

60 Se describe además la utilización de un gen o de un ácido nucleico o de un fragmento de gen o de un ácido nucleico que codifica para una proteína o un polipéptido tales como se han definido anteriormente, en unas condiciones apropiadas que permiten su expresión, para preparar una composición terapéutica o profiláctica.

65 Esta composición terapéutica o profiláctica comprende un gen o un ácido nucleico o un fragmento de gen o de ácido

nucleico que codifica para una proteína o un polipéptido tales como se han definido anteriormente.

Dicha composición puede comprender además un promotor heterólogo o autólogo, preferentemente heterólogo, para la expresión de dicha proteína o de dicho polipéptido.

- 5 Se describen asimismo los objetos siguientes:
- un vector de expresión que comprende por lo menos un gen o un ácido nucleico o un fragmento de gen o de ácido nucleico que codifica para una proteína o un polipéptido tales como se han definido anteriormente, y unos elementos necesarios para su expresión en una célula huésped;
 - una célula huésped que comprende por lo menos un vector de expresión como anteriormente, y
 - una composición terapéutica o profiláctica que comprende por lo menos un vector de expresión o una célula huésped de la invención.

15 Las diferentes composiciones terapéuticas anteriores están destinadas en particular al tratamiento de cánceres, tal como mediante la destrucción de las células cancerígenas por medio de la formación de sincitio. Las diferentes composiciones profilácticas anteriores están destinadas en particular a prevenir una deficiencia en la elaboración de la placenta.

20 Las composiciones terapéuticas o profilácticas, tales como se han definido anteriormente, están destinadas ventajosamente a un tratamiento denominado comúnmente "tratamiento mediante terapia génica" o "tratamiento mediante transferencia de gen".

25 Tal como se ha mencionado anteriormente, las propiedades fusogénicas de la proteína Env HERV-W, del polipéptido Env HERV-W o de sus fragmentos tales como se han definido anteriormente, encuentran una aplicación en particular en el campo de la terapia génica de los cánceres.

30 Hasta la fecha, los genes utilizados más frecuentemente en la terapia contra los cánceres son (i) los genes que codifican para unas proteínas que aumentan la inmunogenicidad de las células tumorales, tales como las citoquinas pro-inflamatorias, (ii) los genes que codifican para unas enzimas que aportan las células cancerígenas sensibles a un pro-medicamento en unos sistemas gen/profármaco, tales como el sistema timidina quinasa del virus *Herpes Simplex*/Ganciclovir o el sistema citosina desaminasa/5FC.

35 De manera ideal, la transferencia de genes terapéuticos debería conducir al mismo tiempo a una destrucción local de las células cancerígenas, a la activación de la inmunidad anti-tumoral para eliminar las zonas tumorales en las que los genes terapéuticos no pueden ser liberados, y el tratamiento no debería causar daños a los tejidos celulares normales del huésped, en particular a los tejidos de los órganos vitales.

40 La proteína o el polipéptido que comprende o que consiste en la proteína Env HERV-W o sus fragmentos, en particular un fragmento que empieza en el aminoácido 448 y termina en el aminoácido 538 de SEC ID nº 1, o una secuencia polipeptídica que presenta para cualquier sucesión de 20 aminoácidos, por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90% o también por lo menos 95% de identidad con SEC ID nº 1 o un fragmento de SEC ID nº 1 y en particular el fragmento identificado anteriormente, bajo la dependencia de un promotor heterólogo o autólogo capaz de inducir su expresión responde a los criterios definidos anteriormente por medio de la formación de sincitio. Estos sincitio se forman a partir de célula(s) transfectada(s) por un proceso de fusión de célula con célula.

45 En un modo de realización que prevé optimizar sus características terapéuticas, la proteína o el polipéptido anterior o cualquier fragmento está eventualmente fusionado con otra(s) proteína(s) o fragmento(s) de proteína(s), incluso si responde intrínsecamente a los criterios definidos anteriormente. Por el contrario, la totalidad o parte de la proteína, y en particular el polipéptido cuya secuencia peptídica comprende o consiste en la secuencia que empieza en el aminoácido 448 y termina en el aminoácido 538 de SEC ID nº 1, puede ser fusionada con otras proteínas con vistas a conferirles unas propiedades particulares. La proteína o el polipéptido anterior o su fragmento es capaz de inducir la formación de sincitio a un pH próximo a la neutralidad o a pH neutro. Típicamente, el vector de expresión o plásmido se adaptará para permitir la expresión de la proteína, del polipéptido o fragmento que induce la formación de sincitio, de tal manera que cuando se expresa la proteína, el polipéptido o fragmento puede inducir la fusión de unas células transfectadas con otras células humanas no transfectadas. Es deseable que la proteína o el polipéptido se expresen independientemente de otros componentes virales, salvo que estos sean útiles para la vectorización.

50 Asimismo, se describe un gen o un ácido nucleico, o un fragmento de gen o de ácido nucleico, recombinante que codifica para una proteína o un polipéptido o un fragmento de éstos que induce la formación de sincitio mediante la fusión de células transformadas y de células malignas dianas y su utilización en el campo de la terapia de enfermedades malignas, tales como los cánceres.

55 Se describe asimismo un método de tratamiento de una enfermedad maligna en un paciente, que consiste en

administrar al paciente el gen o un ácido nucleico, o un fragmento de gen o de ácido nucleico, recombinante que codifica para una proteína o un polipéptido o un fragmento de éstos que induce la formación de sincitio mediante fusión de células transformadas y de células malignas dianas.

5 El gen o el ácido nucleico, o el fragmento de gen o de ácido nucleico, se introduce *in vitro* en unas células humanas apropiadas, tales como unas células de estirpes continuas inmortalizadas, mediante unas técnicas estándares conocidas por el experto en la materia, tal como transfección, transducción o transformación, y las células así transformadas son introducidas a continuación en el paciente en el que pueden ejercer sus propiedades fusogénicas.

10 El gen o el ácido nucleico, o el fragmento de gen o de ácido nucleico de la invención se puede utilizar de diferentes maneras para el tratamiento de cánceres, en particular para el tratamiento de tumores sólidos o blandos. Las células dianas pueden ser transformadas *ex vivo* o *in vivo* por los vectores (plásmidos) que codifican para el polipéptido de la invención.

15 Las propiedades fusogénicas de la proteína Env HERV-W, del polipéptido Env HERV-W o de sus fragmentos tales como se han definido anteriormente, encuentran asimismo una aplicación en el campo de la profilaxis para prevenir una deficiencia en la elaboración de la placenta y paliar unos fracasos de embarazo.

20 El gen o el ácido nucleico o sus fragmentos tales como se han definido anteriormente pueden ser utilizados por lo tanto para diferentes efectos terapéuticos o profilácticos, siendo el último objetivo (i) destruir las células dianas por formación de sincitio que induce una muerte celular de las células dianas mediante un proceso de muerte diferente de la muerte celular por apoptosis, o bien (ii) inducir o favorecer la formación de sincitio, por ejemplo para paliar una deficiencia en la formación de los sincitiotrofoblastos durante el embarazo, o para prevenir una deficiencia en la formación natural de cualquier otro tipo de sincitio, estando dicha deficiencia asociada a una patología.

25 Se describe asimismo la utilización de la proteína Env HERV-W o de un fragmento de Env HERV-W, tales como se han definido anteriormente, en la superficie de un vector de terapia génica que comprende, entre otros, un gen o una secuencia de ácido nucleico o un oligonucleótido de interés terapéutico susceptible de ser expresado en una célula diana o de hibridarse a una secuencia nucleotídica complementaria de una célula diana, interactuando dicha proteína Env HERV-W o dicho fragmento de esta proteína con su receptor celular descrito anteriormente, favoreciendo así la introducción del gen o de la secuencia de ácido nucleico o del oligonucleótido de interés terapéutico en la célula diana.

35 Se describe asimismo un vector de terapia génica que comprende una proteína o un polipéptido o un fragmento de cubierta de un retrovirus endógeno humano, presentando dicha proteína o dicho polipéptido una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia SEC ID nº 1 o un fragmento de SEC ID nº 1, en particular un fragmento cuya secuencia peptídica comprende o consiste en la secuencia que empieza en el aminoácido 448 y termina en el aminoácido 538 de SEC ID nº 1, o una secuencia que presenta para cualquier sucesión de 20 aminoácidos por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90% o también por lo menos 95% de similitud con la secuencia SEC ID nº 1 o con un fragmento de SEC ID nº 1, en particular tal como se ha definido anteriormente. Preferentemente, este vector de terapia génica comprende la secuencia SEC ID nº 1. En un modo de realización particular, el vector de terapia génica citado anteriormente consiste en un vector retroviral clásico de tipo MLV o en un vector lentiviral pseudotipados por la totalidad o parte de la proteína de cubierta Env HERV-W tal como se ha definido anteriormente, o también en un vector sintético que contiene en su superficie la totalidad o parte de la proteína Env HERV-W tal como se ha definido anteriormente que confiere las propiedades de focalización celular y de fusión de la membrana plasmática.

40 Se describe asimismo un vector de terapia génica que comprende en su superficie el receptor de la proteína identificada en SEC ID nº 1, en particular para determinar unas células que producen la proteína identificada en SEC ID nº 1 de manera constitutiva o inducida.

45 Las secuencias de ácidos nucleicos y/o oligonucleótidos de interés terapéutico (anti-sentido o que codifican para una proteína) permiten en particular determinar las células en las que se expresa un gen.

50 Las secuencias de ácidos nucleicos o los oligonucleótidos anti-sentido son capaces de interferir específicamente con la síntesis de una proteína diana, mediante inhibición de la formación y/o del funcionamiento del polisoma, según el posicionamiento del anti-sentido en el ARNm de la diana. Por lo tanto, la selección frecuente de la secuencia que rodea el codón de iniciación de la traducción como diana para una inhibición mediante una secuencia de ácido nucleico anti-sentido o mediante un oligonucleótido anti-sentido pretende prevenir la formación del complejo de iniciación. Otros mecanismos en la inhibición por unos oligonucleótidos anti-sentido implican una activación de la ribonucleasa H que digiere los híbridos oligonucleótido anti-sentido/ARNm o una interferencia a nivel de sitios de corte y empalme por unos oligonucleótidos anti-sentido cuya diana es un sitio de corte y empalme del ARNm. Los oligonucleótidos anti-sentido son asimismo complementarios de secuencias de ADN y pueden por lo tanto interferir a nivel de la transcripción mediante la formación de una triple hélice, emparejándose el oligonucleótido anti-sentido mediante unas uniones de hidrógeno denominadas de Hoogsteen al nivel de un gran surco de la doble hélice de

ADN. En este caso particular, se habla más precisamente de oligonucleótidos antígenos. Se entiende evidentemente que las secuencias de ácidos nucleicos u oligonucleótidos anti-sentido pueden ser estrictamente complementarios de la diana ADN o ARN a la que se deben hibridar, pero también no estrictamente complementarias con la condición de que se hibriden a la diana. Asimismo, se puede tratar de oligonucleótidos anti-sentido no modificados o modificados al nivel de las uniones inter-nucleotídicas. Todas estas nociones forman parte de los conocimientos generales del experto en la materia.

Por lo tanto, se describe una composición terapéutica que comprende, entre otros, un vector de terapia génica, la proteína Env HERV-W o un fragmento de esta proteína tal como se ha definido anteriormente, y una secuencia de ácido nucleico u oligonucleótido anti-sentido tales como se han definido anteriormente.

La proteína Env HERV-W o uno de sus fragmentos se utiliza asimismo como vector terapéutico para la transferencia de un gen de interés terapéutico en una célula diana y en la formulación de una composición terapéutica que comprende por lo menos un vector de terapia génica, la proteína Env HERV-W o un fragmento de esta proteína tal como se ha definido anteriormente, y un gen de interés terapéutico así como los elementos que permiten la expresión de dicho gen de interés terapéutico. Los genes de interés terapéutico pueden ser no mutados o mutados. Pueden consistir asimismo en unos ácidos nucleicos modificados de manera que no les es posible integrarse en el genoma de la célula diana o de los ácidos nucleicos estabilizados con la ayuda de agentes, tales como la espermina.

Por elementos que aseguran la expresión de dicho gen de interés terapéutico *in vivo*, se hace referencia en particular a los elementos necesarios para asegurar la expresión de dicho gen terapéutico, después de su transferencia en una célula diana. Se trata en particular de las secuencias promotoras y/o de las secuencias de regulación eficaces en dicha célula, y eventualmente las secuencias requeridas para permitir la expresión en la superficie de las células dianas de un polipéptido. El promotor utilizado puede ser un promotor viral, ubicuo o específico de tejido o también un promotor sintético. A título de ejemplo, se mencionarán los promotores tales como los promotores de los virus RSV (Rous Sarcoma Virus); MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) o del virus de la vacuna. Es posible además seleccionar una secuencia promotora específica de un tipo celular dado, o que se puede activar en unas condiciones definidas. La bibliografía procura un gran número de informaciones relativas a dichas secuencias promotoras.

En otro modo de realización, se puede utilizar en una composición terapéutica una célula que expresa la proteína Env HERV-W o un fragmento de esta proteína tales como se han definido anteriormente como vehículo de gen(es) de gran tamaño gracias a las propiedades fusogénicas de la proteína o de sus fragmentos que permiten la fusión de la célula vector con una célula huésped deficitaria para uno o más genes determinados, permitiendo así compensar el o los genes deficitarios (ejemplo: distrofina).

Dicha célula se puede utilizar por lo tanto como vector celular.

Las propiedades o poderes fusogénico(s) de la proteína o del polipéptido de la invención o de sus fragmentos se utilizan asimismo en un procedimiento para ensayar la eficacia y seleccionar unos fármacos o sustancias medicamentosas o unos sistemas gen/profármaco susceptibles de intervenir cualitativamente y/o cuantitativamente en su poder fusogénico mediante la puesta en contacto de dicho fármaco o sustancia medicamentosa o dicho sistema gen/profármaco con unas células de un cultivo celular que expresa dicha proteína o dicho polipéptido o dicho fragmento, y la observación de una regresión o de una desaparición en la formación de sincitio, entendiéndose que la formación de sincitio en el estado natural está asociada a un estado patológico. A título de ejemplo, se pueden citar los fenómenos hemorrágicos, la destrucción o alteración de las células neuronales, la destrucción o alteración exacerbada de los osteoblastos.

Se describe asimismo un procedimiento para la selección de fármacos o sustancias medicamentosas o de sistemas gen/profármaco susceptibles de intervenir cualitativa y/o cuantitativamente sobre el poder fusogénico de una proteína o de un polipéptido o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente. Según este procedimiento, se pone en contacto dicho fármaco o sustancia medicamentosa o dicho sistema gen/profármaco con unas células de un cultivo celular que expresa dicha proteína o dicho polipéptido o dicho fragmento y se observa una regresión o una desaparición en la formación de sincitio.

Una secuencia de ácido nucleico o un oligonucleótido anti-sentido que responde a los criterios definidos anteriormente y susceptible de hibridarse e interferir específicamente con la síntesis de la proteína Env HERV-W y una composición terapéutica que comprende, entre otros, dicha secuencia de ácido nucleico u oligonucleótido anti-sentido pueden ser utilizados con el objetivo de obtener *in vivo* una regresión o desaparición de sincitio asociado a un estado patológico.

Con el objetivo de obtener *in vivo* una regresión de la formación de sincitio o una desaparición de sincitio asociados a un estado patológico, se prepara una composición terapéutica que comprende, entre otros, un ligando susceptible de reconocer el receptor identificado anteriormente e inactivar o inhibir el proceso de formación de sincitio o una composición que comprende un gen que codifica para un ligando susceptible de expresarse *in vivo* en una célula

diana o en un tejido celular diana determinado, estando dicho gen bajo la dependencia de los elementos necesarios que aseguran su expresión, después de su transferencia a la célula o al tejido celular diana.

5 Así, por ligando se entiende cualquier molécula que es capaz de reconocer dicho receptor y/o inhibir su función. Se puede tratar, entre otros, de un anticuerpo monoclonal o de un anticuerpo policlonal o de un fragmento de anticuerpos monoclonales o de anticuerpos policlonales. Se puede tratar asimismo de una molécula inhibidora de la función del receptor cuya constante de afinidad sería más grande que la de la proteína Env HERV-W para su enlace y fijación al receptor.

10 La producción de anticuerpos policlonales y monoclonales forma parte de los conocimientos generales del experto en la materia. Se puede citar a título de referencia Kohler G. y Milstein C. (1975): Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256:495-497 y Galfre G. *et al.* (1977) *Nature*, 266: 522-550 para la producción de anticuerpos monoclonales y Roda A., Bolelli G.F.: Production of high-titer antibody to bile acids, *Journal of Steroid Biochemistry*, Vol. 13, pp 449-454 (1980) para la producción de anticuerpos policlonales. Para la producción de anticuerpos monoclonales, se puede acoplar un inmunógeno a la hemocianina de Lymphet Keyhole (péptido KLH) como soporte para la inmunización o a albúmina sérica (péptido SA). Los animales son sometidos a una inyección de inmunógeno utilizando el adyuvante completo de Freund. Los sueros y los sobrenadantes de cultivo de hibridoma procedentes de los animales inmunizados son analizados para su especificidad y su selectividad utilizando unas técnicas clásicas, tales como, por ejemplo, unos ensayos ELISA o Western Blot. Se seleccionan los hibridomas que producen los anticuerpos más específicos y más sensibles. Unos anticuerpos monoclonales pueden asimismo ser producidos *in vitro* mediante cultivo celular de los hibridomas producidos o mediante recuperación de líquido de ascito, después de la inyección intraperitoneal de los hibridomas en el ratón. Sea cual sea el modo de producción, en sobrenadante o en ascito, los anticuerpos son purificados después. Los métodos de purificación utilizados son esencialmente la filtración sobre gel intercambiador de iones y la cromatografía de exclusión o la inmunoprecipitación. Un número suficiente de anticuerpos son focalizados en unos ensayos funcionales para identificar los anticuerpos con rendimiento más elevado. La producción *in vitro* de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos o de derivados de anticuerpos, tales como unos anticuerpos quiméricos producidos mediante ingeniería genética es bien conocida por el experto en la materia.

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

35 Tal como se ha mencionado anteriormente, la terapia génica abre la posibilidad de expresar *in vivo* dichos ligandos mediante la administración de composiciones terapéuticas que comprenden por lo menos un gen que codifica para dicho ligando. Dicho gen de interés terapéutico codifica en particular, (i) o bien para por lo menos un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de anticuerpo monoclonal, o también un anticuerpo transmembranario nativo, o un fragmento de dicho anticuerpo, siempre que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo esté expresado *in vivo* en la superficie de una célula diana o de células dianas de un tejido y sea capaz de reconocer y de unirse a dicho receptor, (ii) o bien para por lo menos una molécula inhibidora tal como se ha descrito anteriormente.

40 Por células dianas o células dianas de un tejido, tales como se han definido anteriormente, se entiende (i) una células al nivel de las cuales se quiere intervenir para prevenir o inhibir la formación de sincitio, (ii) o bien unas células diferentes pero que son susceptibles de expresar el ligando y como consecuencia inhibir y/o bloquear la actividad funcional del receptor.

45 Por elemento que asegura la expresión *in vivo* de dicho gen, se hace referencia en particular a los elementos necesarios para asegurar su expresión, después de la transferencia en una célula diana. Se trata en particular de las secuencias promotoras y/o de las secuencias de regulación eficaces en dicha célula y eventualmente de las secuencias requeridas para permitir la expresión en su superficie de un polipéptido o de una molécula inhibidora, tal como se ha mencionado anteriormente. El promotor utilizado puede ser un promotor viral, ubicuo o específico de tejido o también un promotor sintético. Unos ejemplos de dichos promotores han sido descritos anteriormente.

50 Por anticuerpo transmembranario, se entiende un anticuerpo del que por lo menos la región funcional capaz de reconocer y de fijarse al receptor está expresado en la superficie de las células dianas para permitir el reconocimiento y la fijación. Dichos anticuerpos pueden consistir en unos polipéptidos de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos que define la región funcional y una secuencia de aminoácidos que define un polipéptido transmembranario que permite el anclaje en el seno de la bi-capa lipídica membranaria de las células dianas o en la superficie externa de esta bi-capa lipídica. Unas secuencias nucleicas que codifican para dichos anticuerpos transmembranarios están descritas en la bibliografía.

55 Por gen o secuencia de ácido nucleico o sus fragmentos, se entiende (i) un gen o un ácido nucleico nativo aislado o sus fragmentos aislados obtenidos por corte enzimático, o (ii) un gen o ácido nucleico o sus fragmentos obtenido(s) mediante síntesis química con la ayuda de sintetizadores automáticos, tales como los sintetizadores comercializados por la compañía Applied Biosystems.

Por células tumorales, se entiende (i) unas células de estirpes celulares inmortalizadas o (ii) unas células primarias tumorales extraídas en un paciente.

5 Por promotor autólogo, se entiende un LTR 5' de HERV-W, con la condición de que sea funcional, y por promotor heterólogo se entiende cualquier promotor que no pertenece a la familia de HERV-W, de origen viral, retroviral o celular, eventualmente modificado, con la condición de que sea funcional. Ventajosamente, el promotor autólogo o heterólogo es un promotor fuerte, es decir que es capaz de inducir una expresión cuantitativamente importante de la proteína o del polipéptido.

10 El poder fusogénico de la proteína Env HERV-W puede asimismo ser utilizado para favorecer el proceso de adhesión celular en el caso de injertos heterólogos u homólogos o en procesos de reparación celular.

Ejemplo 1

15 Estirpes celulares:

La estirpe TELCeB6 (Cosset *et al.*, Journal of Virology, 69(12): 7430-7436 (1995)) deriva de la estirpe TELac2 después de la transfección y selección clonal de un plásmido de expresión destinado a producir unas proteínas Gag y Pol de tipo MoMLV (virus de la leucemia murina de Moloney). La estirpe TELac2 deriva inicialmente de las células humanas de rhabdomyosarcoma TE671 (ATCC CRL 8805) y expresa el vector retroviral reportador nlsLacZ (Takeuchi *et al.*, Journal of Virology, 68 (12): 8001-8007 (1994)). La producción de partículas retrovirales infecciosas por las células TELCeB5 depende de los vectores de expresión de cubierta transfectados.

25 Estas células son cultivadas en medio DMEM (Dulbecco modified Eagle medium - Life Technologies) con 10% de suero de ternera fetal (Life Technologies). De manera general, se ha utilizado este medio para todos los demás tipos celulares, es decir las células TE671 (ATCC CRL 8805 - rhabdomyosarcoma humano), A-431 (ATCC CRL-1555 - tumor sólido, carcinoma epidermoide humano), HeLa (ATCC CCL-2), COS (ATCC CRL-1651), PAE (células endoteliales de aorta de cerdo), XC (ATCC CCL-165 - sarcoma de rata), NIH-3T3 y QTB (ATCC CRL-1708).

30 Construcción de los vectores de expresión de cubierta:

Se ha utilizado el plásmido pHCMV para la expresión de *env* HERV-W. Se ha utilizado el plásmido FBASALF-ARless en calidad de control positivo de fusión; produce una forma altamente fusogénica de la glicoproteína de cubierta MLV anfotrópica, modificada por introducción de un codón de terminación antes del primer aminoácido del péptido intracitoplásmico p2-R (Rein *et al.*, Journal of Virology, 68 (3): 1773-1781 (1994)). Se ha utilizado *env* HERV-W clonado en anti-sentido en el plásmido pHCMV como control negativo.

40 Transfección y ensayos de fusión de célula con célula (co-cultivo):

Los plásmidos de expresión de las glicoproteínas de cubierta son transfectados en las células TELCeB6 mediante precipitación con fosfato de calcio (Cosset *et al.*, Journal of Virology, 69 (10): 6314-6322 (1995)). Las células TELCeB6 confluyentes que expresan Env son fijadas al glutaraldehído a 0,5% en PBS, durante 24h, después de la transfección. Una coloración mediante disoluciones de May-Grünwald y Giemsa (MERK) se efectúa entonces según las recomendaciones del proveedor. Esta tinte los núcleos en violeta y los citoplasmas en malva y permite visualizar los sincitios.

50 Para los experimentos de co-cultivo, las células transfectadas son desenganchadas del soporte, completadas y después reinoculadas a concentración igual (3×10^5 células/pocillo) en placas de 6 pocillos. Se añaden entonces células frescas indicadoras a las células transfectadas a razón de 10^6 células por pocillo y se prosigue el co-cultivo durante 24h. Una coloración XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) puede entonces ser efectuada para teñir el núcleo de las células TELCeB6 (Cosset *et al.*, Journal of Virology, 69 (10): 6314-6322 (1995)). Esta va seguida de una coloración mediante disoluciones de May-Grünwald y Giemsa (MERCK) efectuada según las recomendaciones del proveedor.

55 La mayoría de los sincitios se puede observar 18 a 24 horas después del principio de la transfección; el desprendimiento progresivo de las células no permite más observación, ni coloración 36 horas después de la transfección. La fusión observada corresponde a una fusión "from within", es decir una fusión de célula con célula, a partir de una célula que expresa la cubierta, por oposición a una fusión "from without" que corresponde a una formación de sincitio consecutiva a una fusión virón-célula(s).

60 La tabla 1 a continuación reúne los resultados obtenidos en lo que se refiere a la capacidad de fusión de célula con célula de Env HERV-W mediante transfección directa, comparada con la de la cubierta control ARless. Las células TELCeB5 y TE671 corresponden a unas estirpes de origen humano. Las células COS son unas células de riñón de simio verde. Las células XC son unas células de rata.

65

Tabla I

Cubierta	Índice de fusión en las células			
	TELCeB6	TE671	COS	XC
ARless	33	8,6	In.	40
HERV-W	61	24,7	3,6	0

5 ^a índice de fusión que corresponde al porcentaje $(N-S)/T$, en el que N es el número de núcleo en sincitio, S es el número de sincitio y T es el número total de núcleos contados. inn. significa innumerables, organizados en "red"

10 La tabla 1 muestra que los resultados son por lo menos tan importantes para Env HERV-W como para el control sobre las células de origen humano. Son menores en las células simicas. Env HERV-W no induce la formación de sincitio sobre unas células de rata.

15 La tabla II siguiente reúne los datos observados en unos experimentos de co-cultivo de células indicadoras con unas células TELCeB6 transfectadas por pHCMV-*env* HERV-W. El tipo, el origen y la especie de las células indicadoras son indicados. La formación de sincitio se indica mediante las menciones sí/no.

Tabla II

Especie	Tipo celular	Origen	Fusión en co-cultivo con TELCeB6
Hombre	TE671	Rabdomiosarcoma	Sí
	A431	Carcinoma epidermoide	Sí
	HeLa	Carcinoma epitelioide	Sí
Simio	COS	Tipo fibroblástico	Sí
Cerdo	PAE	Endotelio	Sí
Rata	XC	Sarcoma	No
Ratón	3T3	Fibroblástico	No
Codorniz	QT6	Fibrosarcoma	No

20 La tabla II detalla los resultados de los experimentos de co-cultivo en función de las estirpes celulares ensayadas. Se observa unos sincitio en unas células humanas de rabdomiosarcoma (TE671), de carcinoma epidermoide (A431) y de carcinoma epitelioide (HeLa), así como en unas células de simio de tipo fibroblástico (COS), unas células de cerdo de endotelio (PAE) y unas células de ratón de tipo fibroblástico (3T3). El hecho de que la cubierta endógena humana Env HERV-W sea capaz de fusionar en unas células de cerdo puede plantear unos problemas en el ámbito del trasplante de órganos (xenotrasplante).

25 **Ejemplo 2**

Amplificación conjunta y después selectiva de la LTR y de la cubierta:

30 Con el fin de estudiar el polimorfismo de la región que codifica la cubierta y de la región promotora U3 de la LTR 5' asociada, situadas en el cromosoma 7, se realiza una amplificación específica de un fragmento de 10 kb gracias a un par de cebadores específicos. En efecto, sabiendo que la familia HERV-W comprende numerosas copias no codificantes y en particular un número importante de LTR, esta estrategia permite amplificar específica y conjuntamente la región *env* y su secuencia promotora (LTR 5') situada más arriba, exclusivamente sobre el cromosoma 7. Se utiliza para ello un cebador U6198 que se hibrida sobre una secuencia específica situada más arriba de la LTR 5' sobre el cromosoma 7, y un cebador L6186 que se hibrida de manera solapante en la región U5 del LTR 3' y el gen celular adyacente, sobre este mismo cromosoma. La longitud PCR (o LD-PCR) se realiza en las condiciones siguientes, 1 x 5 min. a 94°C, 10 x (10 s a 94°C, 30 s a 55°C, 8 min. a 68°C), 25x (10 s a 94°C, 30 s a 55°C, 8 min. a 68°C + 10 s/ciclo), 1 x 7 min. a 68°C, en presencia de tampón de amplificación (50 mM Tris HCL pH 9,0 a 25°C, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100); 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 330 nM de cada cebador (U6198 y L6186), 1 U de ADN polimerasa así como 200 ng de matriz (ADN genómico) en un volumen final de 50 ml.

45 A partir de este producto PCR de 10 kb diluido, se efectúan una PCR anidada "env" así como una PCR "LTR", con el fin de objetivar la presencia o no de un polimorfismo de estas dos regiones. La dilución permite una amplificación específica a partir del producto de LD-PCR y no del material genómico de partida. La PCR anidada "env" se realiza gracias a los cebadores U6198 y L6186, siendo el cebador U6189 el empleado para la LD-PCR, estando el cebador U6189 situado más arriba del ATG de *env*. La región U3 del LTR 5' se amplifica mediante el par de cebador U6460 y L5643. El cebador U6460 se hibrida más arriba de la LTR 5' mientras que el cebador L5643 se hibrida en el dominio R de la LTR 5'. Las PCR anidadas son realizadas en las condiciones siguientes, 1 x 5 min. a 94°C, 30 x (1 min. a 94°C, 1 min. a 53°C, 3 min. a 72°C), 1 x 7 min. a 72°C, en presencia de tampón de amplificación (10 mM Tris HCL pH 8,3, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,25mM de cada dNTP, 330 nM de cada cebador, 1,25 U de ADN polimerasa, una alícuota del producto de amplificación de la LD-PCR, en un volumen final de 50 ml.

Análisis del polimorfismo:

Con el fin de objetivar la presencia o no de un polimorfismo, los productos de las PCR anidadas pueden ser analizados de diferentes maneras, en particular la secuenciación o el análisis por la técnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) que permite demostrar la presencia de por lo menos una mutación entre dos secuencias cortas de un tamaño medio de 250 pb.

Polimorfismo del gen *env*: la utilización de 20 cebadores (10 cebadores sentido pares: 6302 a 6320 y 10 cebadores anti-sentido impares: 6303 a 6321) permite la secuenciación de la región codificante de la cubierta a partir del producto de la cubierta de PCR anidada. Estos cebadores pueden asimismo ser utilizados para un análisis del polimorfismo por SSCP. A título de ejemplo, las secuencias de los genes de cubierta de tres donantes sanos etiquetados D6, D10 y D21 son ilustradas en la figura 2. Estas secuencias muestran la existencia de un bajo índice de polimorfismo. Si se utiliza la secuencia de cubierta del donante D6 como referencia arbitraria, la secuencia de la cubierta del donante D21 posee una mutación en posición 386 (T386C), induciendo la sustitución de la timina por la citosina un cambio de aminoácido de valina en alanina (V128A en numeración proteica). Asimismo, la secuencia del gen de la cubierta del donante D10 presenta dos mutaciones con respecto a la secuencia del donante D6, en posición 671 (T671C) y 920 (G920A), induciendo dos cambios de aminoácidos, respectivamente de valina en alanina (V224A en numeración proteica) y de serina en asparagina (S306N en numeración proteica). Estas secuencias ilustran la existencia de un polimorfismo. Se ha realizado la secuenciación de 12 ADN de pacientes y permitió observar un bajo índice de polimorfismo entre los ADN ensayados. Por ejemplo, la comparación de las secuencias procedentes de dos individuos anotados 10 y 21 muestra la presencia de tres bases de diferencia en ácidos nucleicos sobre las 1617 bases del gen, lo que corresponde a un índice de polimorfismo de 0,19%. Dos mutaciones están situadas en la secuencia del ADN 10 (T671C y G920A) y una en la secuencia del ADN 21 (T386C). La secuencia del individuo 6 sirve de referencia. Este mismo análisis a nivel proteico permite observar 3 aminoácidos mutados para la cubierta entera que comprende en total 538 aminoácidos, es decir un índice de polimorfismo de 0,56%. Las dos mutaciones de la secuencia procedente del individuo 10 son V224A y S306N y la de la secuencia procedente del individuo 21 es V128A.

Polimorfismo de la región promotora U3 de la LTR5' asociada al gen de cubierta: la secuenciación del dominio U3 de LTR5' se realizó gracias a los 2 cebadores anteriormente utilizados para la PCR anidada LTR. A título de ejemplo, las secuencias de la región U3 de LTR5' (asociada al gen de la cubierta) de dos de los donantes sanos (etiquetados D6 y D21) para los cuales la cubierta, por otra parte, se ha secuenciado, son ilustradas en la figura 3. Estas secuencias muestran la existencia de un índice de polimorfismo más importante que para el gen de la cubierta. Se señalará en particular las variaciones en las posiciones 210 (T para D6, C para D21), 211 (G para D6, A para D21), 229 (A para D6, G para D21), 231 (T para D6, C para D21), 232 (C para D6, A para D21).

Las secuencias de los cebadores utilizadas para la PCR, el SSCP y la secuenciación son ilustradas en la tabla III siguiente.

Tabla III

NOMBRE:	SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS:
	Cebadores PCR larga
U6198:	5'-CAA-AAC-GCC-TGG-AGA-TAC-AGC-AAT-TAT-C-3'
L6186:	5'-GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Cebadores PCR anidada <i>env</i>
U6189:	5'-CTG-AAA-ATC-CAG-GAG-ACA-ACG-CTA-GC-3'
L6186:	5'-GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Cebadores PCR anidada LTR 5'
U6460:	5'-TTG-GTA-CCC-AAA-ACG-CCT-GGA-GAT-ACA-GCA-ATT-ATC-3'
L5643:	5'-AAC-TCG-AGT-GAA-ATA-GCA-TGA-AAA-CAG-AG-3'
	Cebadores SSCP y secuenciación <i>env</i> .
U6302:	5'-AGG-AAA-GTA-ACT-AAA-ATC-ATA-AAT-C-3'
L6303:	5'-GGT-TCC-CTT-AGA-AAG-ACT-CC-3'
U6304:	5'-AAT-ATT-GAT-GCC-CCA-TCG-TAT-A-3'
L6305:	5'-CCA-GTT-TGG-GTG-AAG-TAA-GTC-3'
U6306:	5'-GGA-GGA-CTT-GGA-GTC-ACT-GTC-3'
L6307:	5'-AGG-CGA-GTA-TGG-GTA-CGG-AG-3'
U6308:	5'-GGA-CTA-GAT-CTC-TCA-AAA-CTA-CA-3'
L6309:	5'-ACG-GAA-GTG-GTG-TTT-ATT-TCT-G-3'
U6310:	5'-CCT-GAA-CAA-TGG-AAC-AAC-TTC-3'
L6311:	5'-ATT-CCT-GAG-GGT-AGG-CAG-AC-3'
U6312:	5'-GGT-AAC-TCC-TCC-CAC-ACA-AA-3'
L6313:	5'-GAA-TGG-GTA-CTC-TTT-TGT-TGC-3'
U6314:	5'-TAC-AGT-TAT-GTC-ATA-TCT-AAG-CC-3'

Tabla III (continuación)

NOMBRE:	SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS:
L6315:	5'-TAA-GTT-GAT-CTT-GCA-AGG-TGA-C-3'
U6316:	5'-CTA-AAT-GGG-GAC-ATG-GAA-CG-3'
L6317:	5'-TAT-TCG-ATC-TGG-AAT-TTC-TTC-AAC-3'
U6318:	5'-CAA-TCC-GGA-ATC-GTC-ACT-GA-3'
L6319:	5'-AGA-CAA-AGT-TAA-CAA-GGA-GGT-TC-3'
U6320:	5'-ACT-CCT-CTT-TGG-ACC-CTG-TAT-C-3'
L6321:	5'-GAG-GTT-GGC-CGA-CCA-CCG-3'

U hace referencia a unos cebadores sentido y L hace referencia a unos cebadores inversos.

5 **Ejemplo 3**

Con el fin de determinar el receptor reconocido por la glicoproteína de cubierta de HERV-W entre los receptores conocidos como estando expresados en las células humanas, es decir PiT-2 (el receptor de MLV anfotrópicos), PiT-1 (el receptor de GALV-gibbon ape leukemia virus y FeLV-B-feline leukemia virus tipo B) y hATB⁰ (el receptor de los retrovirus mamíferos de tipo D asimismo reconocido por el retrovirus RD114), se han realizado unos ensayos de interferencia. Para ello, se han transfectado unas células TELCeB6, bien con el plásmido de expresión que codifica para la cubierta HERV-W, bien con el plásmido de expresión que expresa el ARN mensajero anti-sentido del gen que codifica para la cubierta HERV-W, o bien con el plásmido de expresión que codifica para una variante hiperfusogénica de la cubierta MLV anfotrópica denominada ARless. Estas células, denominadas "células productoras" se co-cultivaron después con unas células humanas, llamadas "células indicadoras", que expresan el receptor de la cubierta HERV-W, y que expresan, además, de manera estable, bien la cubierta de GALV, bien la cubierta de MLV anfotrópico, bien la cubierta de RD114. La expresión de estas diversas glicoproteínas de cubierta sobre estas células es capaz de reconocer los receptores correspondientes, de bloquearlos y por lo tanto de disminuir su capacidad de interactuar con una glicoproteína de cubierta retroviral correspondiente, pero expresada de manera exógena, en la superficie de las células "productoras". Así, si durante unos ensayos de fusión por co-cultivo, se observa una disminución en la formación de sincitio para un tipo celular indicador que bloquea uno de estos receptores mediante comparación con la célula indicadora parental para la cual el conjunto de los tres receptores potenciales es totalmente accesible, se podrá deducir la naturaleza del receptor reconocido por la cubierta expresada en la célula productora. Después de dos días de co-cultivo, las células se han fijado, teñido, y los índices de fusión determinados. Los resultados son presentados en la tabla IV siguiente.

Tabla IV

Proteína de cubierta expresada en las células productoras	Proteínas de cubierta expresadas en las células indicadoras.			
	Control	MLV-A	GALV	RD114
ARless	+	-	+	+
Anti-sentido HERV-W	-	-	-	-
HERV-W	+	+	+	-

- significa una ausencia de sincitio y + significa la presencia de sincitio
Control significa que no hay proteína de cubierta expresada en esta célula.

Estos resultados permiten deducir que la glicoproteína de cubierta de HERV-W reconoce el receptor hATB⁰ de los retrovirus de mamíferos de tipo D. En efecto, mientras que esta cubierta es fusogénica para las células indicadoras parentales o para las células indicadoras que expresan la cubierta MLV-A o bien la cubierta GALV, no se observa sincitio cuando las células productoras que expresan la glicoproteína de cubierta de HERV-W son co-cultivadas con las células indicadoras que expresan la cubierta RD114.

35

Ejemplo 4: Control de la actividad fusogénica de HERV-W Env mediante su parte citoplásmica.

La implicación de la parte citoplásmica de HERV-W Env en la actividad fusogénica de esta glicoproteína se demuestra mediante la construcción y la caracterización de las glicoproteínas recombinantes siguientes:

40

W/CD46+, derivado del CD46 humano, factor de protección de las células frente al complemento y no implicado en la formación de sincitio, que comprende el ectodominio y el dominio transmembranario de HERV-W Env (aa 1 a 469) fusionados al dominio citoplásmico de CD46 (aa 335 a 369). Esta molécula quimérica no es fusogénica en un ensayo de fusión célula-célula (figura 5).

45

W/R+, derivado de la glicoproteína de cubierta del retrovirus MLV-A (amphotropic murine leukemia virus), no fusogénico cuando se expresa independientemente de las demás proteínas de MLV-A, que comprende el ectodominio y el dominio transmembranario de HERV-W Env (aa 1 a 469) fusionados al dominio citoplásmico de la

glicoproteína de cubierta del retrovirus MLV-A (aa 622 a 654). Esta molécula quimérica no es fusogénica en un ensayo de fusión célula-célula (figura 5).

5 RD/W, derivado de la glicoproteína de cubierta del retrovirus endógeno felino RD114, no fusogénico cuando se expresa independientemente de las demás proteínas del RD114, que comprende el dominio citoplásmico y el dominio transmembranario de HERV-W Env (aa 448 a 538) fusionados al ectodominio de la glicoproteína de cubierta del retrovirus RD114 (aa 1 a 508). Esta molécula quimérica es fusogénica en un ensayo de fusión célula-célula (figura 5).

10 La figura 5 adjunta representa el esquema y la caracterización de las quimeras Env HERV-W citadas anteriormente y los resultados obtenidos en un ensayo de fusión célula-célula.

15 El ectodominio de HERV-W está definido por el polipéptido derivado del precursor proteico que contiene los aminoácidos (aa) 21 a 447; el dominio transmembranario, los aa 448 a 469 y la parte citoplásmica, los aa 470 a 538 (Blond *et al.*, (1999) Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *Journal of Virology*. 73:1 175-1185).

20 El ectodominio de CD46 está definido por el polipéptido derivado del precursor proteico que contiene los aminoácidos (aa) 35 a 312; el dominio transmembranario, los aa 313 a 334 y la parte citoplásmica, los aa 335 a 369 (Yant *et al.*, (1997), Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. *J Virol*.71:766-770).

25 El ectodominio de MLV-A Env está definido por el polipéptido derivado del precursor proteico que contiene los aminoácidos (aa) 32 a 598; el dominio transmembranario, los aa 599 a 621 y la parte citoplásmica, los aa 622 a 654 (Ott y Rein, (1990), Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J Virol*. 64:757-766).

30 El ectodominio de RD114 Env está definido por el polipéptido derivado del precursor proteico que contiene los aminoácidos (aa) 18 a 508; el dominio transmembranario, los aa 509 a 530 y la parte citoplásmica, los aa 531 a 564 (Cosset *et al.*, (1995b), High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol*. 69:7430-7436).

35 SU significa sub-unidad de superficie; TM sub-unidad transmembranaria; SP péptido señal; tm dominio de anclaje transmembranario; cyt parte citoplásmica; RBD dominio de unión al receptor; PRR región rica en prolina; C dominio carboxi-terminal de la SU.

Listado de secuencias

- 40 <110> BIO MERIEUX
- <120> Procedimiento de detección de la expresión de una proteína de cubierta de un retrovirus endógeno humano y utilizations de un gen que codifica para esta proteína
- 45 <130> Poder fusogénico de env de ERV-W
- <190>
- <141>
- <160> 2
- 50 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 538
- 55 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 376 726 T3

Leu Tyr Ser Tyr Val Ile Ser Lys Pro Arg Asn Lys Arg Val Pro Ile
 305 310 315 320
 Leu Pro Phe Val Ile Gly Ala Gly Val Leu Gly Ala Leu Gly Thr Gly
 325 330 335
 Ile Gly Gly Ile Thr Thr Ser Thr Gln Phe Tyr Tyr Lys Leu Ser Gln
 340 345 350
 Glu Leu Asn Gly Asp Met Glu Arg Val Ala Asp Ser Leu Val Thr Leu
 355 360 365
 Gln Asp Gln Leu Asn Ser Leu Ala Ala Val Val Leu Gln Asn Arg Arg
 370 375 380
 Ala Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Arg Gly Gly Thr Cys Leu Phe Leu
 385 390 395 400
 Gly Glu Glu Cys Cys Tyr Tyr Val Asn Gln Ser Gly Ile Val Thr Glu
 405 410 415
 Lys Val Lys Glu Ile Arg Asp Arg Ile Gln Arg Arg Ala Glu Glu Leu
 420 425 430
 Arg Asn Thr Gly Pro Trp Gly Leu Leu Ser Gln Trp Met Pro Trp Ile
 435 440 445
 Leu Pro Phe Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ile Ile Leu Leu Leu Leu Phe
 450 455 460
 Gly Pro Cys Ile Phe Asn Leu Leu Val Asn Phe Val Ser Ser Arg Ile
 465 470 475 480
 Glu Ala Val Lys Leu Gln Met Glu Pro Lys Met Gln Ser Lys Thr Lys
 485 490 495
 Ile Tyr Arg Arg Pro Leu Asp Arg Pro Ala Ser Pro Arg Ser Asp Val
 500 505 510
 Asn Asp Ile Lys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Ile Ser Ala Ala Gln Pro
 515 520 525
 Leu Leu Arg Pro Asn Ser Ala Gly Ser Ser
 530 535

5 <210> 2
 <211> 2781
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 376 726 T3

atgggagctg ttttcattgct atttcactct attaaatctt gcaactgcac tcttctggtc 60
catgtttctt acggctcgag ctgagctttt gctcaccgtc caccactgct gtttgccacc 120
accgcagacc tgccgctgac tcccatccct ctggatccctg cagggtgtcc gctgtgctcc 180
tgatccagcg aggcgcccat tgccgctccc aattgggcta aaggcttgcc attgttccctg 240
cacggctaag tgccctgggtt tgttctaatt gagctgaaca ctagtcaactg ggttccatgg 300
ttctcttctg tgaccacagc cttctaatag aactataaca cttaccacat ggccaagat 360
tccattcctt ggaatccgtg agccaagaa ctccaggta gagaatacga ggcttgccac 420
catcttgaa gcgccctgct accatctggg aagtgggtca ccaccatctt gggagctctg 480
tgagcaagga cccccggta acattttggc aaccacgaac ggacatccaa agtgatacat 540
cctgggaagg accctaccca gtcattttat ctaccccaac tgcggttaaa gtgctggag 600
tggagtcttg gatacatcac acttgagta aatcctggat actgccaag gaacctgaaa 660
atccaggaga caacgctagc tttcctgctg aacctctaga ggatttgcgc ctgctcttca 720
aacaacaacc aggaggaaa taactaaaa cataaatccc catggccctc ccttatcata 780
ttttctctt tactgttctt ttaccctctt tcaactctac tgcacccctc ccatgcccct 840
gtatgaccag tagctcccct taccaagagt ttctatggag aatgcagcgt cccgaaaata 900
ttgatgcccc atcgtatagg agtctttcta agggaacccc caccttcaact gcccacaccc 960
atatgccccg caactgctat cactctgcca ctctttgcat gcatgcaaat actcattatt 1020
ggacagaaa aatgattaat cctagttgct ctggaggact tggagtcaact gctgttggga 1080
cttacttca ccaactggtt atgtctgatg ggggtggagt tcaagatcag gcaagagaaa 1140
aacatgtaaa agaagtaatc tcccaactca cccgggtaca tggcacctct agcccctaca 1200
aaggactaga tctctcaaaa ctacatgaaa cctccgtac ccatactgc ctgtaagcc 1260
tatttaatac caccctcaact gggtccatg aggtctcggc ccaaaaccct actaactgtt 1320
ggatagcct cccctgaaac ttcaggccat atgtttcaat cctgtacct gaacaatgga 1380
acaactcag cacagaaata aacaccactt ccgttttagt aggacctctt gttccaatc 1440
tggaaataac ccatacctca aacctcactt gtgtaaaatt tagcaatact acatacacia 1500
ccaactccca atgcatcagg tgggtaactc ctcccacaca aatagtctgc ctaccctcag 1560
gaatattttt tgtctgtggt acctcagcct atcgttggtt gaatggctct tcagaatcta 1620

tgtgcttctt ctattctta gtgccccta tgaccatcta cactgaacia gatttatata 1680
gttatgtcat atctaagccc cgcaaaaaa gactacccat tcttctttt gttataggag 1740
cgggagtgtc aggtgcaacta ggtactggca ttggcggat cacaacctct actcagttct 1800
actacaaact atctcaagaa ctaaatggg acatggaacg ggtcgcgcac tccctggctca 1860
ccttgcaaga tcagcttaac tccctagcag cagtgtcct tcaaaatcga agagcttttag 1920
acttgctaac cgctgaaaga gggggaacct gtttattttt aggggaagaa tgcgttatt 1980
atgttaatca atccggaatc gtcactgaga aagttaaaga aattcgagat cgaatacaac 2040
gtagagcaga ggagcttca aacctggac cctggggcct cctcagccaa tggatgccct 2100
ggattctccc ctcttagga cctctagcag ctataatatt gctactcctc tttggacct 2160
gtatctttaa cctccttgtt aactttgtct cttccagaat cgaagctgta aaactacaaa 2220
tggagcccaa gatgcagtcc aagactaaga tctaccgag acccctggac cggcctgcta 2280
gcccacgac tgatgttaat gacatcaaag gacccctcc tgaggaaatc tcagctgac 2340
aacctctact acgcccctca tcagcaggaa gcagttagag cggctcgtcg ccaacctccc 2400
caacagcact taggttttcc tgttgagatg ggggactgag agacaggact agctggattt 2460
cctaggtctga ctaagaatcc ctaagcctag ctgggaaggt gaccacatcc accttaaac 2520
acgggcttg caacttagct cacacctgac caatcagaga gctcactaaa atgctaatta 2580
ggcaaaagca ggaggtaaa aatagccaa tcatctattg cctgagagca cagcaggagg 2640
gacaatgatc ggatataaa cccaagtctt cgagccggca acggcaacc cctttgggtc 2700
ccctccctt gtatgggagc tctgttttca tgctatttca ctctatataa tcttgcaact 2760
gcaaaaaaaaa aaaaaaaaa a 2781

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar la expresión de una proteína de cubierta del retrovirus endógeno humano HERV-W que comprende o que consiste en SEC ID nº 1, mediante una célula seleccionada de entre las células óseas, las células musculares, las células placentarias, las células endoteliales, en particular de los vasos sanguíneos, las células epiteliales, las células gliales y las células tumorales o procedentes de estirpes celulares tumorales, caracterizado porque
- 10 se pone en contacto dicha célula con una célula indicadora que expresa el receptor hATB⁰ de la proteína de cubierta de HERV-W, y
- se observa la formación de sincitio,
- 15 indicando la formación de sincitio la expresión de la proteína de cubierta de HERV-W,
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína está codificada por un marco abierto de lectura situado en el cromosoma 7 del genoma humano.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la secuencia peptídica de la proteína consiste en la SEC ID nº 1.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha célula se selecciona de entre unas células transfectadas por un vector de expresión de dicha proteína.

Fig. 1

Consenso	MALPYHILF TVLLPFTLT APPRCRMTS SSPYQEFMR MQRPNIDAP SYRSLKSTP TFTAHTMPR NCHSATLCH HANTHWYTK MINFPCPGL	100
P Env ADN 10	100
P Env ADN 21	100
P Env ADN 6	100
Consenso	GVTVCWYFT QTGMSDGGV QDQAREKHVK EVISQTRVH GTSSPYKGLD LSKLHETLRT HTRLVLENT TLTLGHEVSA QNPTNCWICL PLNFRPYVSI	200
P Env ADN 10	200
P Env ADN 21A.....	200
P Env ADN 6	200
Consenso	PVPEQMNFS TEINTSVLV GPLYSNLEIT HTSNLTCVKF SNTTYTNSQ CIRWTPPTQ IVCLPSGIFV VCGTSAYRCL NGSESNCFL SFLVPPMTIY	300
P Env ADN 10A.....	300
P Env ADN 21	300
P Env ADN 6	300
Consenso	TEQDLYSYVI SKPRNKRVI LPFVIGAVL GALGTGIGGI TTSTQFYKL SQELNGDHER VADSLVTLOD QLNSLAAVVL QNRRLDILT AERGGTCLFL	400
P Env ADN 10N.....	400
P Env ADN 21	400
P Env ADN 6	400
Consenso	GEECCYYNQ SGIVTEKVE IRDRIQRRAE ELRNTGFWGL LSQWPFILP FLGPLAAIL LLLFGPCIFN LLVNFVSSRI EAVKQMEPK MOSKTIYRR	500
P Env ADN 10	500
P Env ADN 21	500
P Env ADN 6	500
Consenso	PLDRPASPRS DVNDIKGTPP EEISAAQPILL RENSAGSS	538
P Env ADN 10	538
P Env ADN 21	538
P Env ADN 6	538

CTCAGCCAAAT	GGATGCCCTG	GATTCCTCCC	TTCCTTAGGAC	CTCTAGCAGC	TATAAATATG	CTACTCCTCT	TGGACCCTG	TATCTTTAAC	CTCCTTGTTA	ACTTGTCTC	TCCAGAATC	1440	
.....	1440	
.....	1440	
.....	1440	
Consenso													
Env ADN 6													
Env ADN 10													
Env ADN 21													
Consenso													
Env ADN 6	GAAGCTGTAA	AACTACAAT	GGAGCCCAAG	ATGCAGTCCA	AGACTAAGAT	CTACCGCAGA	CCCCTGGACC	GGCCTGCTAG	CCCACGATCT	GATGTTAATG	ACATCAAAGG	CACCCCTCCT	1560
.....	1560
.....	1560
.....	1560
Consenso													
Env ADN 6	GAGGAATCT	CAGCTGCACA	ACCTTACTA	CCCCCMAAT	CAGCAGGAAG	CAGTTAG							1617
.....							1617
.....							1617
.....							1617

Fig. 2 (continuación)

Fig. 3

Consenso	TGAGAGACAG GACTAGCTGG ATTTCTAGG CGACTAGA ATCCCTAAGC CTAGCTGGGA ARGTGACCAC GTCCACCTTT AAACACGGGG CTTGCAACTT	100
LTR6 c1A	100
LTR21 c1S	100
Consenso	AGCTCACACC TGACCAATCA GAGACTCAC TAAAATGCTA ATTAGGEMAA GACRGGAGGT AAAGAAATAG CCAATCATCT ATTGCCTGAG AGCACAGCAG	200
LTR6 c1A	200
LTR21 c1S	200
Consenso	GAGGACAAY RATGGGATA TAAACCARG YMTTCGAGCY GGCAC	246
LTR6 c1AT G.....A. TC.....C	246
LTR21 c1SC A.....G. CA.....T	246

Fig. 4

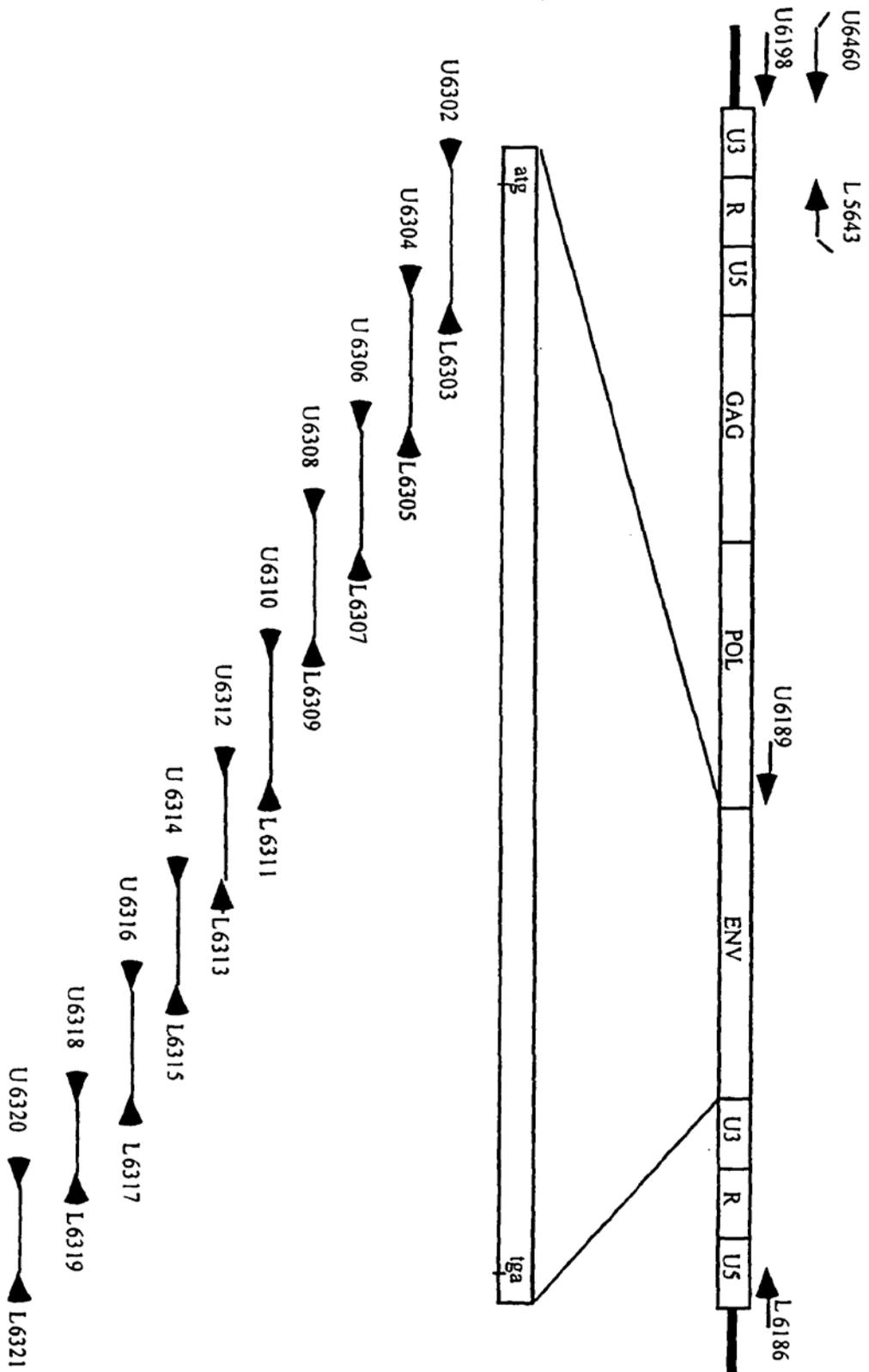


Fig. 5

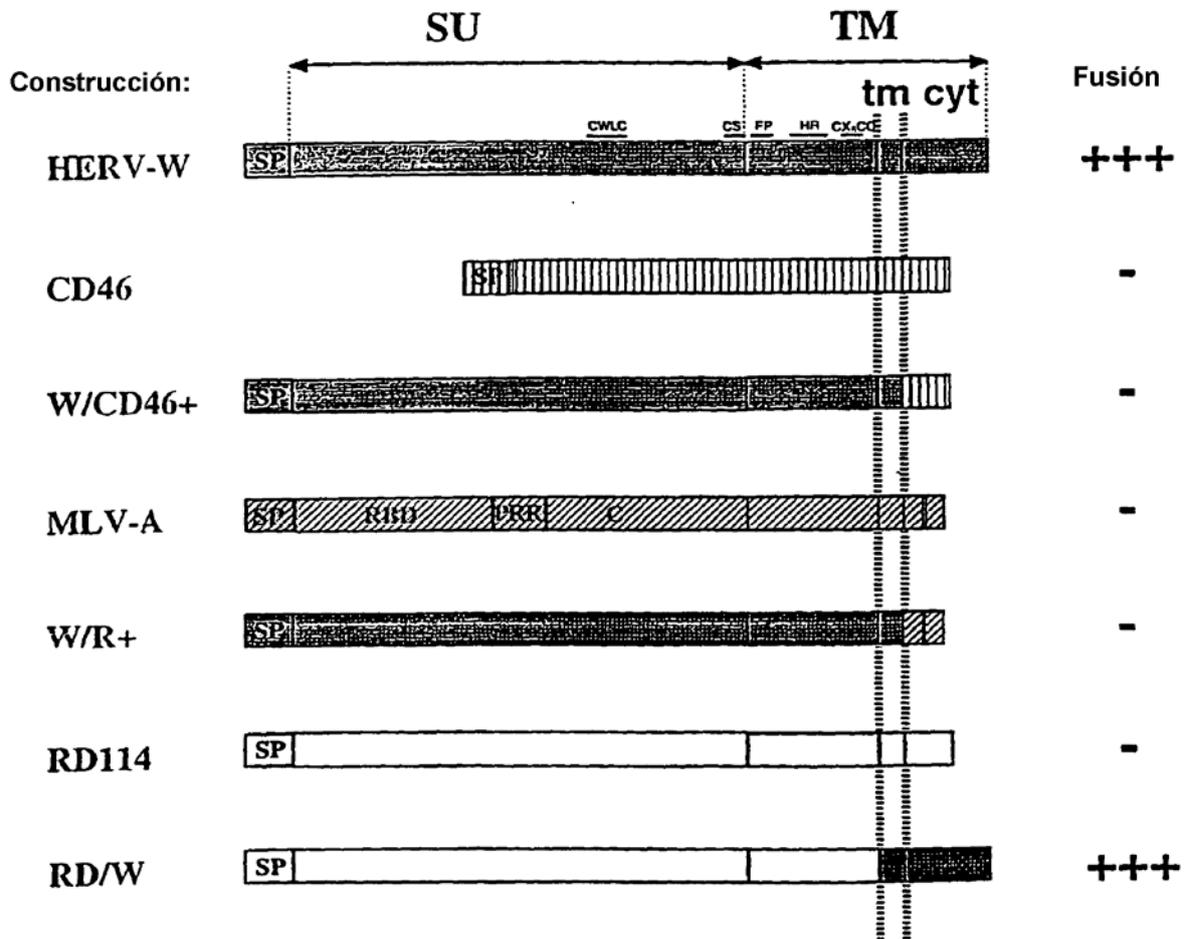


Figura XXX. Esquema y caracterización de Env HERV-W quiméricos.