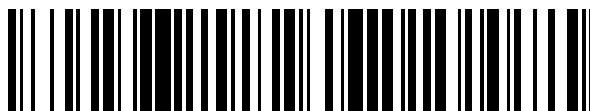


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 649**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2000 E 10183612 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2385058**

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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.02.2014

73 Titular/es:

BIO MERIEUX (50.0%)

Chemin de l'Orme

69280 Marcy l'Etoile, FR y

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

72 Inventor/es:

MALLET, FRANÇOIS;

COSSET, FRANÇOIS-LOÏC;

BLOND, JEAN-LUC;

LAVILLETTE, DIMITRI;

BOUTON, OLIVIER y

RUGGIERI, ALESSIA

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 444 649 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.

Los retrovirus son unos virus revestidos que llevan unas espículas glicoproteicas codificadas por los virus en su superficie. Estas glicoproteínas de cubierta son sintetizadas en forma de precursores poliproteicos (pre-env) que son después escindidos 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 hospedantes. Estas 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 hospedante. El receptor y la cubierta son unas moléculas multiméricas u oligoméricas. Para todos los virus revestidos, las interacciones de las glicoproteínas de cubierta con el o los receptores celulares conducen a reorganizaciones conformacionales de la cubierta necesarias a la exposición del péptido de fusión. La fusión tiene lugar en la superficie de la célula o en unas vesículas celulares según la vía de endocitosis del virión. Además, para permitir la entrada del virus, una fusión mediada por las proteínas de superficie virales puede, en algunas condiciones, provocar una fusión célula a célula con, como resultado, la formación de células multinucleadas gigantes o sincitios. La formación de sincitios se realiza por lo menos por dos vías: un virión puede simultáneamente fusionarse con dos células, se habla entonces de fusión "from without", o una célula infectada que expresa las glicoproteínas de cubierta a su superficie puede fusionarse con una célula adyacente (fusión "from within").

Los determinantes de la cubierta y la secuencia de los eventos que causan los cambios de conformación de la cubierta durante unos procesos de fusión "from without" son bien documentos 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 llevan del reconocimiento del receptor a la activación de la fusión no están aún elucidados. 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 de mama del ratón, el virus de la reticuloendoteliosis aviaria, VIH y SIV.

Por otra parte, Fefferey S. Jones y Rex Risser (Journal of Virology, Janv. 1993, p 67-74) han mostrado 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 sincitios en células de rata XC en ausencia de virión (fusión "from within").

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

Algunos autores han emitido la hipótesis que la cubierta retroviral endógena de ERV3, un retrovirus endógeno humano próximo de MLV (Moloney Leukemia Virus), podría estar implicado *in vivo* en la elaboración de la placenta a través 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 vivo*. 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 homocigoto en el 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, N° 4, páginas 3442-3445 (1998)), poniendo así en duda la hipótesis anteriormente emitida.

Los presentes inventores han puesto en evidencia ahora *in vitro* que la glicoproteína de cubierta de HER-W no modificada, expresada bajo la dependencia de un promotor, preferentemente un promotor heterólogo, posee unas propiedades fusógenas.

HERV-W es una familia de retrovirus endógenos humanos multi-copia recientemente descrita, denominada así debido a la homología entre el sitio de fijación del cebador de la transcripción y el de los retrovirus aviarios que utilizan el ARNt Trp. No se ha demostrado ninguna entidad competente para su replicación. Se ha verificado la funcionalidad de una región promotora y, entre diferentes tejidos humanos sanos ensayados, su expresión parece estar restringida a la placenta por transferencia Northern (J. L Blond *et al.*, Journal of Virology, Vol. 73, N° 2, páginas 1175-1185 (1999)). Un cuadro abierto de lectura único que codifica para una cubierta retroviral potencialmente funcional existe en el cromosoma 7. Un clon ADNc que corresponde aparentemente a un transcrito sub-genómico y que tiene la secuencia de la cubierta completa se ha aislado a partir de material placentario (clon cl.PH74, GenBank AF072506, cuya secuencia está identificada por SEC ID N° 2). Los estudios filogenéticos efectuados a nivel proteico indican que la proteína de cubierta es de tipo D. La secuencia SEC ID n° 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 está identificada por SEC ID n° 1.

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 a nivel de su TM posee un

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

Los experimentos realizados por los inventores muestran que Env HERV-W conlleva, por fusión de célula a célula, la formación de sincitios en diferentes líneas celulares ensayadas de origen humano y del simio. El fenómeno de fusión observado es dependiente del reconocimiento de receptor(es) específico(s), como se muestra de manera directa durante las transfecciones y de manera indirecta durante los co-cultivos de las células transfectadas con otros tipos celulares. Los presentes inventores han identificado por otra parte el receptor específico de Env HERV-W por un enfoque de competición que se basa en la propiedad de interferencia de las cubiertas retroviales, bloqueando unos receptores celulares por una proteína de cubierta diferente de Env HERV-W, impidiendo así la formación de sincitios. 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 Tailor C. S. *et al.* J. Virol., 1999, 73(5): 4470-4474).

Los inventores han realizado un procedimiento de detección de la expresión de una proteína o de un polipéptido de un retrovirus endógeno humano, según el cual la proteína o el polipéptido presenta una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia SEC ID n° 1, o un fragmento de SEC ID n° 1, o una secuencia que presenta, para cada serie de 20 aminoácidos, por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90% o también por lo menos 95% de identidad con la secuencia SEC ID n° 1 o con un fragmento de SEC ID n° 1, y según el cual se detecta el poder fusógeno de dicha proteína o dicho fragmento en unas células de un tejido celular o de un cultivo celular, mediante la demostración de la formación de sincitios.

También ha realizado 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 péptido presenta una secuencia polipeptídica que presenta, para cada serie de 20 aminoácidos, por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 90% o también por lo menos el 95% de identidad con la secuencia SEC ID n° 1, y según el cual se detecta el poder fusógeno de dicha proteína en unas células de un tejido celular, o de un cultivo celular por la demostración de la formación de sincitios.

Dicha proteína o dicho polipéptido presenta una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia SEC ID n° 1 o un fragmento de SEC ID n° 1, o una secuencia que presenta, para cada serie de 20 aminoácidos, por lo menos el 90%, preferentemente por lo menos el 90%, o también por lo menos el 95%, de identidad con la secuencia SEC ID n° 1 o con un fragmento de SEC ID n° 1.

Evidentemente, dicha proteína o dicho polipéptido, o dichos fragmentos, aunque no presenta una identidad completa con SEC ID n° 1 o sus fragmentos, debe poseer un poder fusógeno, preferentemente por lo menos igual o superior al de SEC ID n° 1 o sus fragmentos.

Si los fragmentos de la proteína o del polipéptido anterior presentan una identidad completa con los fragmentos de SEC ID n° 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 sustituciones, deleciones y adiciones susceptibles de ser aportadas a dicha secuencia polipeptídica para obtener una proteína, un polipéptido o un fragmento de éstos que poseen un poder fusógeno, en particular por lo menos igual o superior al de SEC ID n° 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, como se ilustra en la figura 4, después de la amplificación sobre 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 a L6321), que permite generar un conjunto de 10 fragmentos que se solapan de tamaño adecuado. El polimorfismo de uno de los sub-fragmentos puede también ser demostrado mediante técnicas de secuenciación, llegado el caso de cartografía de restricción, o más simplemente por una técnica de hibridación sándwich de tipo ELISA 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 ADN correspondientes representadas en la figura 2. Estas figuras representan la alineación de secuencias proteicas y nucleicas obtenidas por secuenciación de clones procedentes de tres individuos diferentes.

Por otra parte, se ha estudiado el polimorfismo del LTR que dirige la transcripción del gen *env* sobre el cromosoma 7. Se observan dos grupos de LTR 5' cuyas secuencias nucleicas obtenidas por secuenciación de dos clones que provienen de dos individuos diferentes están representadas y alineadas en la figura 3.

Una buena selección de cebadores ha permitido amplificar específicamente sobre el cromosoma 7, a partir de ADN humano total, un fragmento nucleico que contiene la totalidad de la información U3RU5-gag-pol-env-U3-RU5 con la ayuda de los cebadores U6198, L6186 o exclusivamente la secuencia env-U3RU5 con la ayuda de los cebadores U6189, L6186. Un enfoque de este tipo es posible utilizando por ejemplo un cebador que solapa la zona de unión entre la secuencia retroviral (U3 aguas arriba, U5 aguas abajo) y la secuencia flanqueante no retroviral contigua. Por ejemplo, el cebador L6186 solapa la región U5 3' terminal y la secuencia no retroviral aguas 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.

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

- está codificada por el gen *env* del retrovirus endógeno HERV-W;
- está codificada por un cuadro de lectura abierto situado en el cromosoma 7 del genoma humano;
- presenta una secuencia polipeptídica que comprende la secuencia SEC ID nº 1, o una secuencia que presenta para cada serie de 20 aminoácidos por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 90%, o también por lo menos el 95% de identidad con la SEC ID nº 1. Preferentemente, consiste en la 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 cada serie de 20 aminoácidos, por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 90%, o también por lo menos el 95% de identidad con 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 fusógena en un ensayo de fusión célula-célula.

Las células de dicho tejido o de dicho cultivo celular en las que se busca demostrar el poder fusógeno, se seleccionan ventajosamente de entre las células óseas, las células musculares, las células placentarias, las células endoteliales, en particular vasos sanguíneos, las células epiteliales, las células gliales y las células tumorales o procedentes de líneas celulares tumorales.

Como se ilustrará en los ejemplos siguientes, la detección del poder fusógeno de dicha proteína o de dicho polipéptido se puede realizar según por lo menos cualquiera de los dos protocolos siguientes.

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 sincitios o la ausencia de formación de sincitios.

Según un segundo protocolo, se obtiene un vector de expresión de dicha proteína o 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 sin tratar indicadoras que expresan en su superficie un receptor de dicha proteína en presencia de dichas células productoras; y se observa la formación de sincitios o la ausencia de formación de sincitios.

Se puede utilizar un gen o un ácido nucleico o un fragmento de gen o un ácido nucleico que codifica para una proteína o un polipéptido tal como se ha definido anteriormente en la descripción, en condiciones apropiadas que permiten su expresión, para preparar una composición terapéutica o profiláctica.

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

Otras aplicaciones son las 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 hospedante;
- una célula hospedante que comprende por lo menos un vector de expresión anterior, y
- una composición terapéutica o profiláctica que comprende por lo menos un vector de expresión o una célula hospedante anterior.

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

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

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

Así, un objeto de la invención es una utilización de un fragmento de ácido nucleico que codifica para la expresión de un péptido de una proteína de cubierta del retrovirus endógeno humano HERV-W, empezando dicho péptido en el aminoácido 448 y terminando en el aminoácido 538 de SEC ID n° 1, para preparar una composición de terapia génica, destinada al tratamiento de cánceres por destrucción de las células indicadoras cancerígenas que expresan el receptor hATB^o, por medio de la formación de sincitios.

Otro objeto de la invención es una utilización de un gen que codifica para la expresión de una proteína de cubierta del retrovirus humano Herv-W, comprendiendo dicha proteína, o consistiendo en, la SEC ID n° 1, para preparar una composición de terapia génica, destinada al tratamiento de cánceres por destrucción de las células indicadoras cancerígenas que expresan el receptor hATB^o, por medio de la formación de sincitios.

Hoy día, 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 hacen las células cancerígenas sensibles a un medicamento en unos sistemas gen/profármaco, tales como el sistema timidina quinasa del virus *Herpes Simplex/Glanciclovir* o el sistema citosina desaminasa/5FC.

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

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 se termina en el aminoácido 538 de SEC ID n° 1, o en una secuencia polipeptídica que presenta para cada serie de 20 aminoácidos por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 90%, o también por lo menos el 95%, de identidad con SEC ID n° 1, o un fragmento de SEC ID n° 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 antes a través de la formación de sincitios. Estos sincitios se forman a partir de célula(s) transfectada(s) por un proceso de fusión de célula a célula.

En un modo de realización con vistas a optimizar sus características terapéuticas, la proteína o el polipéptido anterior, o cualquier fragmento, está eventualmente fusionado con otras proteínas o fragmentos de proteínas, incluso si intrínsecamente responde 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 n° 1, puede ser fusionada a 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 sincitios a un pH próximo a la neutralidad o a pH neutro. Típicamente, el vector de expresión o plásmido será adaptado para permitir la expresión de la proteína, del polipéptido o fragmento que induce la formación de sincitios, de tal manera que cuando está expresado, la proteína, el polipéptido o el fragmento, pueda inducir la fusión de las células transfectadas con otras células humanas no transfectadas. Es deseable que la proteína o el polipéptido sean expresados independientemente de otros componentes víricos, salvo que éstos sean útiles para la vectorización.

Por eso, 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 anteriores, que induce la formación de sincitios por fusión de células transformadas o de células malignas dianas puede ser utilizado en el campo de la terapia de las enfermedades malignas, tales como los cánceres.

Un método de tratamiento de una enfermedad maligna en un paciente puede consistir en administrar al paciente el gen o un ácido nucleico, o un fragmento de gen o de un ácido nucleico, recombinante que codifica para una proteína o un polipéptido o un fragmento anteriores, que induce la formación de sincitios por fusión de células transformadas y de células malignas dianas.

El gen o el ácido nucleico, o el fragmento de gen o de ácido nucleico está introducido *in vitro* en unas células humanas apropiadas, tales como unas células de linajes continuos inmortalizadas, mediante unas técnicas estándares conocidas por el experto en la materia, tal como la transfección, la transducción o la transformación, y las células así transformadas son después introducidas en el paciente en el que pueden ejercer sus propiedades fusógenas.

El gen o el ácido nucleico, o el fragmento de gen o de ácido nucleico anteriores, pueden ser utilizados 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 anterior.

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

El gen o el ácido nucleico o sus fragmentos tales como se han definido anteriormente pueden ser por lo tanto utilizados para diferentes efectos terapéuticos o profilácticos, siendo el objetivo final o bien (i) destruir las células dianas por formación de sincitios que inducen una muerte celular de las células dianas por un proceso de muerte diferente de la muerte celular por apoptosis, o bien (ii) inducir o favorecer la formación de sincitios, 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 sincitios, estando dicha deficiencia asociada a una patología.

La proteína Env HERV-W o de un fragmento de Env HERV-W, tales como se han definido anteriormente, pueden ser utilizados 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.

Un vector de terapia génica puede comprender 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 cada serie de 20 aminoácidos, por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 90% o también por lo menos el 95% de identidad 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 de HERV-W tal como se ha definido anteriormente, o también en un vector sintético que tiene en su superficie la totalidad o parte de la proteína Env HERV-W tal como se ha definido anteriormente que le confiere las propiedades de reconocimiento celular y de fusión de la membrana plasmática.

Un vector de terapia génica puede comprender en su superficie el receptor de la proteína identificada en SEC ID nº 1, en particular para reconocer unas células que producen la proteína identificada en SEC ID nº 1 de manera constitutiva o inducida.

Las secuencias de ácidos nucleicos y/o oligonucleótidos de interés terapéutico (antisentido o que codifica para una proteína) permiten en particular reconocer las células en las que un gen está expresado.

Las secuencias de ácidos nucleicos o los oligonucleótidos antisentido son capaces de interferir específicamente con la síntesis de una proteína diana, por inhibición de la formación y/o del funcionamiento del polisoma, según el posicionamiento del antisentido 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 por una secuencia de ácido nucleico antisentido por un oligonucleótido antisentido tiene como objetivo evitar la formación del complejo de iniciación. Otros mecanismos en la inhibición por unos oligonucleótidos antisentido implican una activación de la ribonucleasa H que digiere los híbridos oligonucleótido antisentido/ARNm o una interferencia a nivel de sitios de empalme por unos oligonucleótidos antisentido cuya diana es un sitio de empalme del ARNm. Los oligonucleótidos antisentido son asimismo complementarios de secuencias ADN y pueden por lo tanto interferir a nivel de la transcripción por formación de una triple hélice, emparejándose dicho oligonucleótido antisentido por unos enlaces hidrógeno denominados de Hoogsteen a nivel de la gran hendidura de la doble hélice de ADN. En este caso particular, se habla más precisamente de oligonucleótidos antígenos. Evidentemente, se entiende que las secuencias de ácidos nucleicos u oligonucleótidos antisentido pueden ser estrictamente complementarios de la diana ADN o ARN a la que se deben hibridar, pero también no estrictamente complementarios con la condición de que se hibriden a la diana.

Asimismo, puede tratarse de oligonucleótidos antisentido no modificados o modificados a nivel de las uniones internucleotídicas. Todas estas nociones pertenecen a los conocimientos generales del experto en la técnica.

Una composición terapéutica puede comprender, 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 antisentido 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 refiere 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, ubiquitario 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 viruela. Además, es posible 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 tales secuencias promotoras.

En otro modo de realización, se puede utilizar 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 fusógenas de la proteína o de sus fragmentos que permiten la fusión de la célula vector con una célula hospedante deficitaria para uno o más genes determinados, que permite así compensar el o los genes deficitarios (por ejemplo: distrofina).

Las propiedades o poder fusógeno de la proteína o del polipéptido anteriores, o de sus fragmentos, se utilizan asimismo en un procedimiento para ensayar la eficacia y seleccionar profármacos o sustancias medicamentosas o sistemas gen/profármaco susceptibles de interactuar cualitativamente y/o cuantitativamente sobre su poder fusógeno por puesta en contacto de dicho profármaco 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 sincitios, entendiéndose que la formación de sincitios en el estado natural está asociada a un estado patológico. A título de ejemplo, se pueden citar los fenómenos hemorrágicos, la destrucción o la alteración de las células neuronales, la destrucción o la alteración exacerbada de los osteoblastos.

Otra aplicación es un procedimiento para la selección de profármacos o sustancias medicamentosas o de sistema gen/profármaco susceptibles de intervenir cualitativamente y/o cuantitativamente sobre el poder fusógeno 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 profármaco 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 sincitios.

Otra utilización de por lo menos una secuencia de ácido nucleico o de por lo menos un oligonucleótido antisentido responde a los criterios definidos anteriormente y es 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 antisentido tiene como objetivo obtener *in vivo* una regresión o una desaparición de sincitios asociado a un estado patológico.

Con el objetivo de obtener *in vivo* una regresión de la formación de sincitios o una desaparición de sincitios asociados a un estado patológico, se prepara una composición terapéutica que comprende, entre otros, un ligando susceptible de reconocer el receptor identificado anteriormente y desactivar o inhibir el proceso de formación de sincitios, 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.

Así, por ligando se entiende cualquier molécula capaz de reconocer dicho receptor y/o inhibir su función. Puede tratarse, entre otros, de un anticuerpo monoclonal o de un anticuerpo policlonal o de un fragmento de anticuerpo monoclonal o de anticuerpo policlonal. Puede tratarse 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 unión y fijación al receptor.

La producción de anticuerpos policlonales y monoclonales pertenece a los conocimientos generales del experto en la materia. Se puede citar a título de referencia Köhler G. y Milstein C. (1975): Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256: 495-497 y Galfre G. *et al.* (1977) *Nature*, 266: 522-550 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, p. 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 de Freund. Los sueros y 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 de transferencia Western. Los hibridomas monoclonales pueden asimismo ser producidos *in vitro* por cultivo celular de hibridomas producidos o por recuperación de líquido ascítico, después de la inyección intraperitoneal de los hibridomas en el ratón. Sea cual sea el modo de producción, en sobrenadante o en ascitis, los anticuerpos son después purificados. 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 cribados en unos ensayos funcionales para identificar los anticuerpos más productivos. La producción *in vitro* de anticuerpos, de fragmentos de anticuerpos o de derivados de anticuerpos, tales como unos anticuerpos quiméricos producidos por ingeniería genética es bien conocida por el experto en la materia.

Más particularmente, por fragmento de anticuerpo 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).

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

Por células diana o células diana de un tejido, tales como se han definido anteriormente, se entiende (i) o bien unas células a nivel de las cuales se quiere intervenir para prevenir o inhibir la formación de sincitios, (ii) o bien unas células diferentes pero que son susceptibles de expresar el ligando y por lo tanto inhibir y/o bloquear la actividad funcional del receptor.

Por elemento que asegura la expresión *in vivo* de dicho gen, se refiere 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, ubiquitario o específico de tejido o también un promotor sintético. Unos ejemplos de dichos promotores han sido descritos anteriormente.

Por anticuerpo transmembranario, se entiende un anticuerpo del cual por lo menos la región funcional capaz de reconocer y fijarse al receptor está expresada 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 definen la región funcional y una secuencia de aminoácidos que definen un polipéptido transmembranario que permite el anclaje dentro de la bicapa lipídica membranaria de células dianas o en la superficie externa de esta bicapa lipídica. Unas secuencias nucleicas que codifican para tales anticuerpos transmembranarios están descritas en la bibliografía.

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 escisión enzimática, o (ii) un gen o ácido nucleico o sus fragmentos obtenidos por síntesis química con la ayuda de sintetizadores automáticos, tales como los sintetizadores comercializados por la compañía Applied Biosystems.

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

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.

- 5 El poder fusógeno de la proteína Env HERV-W puede también 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:

10 Linajes celulares:

El linaje TELCeB6 (Cosset *et al.*, Journal of Virology, 69 (12): 7430-7436 (1995)) deriva del linaje 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). El linaje TELac2 deriva inicialmente de las células humanas de rhabdomyosarcoma TE671 (ATCC CRL 8805) y expresan el vector retroviral reportador nlsLacZ (Takeuchi *et al.*, Journal of Virology, 68 (12): 8001-8007 (1994)). La producción de partículas retrovíricas infecciosas por las células TELCeB6 depende de los vectores de expresión de cubierta transfectados.

20 Estas células son cultivadas en medio DMEM (Dulbecco modified Eagle medium - Life Technologies) con el 10% de suero de ternera fetal (Life Technologies). De manera general, este medio se ha utilizado para todos los otros 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).

25 Construcción de los vectores de expresión de cubierta:

El plásmido pHCMV se utilizó para la expresión de *env* HERV-W. El plásmido FBASALF-ARless se utilizó en calidad de control positivo de fusión; produce una forma muy 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)). *Env* HERV-W clonado en antisentido en el plásmido pHCMV se utilizó como control negativo.

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

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

45 Para los experimentos de co-cultivo, las células transfectadas son desenganchadas del soporte, contadas y re-inoculadas a concentración igual (3×10^5 células/pocillo) en placas de 6 pocillos. Unas células frescas indicadoras se añaden entonces a las células transfectadas a razón de 10^6 células por pocillo y el co-cultivo continúa durante 24h. Se puede efectuar entonces una coloración XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido para colorear el núcleo de las células TELCeB6 (Cosset *et al.*, Journal of Virology, 69 (10): 6314-6322 (1995)). Está seguida de una coloración por soluciones de May-Grünwald y Giemsa (MERCK) efectuada según las recomendaciones del fabricante.

50 La mayoría de los sincitios se puede observar 18 a 24 horas después del principio de la transfección; el despegado 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 a célula, a partir de una célula que expresa la cubierta, por oposición a una fusión "from without" que corresponde a una formación de sincitios consecutiva a una fusión virión-célula(s).

55 La tabla I siguiente reúne los resultados obtenidos que se refieren a la capacidad de fusión de célula a célula de Env HERV-W por transfección directa, comparada a la de la cubierta control ARless. Las células TELCeB6 y TE671 corresponden a unos linajes de origen humano. Las células COS son unas células de riñón de simio verde. Las células XC son unas células de rata.

60

Tabla I

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

^a El índice de fusión corresponde al porcentaje $(N-S)/T$, en el que N es el número de núcleos en sincitios, S es el número de sincitios y T es el número total de núcleos contados. Inn. significa innumerable, organizados en "red".

La tabla I 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 de simios. Env HERV-W no induce la formación de sincitios sobre células de rata.

La tabla II siguiente reúne los datos observados en 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 están indicados. La formación de sincitios está indicada por las menciones sí/no.

Tabla II

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

La tabla II detalla los resultados de los experimentos de co-cultivo en función de los linajes celulares ensayados. Se observan unos sincitios en células humanas de rabdomiosarcoma (TE671), de carcinoma epidermoide (A431) y de carcinoma epiteloide (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 células de cerdo puede plantear unos problemas en el ámbito del trasplante de órganos (xenotrasplante).

Ejemplo 2:

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

Con el fin de estudiar el polimorfismo de la región que codifica para la cubierta y 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 (LTR5') situada aguas arriba, exclusivamente sobre el cromosoma 7. Se utiliza para ello un cebador U6198 que se hibrida sobre una secuencia específica situada aguas arriba de la LTR 5' sobre el cromosoma 7, y un cebador L6186 que se hibrida de manera solapante sobre la región U5 del LTR 3' y el gen celular adyacente, en 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), 25 x (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), 1U de ADN polimerasa así como 200 ng de matriz (ADN genómico) en un volumen final de 50 ml.

A partir de este producto PCR de 10 kb diluido, se efectúan una PCR anidada "env" así como una PCR anidada "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 U6189 y L6186, siendo el cebador U6189 el utilizado para la LD-PCR, estando el cebador U6189 situado aguas arriba del ATG de *env*. La región U3 de LTR 5' está amplificada por el par de cebadores U6460 y L5643. El cebador U6460 se hibrida aguas arriba de LTR 5' mientras que el cebador L5643 se hibrida en el dominio R de LTR 5'. Las PCR anidadas se realizan 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, 0,25 mM de cada dNTP, 330 nM de cada cebador, 1,25 U de ADN polimerasa, un alícuota del producto de amplificación de 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

antisentido impares: 6303 a 6321) permite la secuenciación de la región que codifica para la cubierta a partir del producto PCR anidada cubierta. Estos cebadores pueden también 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 están ilustradas en la figura 2. Estas secuencias muestran la existencia de un bajo porcentaje 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 cubierta del donante D10 presenta dos mutaciones con respecto a la secuencia del donante D6, en posición 671 (T671C) y 920 (G920A), que inducen 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 ha permitido observar un bajo porcentaje 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 cual corresponde a un porcentaje de polimorfismo del 0,19%. Dos mutaciones están situadas en la secuencia del ADN 10 (T671C y G920A) y una sobre 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 porcentaje de polimorfismo del 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 LTR5' asociada al gen de cubierta: la secuenciación del dominio U3 de LTR5' se realiza gracias a los 2 cebadores utilizados anteriormente para la PCR anidada LTR. A título de ejemplo, las secuencias de la región U3 de LTR5' (asociada al gen de cubierta) de dos donantes sanos (etiquetados D6 y D21) para los cuales la cubierta se ha secuenciado por otra parte, están ilustradas en la figura 3. Estas secuencias muestran la existencia de un porcentaje de polimorfismo más importante que para el gen de cubierta. Se señala 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 están ilustradas en la tabla III siguiente.

Tabla III

NOMBRE:	SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS:
	Cebadores PCR ancha
U6198: SEC ID nº 3	5'-CAA-AAC-GCC-TGG-AGA-TAC-AGC-AAT-TAT-C-3'
L6186: SEC ID nº 4	5'-GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Cebadores PCR anidada <i>env</i>
U6189: SEC ID nº 5	5'-CTG-AAA-ATC-CAG-GAG-ACA-ACG-CTA-GC-3'
L6186: SEC ID nº 6	5'-GCA-CCC-TCA-TGG-TTG-TGT-TAC-TTG-G-3'
	Cebadores PCR anidada LTR 5'
U6460: SEC ID nº 7	5'-TTG-GTA-CCC-AAA-ACG-CCT-GGA-GAT-ACA-GCA-ATT-ATC-3'
L5643: SEC ID nº 8	5'-AAC-TCG-AGT-GAA-ATA-GCA-TGA-AAA-CAG-AG-3'
	Cebadores SSCP y secuenciación <i>env</i> :
U6302: SEC ID nº 9	5' AGG-AAA-GTA-ACT-AAA-ATC-ATA-AAT-C-3'
L6303: SEC ID nº 10	5'-GGT-TCC-CTT-AGA-AAG-ACT-CC-3'
U6304: SEC ID nº 11	5'-AAT-ATT-GAT-GTC-CCA-TCG-TAT-A-3'
L6305: SEC ID nº 12	5'-CCA-GTT-TGG-GTG-AAG-TAA-GTC-3'
U6306: SEC ID nº 13	5'-GGA-GGA-CTT-GGA-GTC-ACT-GTC-3'
L6307: SEC ID nº 14	5'-AGG-CGA-GTA-TGG-GTA-CGG-AG-3'
U6308: SEC ID nº 15	5'-GGA-CTA-GAT-CTC-TCA-AAA-CTA-CA-3'
L6309: SEC ID nº 16	5'-ACG-GAA-GTG-GTG-TTT-ATT-TCT-G-3'
U6310: SEC ID nº 17	5'-CCT-GAA-CAA-TGG-AAC-AAC-TTC-3'
L6311: SEC ID nº 18	5'-ATT-CCT-GAG-GGT-AGG-C AG-AC-3'
U6312: SEC ID nº 19	5'-GGT-AAC-TCC-TCC-CAC-ACA-AA-3'
L6313: SEC ID nº 20	5'-GAA-TGG-GTA-CTC-TTT-TGT-TGC-3'
U6314: SEC ID nº 21	5'-TAC-AGT-TAT-GTC-ATA-TCT-AAG-CC-3'
L6315: SEC ID nº 22	5'-T AA-GTT-GAT-CTT-GC A-AGG-TGA-C-3'
U6316: SEC ID nº 23	5'-CTA-AAT-GGG-GAC-ATG-GAA-CG-3'
L6317: SEC ID nº 24	5'-TAT-TCG-ATC-TGG-AAT-TTC-TTC-AAC-3'
U6318: SEC ID nº 25	5'-CAA-TCC-GGA-ATC-GTC-ACT-GA-3'
L6319: SEC ID nº 26	5'-AGA-CAA-AGT-TAA-CAA-GGA-GGT-TC-3'
U6320: SEC ID nº 27	5'-ACT-CCT-CTT-TGG-ACC-CTG-TAT-C-3'
L6321: SEC ID nº 28	5'-GAG-GTT-GGC-CGA-CCA-CCG-3'

U se refiere a cebadores sentido y L se refiere a cebadores antisentido.

Ejemplo 3:

Con el fin de determinar el receptor reconocido por la glicoproteína de cubierta de HERV-W entre los receptores conocidos como que se expresan en las células humanas, es decir PiT-2 (receptor de MLV anfotrópicos), PiT-1 (receptor de GALV -gibbon ape leukemia virus, y FeLV-B -feline leukemia virus type B) y hATB^o (receptor de los retrovirus mamíferos de tipo D reconocido asimismo por el retrovirus RD114), se han realizado unos ensayos de interferencia. Para ello, se han transfectado unas células TELCeB6, o bien con el plásmido de expresión que codifica para la cubierta HERV-W, o bien con el plásmido de expresión que expresa el ARN mensajero antisentido del gen que codifica para una variante hiperfusogénica de cubierta MLV anfotrópica denominada ARless. Estas células, denominadas "células productoras" se co-cultivaron después con unas células humanas, denominadas "células indicadoras", que expresan el receptor de la cubierta HERV-W, y que expresan además, de manera estable, o bien la cubierta de GALV, o bien la cubierta de MLV anfotrópica, o bien la cubierta de RD114. La expresión de estas diversas glicoproteínas de cubierta sobre estas células es capaz de reconocer los receptores correspondientes, bloquearlos y por lo tanto disminuir su capacidad para 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 sincitios para un tipo celular indicador que bloquea uno de estos receptores por comparación con la célula indicadora parental para la cual el conjunto de los tres receptores potenciales es totalmente accesible, se deducirá la naturaleza del receptor reconocido por la cubierta expresada sobre la célula productora. Después de dos días de co-cultivo, las células se han fijado y teñido y los índices de fusión se han determinado. Los resultados están presentados en la tabla IV a continuación.

Tabla IV

Proteína de cubierta expresada en las células productoras.	Proteínas de cubierta expresadas en las células indicadoras.			
	Control	MLV-A	GALV	RD114
ARless	+	-	+	+
Antisentido HERV-W	-	-	-	-
HERV-W	+	+	+	-
- significa una ausencia de sincitios, y + significa la presencia de sincitios 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 hATB^o de los retrovirus 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 observan sincitios 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.

Ejemplo 4: Control de la actividad fusógena de HERV-W Env por su parte citoplásmica.

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

W/CD46+, derivada de CD46 humano, factor de protección de las células frente al complemento y no implicado en la formación de sincitios, 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 quimera no es fusogénica en un ensayo de fusión célula-célula (figura 5).

W/R+, derivado de la glicoproteína de cubierta del retrovirus MLV-A (amphotropic murine leukemia virus), no fusogénico cuando se expresa independientemente de las otras proteínas de MLV-A, 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 quimera no es fusogénica en un ensayo de fusión célula-célula (figura 5).

RD/W, derivado de la glicoproteína de cubierta del retrovirus endógeno felino RD114, no fusogénico cuando está expresado independientemente de las otras proteínas de RD114, 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 quimera es fusogénica en un ensayo de fusión célula-célula (figura 5).

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

El ectodominio de HERV-W Env 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. 73:1175-1185).

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).

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).

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).

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 SU.

Listado de secuencias

<110> BIO MERIEUX
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

<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

<130> Poder fusógeno de env de ERV-W

<140>
<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 538

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Pro Tyr His Ile Phe Leu Phe Thr Val Leu Leu Pro Ser
1 5 10 15

Phe Thr Leu Thr Ala Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met Thr Ser Ser Ser
20 25 30

Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Met Gln Arg Pro Gly Asn Ile Asp
35 40 45

Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Thr Pro Thr Phe Thr Ala
50 55 60

His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr His Ser Ala Thr Leu Cys Met
65 70 75 80

ES 2 444 649 T3

His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn Pro Ser Cys
85 90 95

Pro Gly Gly Leu Gly Val Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe Thr Gln Thr
100 105 110

Gly Met Ser Asp Gly Gly Gly Val Gln Asp Gln Ala Arg Glu Lys His
115 120 125

Val Lys Glu Val Ile Ser Gln Leu Thr Arg Val His Gly Thr Ser Ser
130 135 140

Pro Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Ser Lys Leu His Glu Thr Leu Arg Thr
145 150 155 160

His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr Gly Leu His
165 170 175

Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Ile Cys Leu Pro Leu
180 185 190

Asn Phe Arg Pro Tyr Val Ser Ile Pro Val Pro Glu Gln Trp Asn Asn
195 200 205

Phe Ser Thr Glu Ile Asn Thr Thr Ser Val Leu Val Gly Pro Leu Val
210 215 220

Ser Asn Leu Glu Ile Thr His Thr Ser Asn Leu Thr Cys Val Lys Phe
225 230 235 240

Ser Asn Thr Thr Tyr Thr Thr Asn Ser Gln Cys Ile Arg Trp Val Thr
245 250 255

Pro Pro Thr Gln Ile Val Cys Leu Pro Ser Gly Ile Phe Phe Val Cys
260 265 270

Gly Thr Ser Ala Tyr Arg Cys Leu Asn Gly Ser Ser Glu Ser Met Cys
275 280 285

ES 2 444 649 T3

Phe Leu Ser Phe Leu Val Pro Pro Met Thr Ile Tyr Thr Glu Gln Asp
290 295 300

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

<210> 2

<211> 2781

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgggagctg ttttcatgct atttactctt attaaatctt gcaactgcac ttttctggtc 60
catgtttctt acggctcgag ctgagctttt gctcaccgtc caccactgct gtttgccacc 120
accgcagacc tgccgctgac tcccatccct ctggatcctg caggggtgtcc gctgtgctcc 180
tgatccagcg aggcgcccct tgccgctccc aattgggcta aaggcttgcc attgttctg 240
cacggctaag tgctgggtt tgttctaatt gagctgaaca ctagtactg ggttccatgg 300
ttctcttctg tgaccacgct cttctaatag aactataaca cttaccacat ggcccaagat 360
tccattcctt ggaatccgtg aggccaaaga ctccaggta gagaatacga ggcttgccac 420
catcttgga ggcgctgct accatcttgg aagtgttca ccaccatctt gggagctctg 480
tgagcaagga cccccggtg acatttttgc aaccacgaac ggacatcaa agtgatacat 540
cctgggaagg accctaccca gtcattttat ctaccccaac tgccgttaaa gtggctggag 600
tggagtcttg gatacatcac acttgagtca aatcctggat actgccaaag gaacctgaaa 660
atccaggaga caacgctagc ttttctgtg aacctctaga ggatttgcgc ctgctcttca 720
aacaacaacc agggaggaaag taactaaaat cataaatccc catggccctc cttatcata 780
tttttctctt tactgttctt ttaccctctt tcaactctac tgcacccctt ccatgcgct 840
gtatgaccag tagctccctt taccaagagt ttctatggag aatgcagcgt cccggaaata 900
ttgatgcccc atcgatatag agtctttcta agggaacccc caccctcact gccacaccc 960
atatgccccg caactgctat cactctgcca ctctttgcat gcatgcaaat actcattatt 1020
ggacaggaaa aatgattaat cctagtgtg ctggaggact tggagtact gtctgttga 1080
cttacttca ccaactggt atgtctgatg ggggtggagt tcaagatcag gcaagagaaa 1140
aacatgtaaa agaagtaatc tcccaactca cccgggtaca tggcacctct agccctaca 1200
aaggactaga tctctcaaaa ctacatgaaa ccctccgtac ccatactgc ctggttaagc 1260
tatttaatac caccctcact gggctccatg aggtctcggc ccaaaacct actaactgtt 1320

ggatatgcct cccctgaac ttcaggccat atgtttcaat cctgtacct gaacaatga 1380
acaacttcag cacagaaata aacaccactt ccgttttagt aggacctctt gtttocaatc 1440
tggaaataac ccatacctca aacctcact gtgtaaaatt tagcaatact acatacaca 1500
ccaactcccc atgcatcagg tgggtaactc ctcccacaca aatagtctgc ctaccctcag 1560
gaatatTTTT tgtctgtggt acctcagcct atcgttgttt gaatggctct tcagaatcta 1620
tgtgcttctc ctattctta gtgcccccta tgaccatcta cactgaacaa gatttataca 1680
gttatgtcat atctaagccc cgcaacaaaa gactacccat tcttctttt gttataggag 1740
cgggagtgtc aggtgcaacta ggtactggca ttggcggtat cacaacctct actcagttct 1800
actacaaact atctcaagaa ctaaatggg acatggaacg ggtcgccgac tccctggta 1860
ccttgcaaga tcagcttaac tccctagcag cagtagtcct tcaaaatcga agagctttag 1920
acttgctaac cgctgaaaga gggggaacct gtttatTTTT aggggaagaa tgctgttatt 1980
atgttaatca atccggaatc gtcactgaga aagttaaaga aattcgagat cgaatacaac 2040
gtagagcaga ggagcttcca aacactggac cctggggcct cctcagccaa tggatgccct 2100
ggattctccc ctctcttagga cctctagcag ctataatatt gctactctc tttggaccct 2160
gtatctttaa cctcctgtt aactttgtct cttccagaat cgaagctgta aaactacaaa 2220
tggagcccaa gatgcagtcc aagactaaga tctaccgag acccctggac cggcctgcta 2280
gcccacgac tgatgttaat gacatcaaag gacccctcc tgaggaaatc tcagctgcac 2340
aacctctact acgcccctaat tcagcaggaa gcagttagag cggtcgtcgg ccaacctccc 2400
caacagcact taggttttcc tggtgagatg ggggactgag agacaggact agctggattt 2460
cctaggctga ctaagaatcc ctaagcctag ctgggaaggt gaccacatcc acctttaaac 2520
acggggcttg caacttagct cacacctgac caatcagaga gctcactaaa atgctaatta 2580
ggcaaagaca ggaggtaaag aaatagccaa tcatctattg cctgagagca cagcaggagg 2640
gacaatgac ggatataaaa ccaagtctt cgagccggca acggcaaccc ctttgggtc 2700
ccctcccttt gtatgggagc tctgttttca tgctatttca ctctattaaa tcttgcaact 2760
gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2781

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un fragmento de ácido nucleico que codifica para la expresión de un péptido de una proteína de cubierta del retrovirus endógeno humano HERV-W, empezando dicho péptido en el aminoácido 448 y terminando en el aminoácido 538 de SEC ID n° 1, para preparar una composición de terapia génica, destinada al tratamiento de cánceres por destrucción de las células indicadoras cancerígenas que expresan el receptor hATB^o, por medio de la formación de sincitios.
- 10 2. Utilización de un gen que codifica para la expresión de una proteína de cubierta del retrovirus endógeno humano HERV-W, comprendiendo dicha proteína, o consistiendo en, la SEC ID n° 1, para preparar una composición de terapia génica, destinada al tratamiento de cánceres por destrucción de las células indicadoras cancerígenas que expresan el receptor hATB^o, por medio de la formación de sincitios.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la composición comprende un promotor heterólogo o autólogo, preferentemente heterólogo, para la expresión de dicho péptido o de dicha proteína.
- 20 4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la composición comprende un vector de terapia génica que comprende dicho péptido o dicha proteína.
- 25 5. Utilización según la reivindicación 4, caracterizada porque el vector se selecciona de entre un vector retroviral de tipo MLV, un vector lentiviral pseudotipados por dicha proteína, un vector sintético.
6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque las células cancerígenas son destruidas por formación de sincitios entre unas células transformadas por dicho vector y dichas células cancerígenas.
7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque las células cancerígenas son transformadas por dicho vector.

Figura 1

Consensus	NALPHHIFLF TULLPSTLT APPPCOMTS SSVYDFUAR MOPCHIDAP STRLSRGTP TPTATHMFA NCHNSATLCH HANHTWTK KINPSCGEL	100
P ENV ADN 10		100
P ENV ADN 21		100
P ENV ADN 6		100
Consensus	GVTTCWTFT OTCHSDGGV QDQREUAK EVISQURVK GRSSPHGLD LSKHETLAT HTLWLSQFNT TLTGLHNSA QUTNCHNL FANRPYVSI	200
P ENV ADN 10		200
P ENV ADN 21	A.....	200
P ENV ADN 6		200
Consensus	PVEQAMPS TEIMTSVLV GFLSRLEIT HTSLKCVK SYTTTNSQ CINATPTQ INCUPSGIF VCHSAVCL NGSSSACFL SFUTPTIY	300
P ENV ADN 10	A.....	300
P ENV ADN 21		300
P ENV ADN 6		300
Consensus	TEQDLYSVI SKPMKVPI LPTVICAGVL GALTGICGI TTSTPTYL SGLKGMER VADSJTLQD QASLAAVL QNRALDILT AERGCTCLFL	400
P ENV ADN 10	N.....	400
P ENV ADN 21		400
P ENV ADN 6		400
Consensus	GZECCYYNQ SVITETVKE IUDRIQRAB ELANTQNGI LSQPMILP FLGFLAAIL LLLFQPCFN LAMFVSSI EAVLQMEK MOKTKIYER	500
P ENV ADN 10		500
P ENV ADN 21		500
P ENV ADN 6		500
Consensus	PLRPAFPRS DANDINGTPP ERLSQAQPLL RNSVACS	538
P ENV ADN 10		538
P ENV ADN 21		538
P ENV ADN 6		538

Figura 2

Consensus	120
Env AIN 6	120
Env AIN 10	120
Env AIN 21	120
Consensus	240
Env AIN 6	240
Env AIN 10	240
Env AIN 21	240
Consensus	360
Env AIN 6	360
Env AIN 10	360
Env AIN 21	360
Consensus	480
Env AIN 6	480
Env AIN 10	480
Env AIN 21	480
Consensus	600
Env AIN 6	600
Env AIN 10	600
Env AIN 21	600
Consensus	720
Env AIN 6	720
Env AIN 10	720
Env AIN 21	720
Consensus	840
Env AIN 6	840
Env AIN 10	840
Env AIN 21	840
Consensus	960
Env AIN 6	960
Env AIN 10	960
Env AIN 21	960
Consensus	1080
Env AIN 6	1080
Env AIN 10	1080
Env AIN 21	1080
Consensus	1200
Env AIN 6	1200
Env AIN 10	1200
Env AIN 21	1200
Consensus	1320
Env AIN 6	1320
Env AIN 10	1320
Env AIN 21	1320

Figura 2 (continuación)

Consensus	CTCAGCCAAAT GATCTCTGCG TCTCTTACGAC CTCCTAGCGCC TATATATATG CTCATCTCTCT CTCCTCTTATC ACTTCTCTCTC TTTCCAGAAATC	1440
Env AIN 6		1440
Env AIN 10		1440
Env AIN 21		1440
Consensus	GAACTCTGAA AACCTGCAAT GCGAGCCGAG ATGCTCTTGA AACATTAAT CTCACCGGGA CCGCTGAGAC GCGCTCTGAG CCGAGAGCT GATCTTATATC AACATCAAGG CAGCTCTCTCT	1560
Env AIN 6		1560
Env AIN 10		1560
Env AIN 21		1560
Consensus	GAGGAAATCT CAGCTCTGCA ACTCTCTACTA CCGCCCAAT CAGCGAGAG CAGTATG	1617
Env AIN 6		1617
Env AIN 10		1617
Env AIN 21		1617

Figura 3

Consensus	100
LTR6 c1A	100
LTR21 c1S	100
Consensus	200
LTR6 c1A	200
LTR21 c1S	200
Consensus	246
LTR6 c1A	246
LTR21 c1S	246

Figura 4

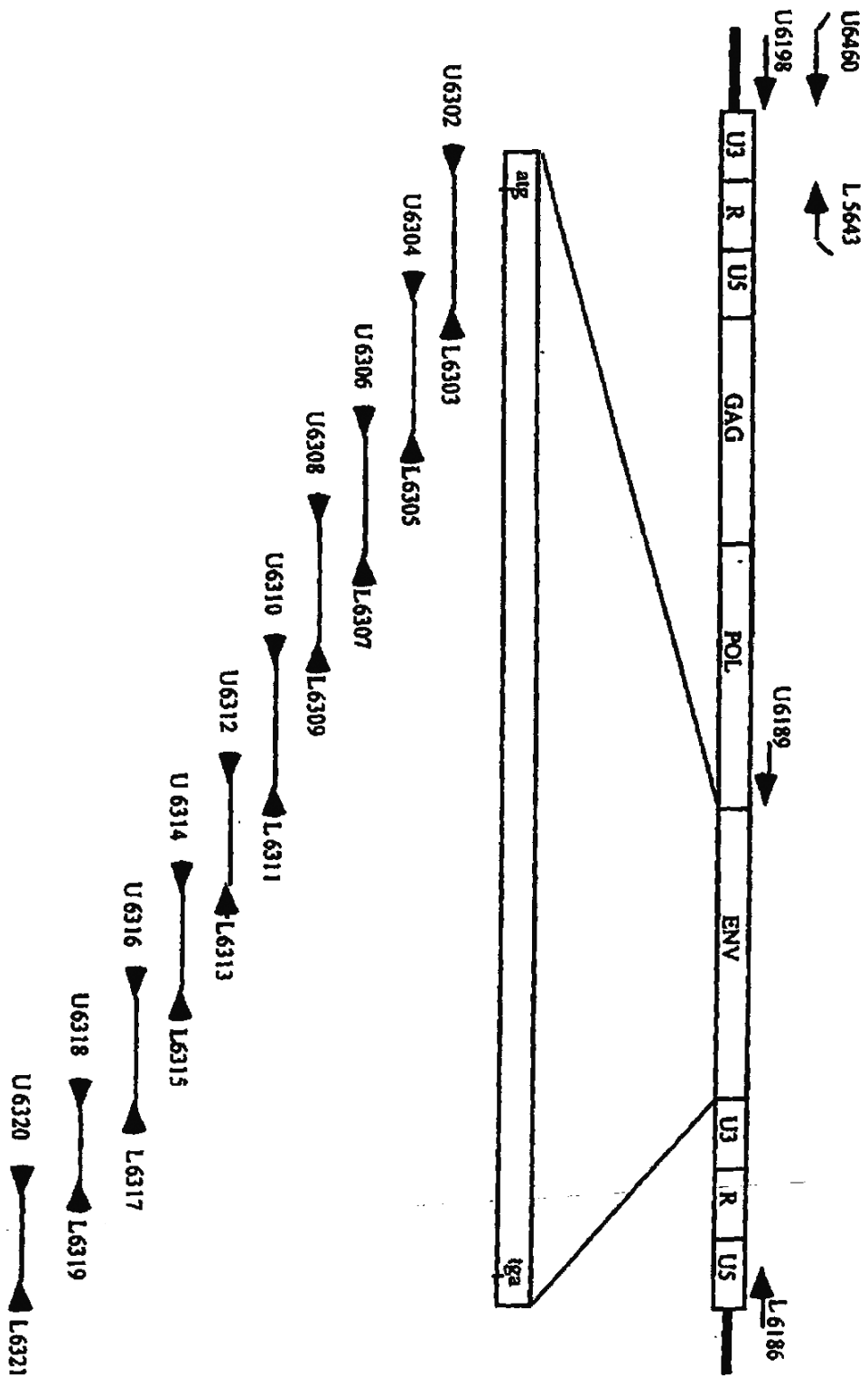


Figura 5

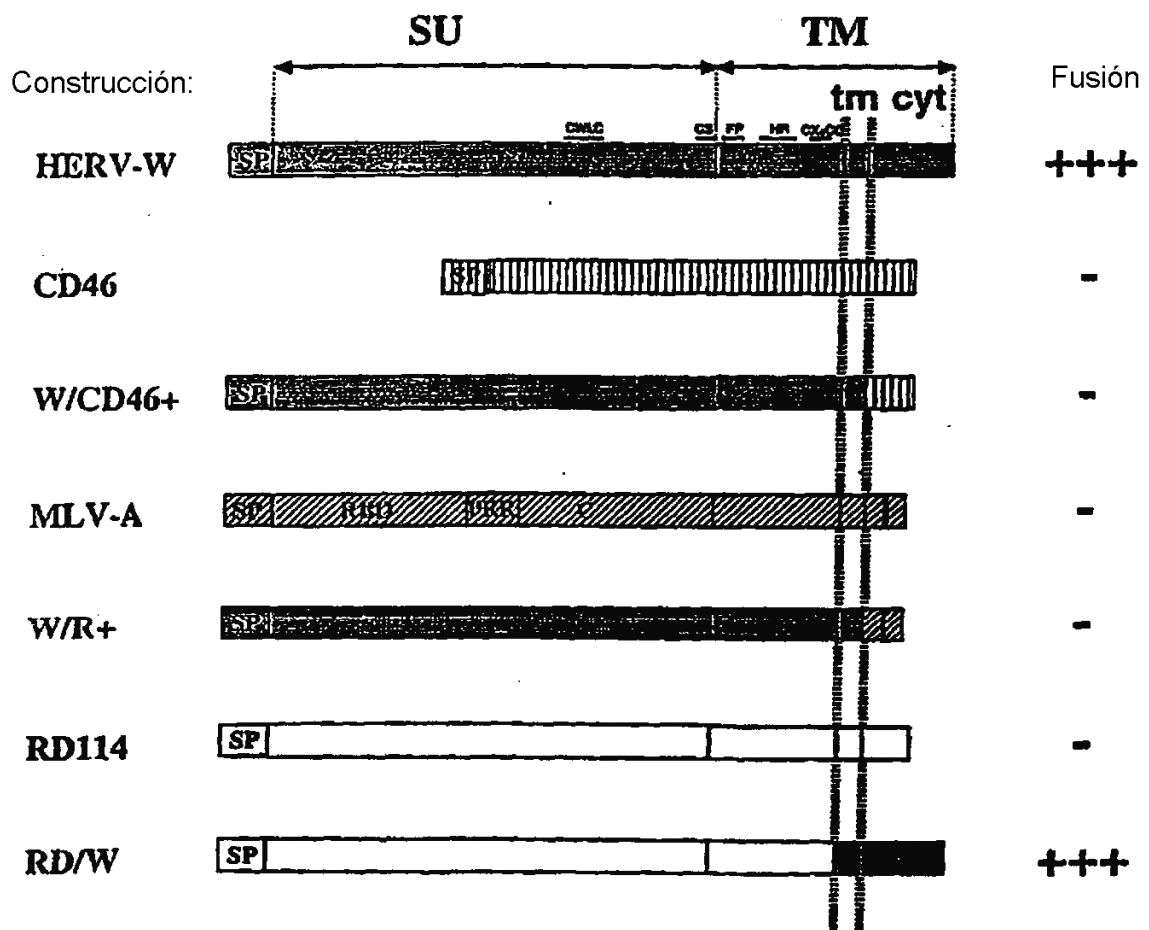


Figura XXX. Esquema y caracterización de Env HERV-W quiméricas.