

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 961**

51 Int. Cl.:

C07K 14/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2007 PCT/FR2007/000236**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2007 WO07090967**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 07730950 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 1981904**

54 Título: **Dominio peptídico necesario para la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor hASCT**

30 Prioridad:

09.02.2006 FR 0650468

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

18.10.2017

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX S.A. (100.0%)
CHEMIN DE L'ORME, 6
69280 MARCY L'ETOILE, FR**

72 Inventor/es:

**MALLET, FRANÇOIS;
ORIOU, GUY y
CHEYNET, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 637 961 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

Dominio peptídico necesario para la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor hASCT.

La presente invención se refiere a un dominio polipeptídico responsable de las interacciones entre una envoltura retroviral del grupo de interferencia de HERV-W y los receptores de la familia hASCT.

Los retrovirus endógenos humanos (HERV) constituyen el 8% del genoma humano y están implicados al mismo tiempo en patologías y en fenómenos no patológicos.

La familia de los retrovirus endógenos humanos W (HERV-W) deriva de un elemento retroviral infeccioso integrado en la línea germinal hace 25 a 40 millones de años. La proteína de envoltura de HERV-W, también denominada sincitina, es una glicoproteína fusogénica implicada en la formación de la capa sincitiotrofoblástica de la placenta. Está codificada por el gen env del locus proviral ERCW1 y sintetizada en forma de un precursor gPr73 que está específicamente escindido en dos proteínas maduras, una sub-unidad de superficie gp50 (SU) y una sub-unidad transmembranaria gp24TM.

In vitro, la sincitina de la familia HERV-W induce una fusión célula a célula dependiente de su interacción con un receptor-transportador de aminoácidos de la familia ASCT (h-ASCT2, hASCT1). Unos estudios filogénicos han mostrado entonces que la sincitina está emparentada con un grupo de retrovirus, que comprende en particular el virus endógeno del gato RD114, el virus endógeno del mono BaEV, unos retrovirus de simios y unos retrovirus aviares: virus de la reticuloendoteliosa aviaria REV-A y virus de la necrosis del bazo SNV, que tienen todos en común el receptor-transportador de aminoácidos neutros sodio dependiente de tipo 2 o hASCT2 (Rasko *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, p. 2129-2134; Tailor *et al.*, 1999 JOURNAL OF VIROLOGY, VOL 73(5) mayo de 1999, p. 4470-4474). Así, la infección de células por unos virus de este grupo de retrovirus conduce a una reducción específica del transporte de los aminoácidos (Rasko *et al.*, 1999). La infección de una célula por uno de estos retrovirus (o la expresión en la célula de una de estas envolturas) impide, por interferencia (interacción) frente a un receptor de la familia ASCT, la infección de esta misma célula por otra de estos retrovirus o la fusión con otra célula que expresa otra envoltura. Por interferencia frente a un receptor de la familia ASCT, la infección de una célula por uno de estos retrovirus impide la infección por otro de estos retrovirus. Todos estos retrovirus pertenecen al mismo grupo de interferencia del virus HERV-W.

Los mecanismos de enlaces entre la envoltura y el receptor ASCT quedan oscuros, y en la actualidad no se ha identificado ni definido ningún dominio de unión a un receptor ASCT, ya sea en la SU de la proteína de envoltura de HERV-W o en las SU de retrovirus del mismo grupo de interferencia. Esta temática es no obstante esencial ya que la inhibición de la interacción envoltura/receptor ASCT permitiría además impedir la entrada de un retrovirus en la célula, y por lo tanto bloquear su ciclo de replicación, bloquear el fenómeno de interacción envoltura/receptor ASCT y/o de fusión celular que puede estar implicado en la formación de tumores, en la proliferación de células metastásicas o en unos fenómenos de resistencia a medicamentos (véase a título ilustrativo la publicación "Cell fusion: A hidden enemy?", Cancer Cell: mayo de 2003 Vol. 3), bloquear el fenómeno de interacción envoltura/receptor ASCT y/o de fusión celular que puede intervenir en enfermedades del sistema nervioso, incluso inhibir la fusión célula-célula implicada en la diferenciación trofoblástica (vacunación contraceptiva). Además, la inhibición de la interacción envoltura/receptor hASCT podría impedir la propagación de tumor oponiéndose a una inmunosupresión local que puede resultar de la interacción envoltura/receptor hASCT. En efecto, se ha demostrado por un lado que la infección de células por unos virus de este grupo de retrovirus (en particular los que inducen unas inmunodeficiencias) conduce a una reducción específica del transporte de los aminoácidos (Rasko *et al.*, PNAS, Vol. 96, p. 2129-2134 (1999)), y por otro lado se propone una relación directa entre la alteración del transporte de los aminoácidos y la inmunosupresión (Espinosa A, Villarreal LP., T-Ag inhibits implantation by EC cell derived embryoid bodies. Virus Genes. 2000;20(3):195-200; JE, Battini JL, Gottschalk RJ, Mazo I, Miller AD., The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. Proc Natl Acad Sci USA. 2 de marzo de 1999;96(5):2129-34). Así, haciendo referencia a las enfermedades del sistema nervioso, se sabe que los receptores hASCT están implicados en el transporte específico de aminoácidos neutros y que las células neuronales, para la transmisión de informaciones, utilizan de manera preponderante unos neuromediadores de naturaleza polipeptídica. Así, la unión de la proteína Env-HERV-W a receptores que deben transportar normalmente los aminoácidos requeridos para la síntesis de los neuromediadores puede afectar a la capacidad de las neuronas para sintetizar los neuromediadores reduciendo la entrada de los agonistas fisiológicos que son los aminoácidos a través de los receptores ASCT. Por otra parte, si una neurona, cuyas redes inter-celulares forman unas conexiones indispensables para la transmisión de las informaciones que circulan en el cerebro y la médula espinal, forman una sincitia tras una fusión de varias neuronas inducida por la proteína Env-HERV-W, todas las redes de transmisión de las informaciones se encuentran perturbadas y conectadas al mismo "paquete celular" fusionado y además la actividad de producción de los neuromediadores de cada célula ya no está individualizada, ni conectada a las vías de conducción aguas arriba y aguas abajo (dendritas y axones) que le son propias.

De manera sorprendente, los inventores han identificado la región polipeptídica responsable de las interacciones

entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia HERV-W y un receptor hASCT.

Han identificado efectivamente un dominio peptídico necesario para la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor hASCT, definido por que empieza por un extremo N-terminal y termina por un extremo C-terminal, y por que:

- el extremo N-terminal está definido por un motivo, constituido por los aminoácidos $(Z)_\alpha$ -prolina-cisteína-X-cisteína en el que

Z es un aminoácido cualquiera,

α es un número entero comprendido entre 2 y 30

X es un aminoácido cualquiera, estando dicho motivo seleccionado de entre SEC ID nº 1 a SEC ID nº 29 y SEC ID nº 44 a SEC ID nº 72

- el extremo C-terminal está definido por un motivo, constituido por los aminoácidos Serina-Ácido aspártico- X_a - X_b - X_c - X_d - X_e -Ácido aspártico- X_f - X_g - $(Z)_\beta$ en el que

$X_a, X_b, X_c, X_d, X_e, X_f, X_g$, son unos aminoácidos cualesquiera

Z es un aminoácido cualquiera

β es un número entero comprendido entre 15 y 25, preferentemente 20

estando dicho motivo seleccionado de entre SEC ID nº 30 a SEC ID nº 40,

y por que dicho dominio peptídico comprende, entre el extremo N terminal y el extremo C terminal por lo menos un motivo seleccionado de entre los motivos siguientes:

un motivo constituido por los aminoácidos Cisteína-Tirosina- X_2 - X_3 - X_4 - X_5 - X_6 -Cisteína, en el que X_2, X_3, X_4, X_5, X_6 son unos aminoácidos cualesquiera, correspondiendo dicho motivo a la SEC ID nº 41

un motivo constituido por los aminoácidos Cisteína- X_7 - X_8 - X_9 - X_{10} - X_{11} - X_{12} - X_{13} - X_{14} - X_{15} -Cisteína-Triptofano, en el que $X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}$ son unos aminoácidos cualesquiera, correspondiendo dicho motivo a la SEC ID nº 42 o SEC ID nº 73.

Así, la invención se refiere a un dominio peptídico de la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W, capaz de interactuar con un receptor hASCT, definido por que empieza por un extremo N-terminal y termina por un extremo C-terminal, y por que:

- el extremo N-terminal está definido por un motivo seleccionado de entre SEC ID nº 1 a SEC ID nº 29,
- el extremo C terminal está definido por un motivo seleccionado de entre SEC ID nº 30 a SEC ID nº 40,

y por que dicho dominio peptídico comprende, entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal por lo menos un motivo seleccionado de entre SEC ID nº 41, SEC ID nº 42 y SEC ID nº 73.

Por dominio peptídico según la invención, se entiende una zona mínima de la envoltura de un virus del grupo de interferencia HERV-W necesaria para el reconocimiento de un receptor hASCT.

Los dominios peptídicos de la invención se pueden obtener mediante la técnica de ingeniería genética que comprende las etapas de:

- cultivo de un microorganismo o de células eucariotas transformadas con la ayuda de una secuencia nucleotídica según la invención, y
- recuperación del dominio peptídico producido por dicho microorganismo o dichas células eucariotas.

Esta técnica es bien conocida por el experto en la materia. Para más detalle sobre ella, se podrá hacer referencia al documento siguiente: Recombinant DNA Technology I, Editores Ales Prokop, Raskesh K Bajpai; Annals of the New-York Academy of Sciences, Volumen 646, 1991. Los dominios peptídicos de la invención pueden ser preparados también por las síntesis peptídicas clásicas bien conocidas por el experto en la materia.

Por grupo de interferencia, se entiende el conjunto de los virus cuya infección (expresión) de una célula por uno de sus miembros impide la infección por otro miembro del grupo por interferencia de receptor.

Por aminoácido cualquiera, se entiende, en particular, un aminoácido seleccionado de entre la arginina, la histidina, la lisina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la asparagina, la glutamina, la serina, la treonina, la asparagina, la treonina, la alanina, la isoleucina, la leucina, la metionina, la fenilalanina, el triptófano, la tirosina,

la valina, la cisteína, la glicina, la prolina.

Por Receptor hASCT, se entiende cualquier transportador de aminoácidos neutros sodio-dependiente.

5 Por motivos, se entiende una sucesión de aminoácidos que corresponde a una región de interés particular del dominio peptídico según la invención, que se expresa por el conjunto de los virus del grupo de interferencia del virus GERV-W.

10 Preferentemente, α es un número entero comprendido entre 3 y 18.

Preferentemente, X o Xaa del motivo Pro Cys Xaa Cys en las SEC ID nº 1 a SEC ID nº 29 es un aminoácido seleccionado de entre el ácido aspártico, el ácido glutámico, la arginina: estas secuencias son así seleccionadas preferentemente de entre SEC ID nº 44 a SEC ID nº 72.

15 Preferentemente, X_a, X_b, X_c o los aminoácidos en la posición 3, 4 y 5 de las SEC ID nº^{os} 30 a 40 son una glicina, X_d o el aminoácido Xaa en la posición 6 de las SEC ID nº^{os} 30 a 40 es un aminoácido seleccionado de entre la prolina y la valina; X_e o el aminoácido Xaa en la posición 7 de las SEC ID nº^{os} 30 a 40 es un aminoácido seleccionado de entre la glutamina, la leucina y la treonina; X_f o el aminoácido Xaa en la posición 9 de las SEC ID nº^{os} 30 a 40 es un aminoácido seleccionado de entre la lisina, la treonina, la metionina y la glutamina, X_g o el aminoácido en la posición 10 de las SEC ID nº^{os} 30 a 40 es un aminoácido seleccionado de entre la alanina, la lisina, la isoleucina, la treonina y la valina.

Preferentemente, β es un número entero igual a 20.

25 Preferentemente, X₂ o el aminoácido Xaa en la posición 3 de SEC ID nº 41 es un aminoácido seleccionado de entre la asparagina, la treonina, el ácido glutámico, la histidina, X₃ o el aminoácido Xaa en la posición 4 de SEC ID nº 41 es un aminoácido seleccionado de entre la histidina, la alanina, la serina, la lisina, el ácido glutámico; X₄ o el aminoácido Xaa en la posición 5 de SEC ID nº 41 es un aminoácido seleccionado de entre la tirosina, la treonina, la alanina, X₅ o el aminoácido Xaa en la posición 6 de SEC ID nº 41 es un aminoácido seleccionado de entre la glutamina, la arginina, la treonina, X₆ o el aminoácido Xaa en la posición 7 de SEC ID nº 41 es un aminoácido seleccionado de entre la leucina, la glutamina, el ácido glutámico.

Preferentemente X₇ o el aminoácido Xaa en la posición 2 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la prolina, la treonina, la arginina y la asparagina; X₈ o el aminoácido Xaa en la posición 3 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la glicina, el ácido glutámico, la asparagina, X₉ o el aminoácido Xaa en la posición 4 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la glicina, la asparagina, la isoleucina, la treonina, la serina, X₁₀ o el aminoácido Xaa en la posición 5 de SEC ID nº 42 es una lisina o está suprimido; X₁₁ o el aminoácido Xaa en la posición 6 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la lisina, la valina, la isoleucina, la leucina, X₁₂ o el aminoácido Xaa, en la posición 7 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la glicina, la asparagina; X₁₃ o el aminoácido Xaa en la posición 8 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la glutamina, la lisina, la valina, X₁₄ o el aminoácido Xaa en la posición 9 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la valina, la prolina, la serina, la treonina, X₁₅ o el aminoácido Xaa en la posición 10 de SEC ID nº 42 es un aminoácido seleccionado de entre la valina, la isoleucina.

45 Preferentemente,

el aminoácido Xaa en la posición 2 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la prolina, la treonina, la arginina y la asparagina

50 el aminoácido Xaa en la posición 3 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la glicina, el ácido glutámico, la asparagina

55 el aminoácido Xaa en la posición 4 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la glicina, la asparagina, la isoleucina, la treonina, la serina

el aminoácido Xaa en la posición 5 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la lisina, la valina, la isoleucina, la leucina

60 el aminoácido Xaa en la posición 6 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la glicina, la asparagina

el aminoácido Xaa en la posición 7 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la glutamina, la lisina, la valina

65 el aminoácido Xaa en la posición 8 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la valina, la prolina, la serina, la treonina

el aminoácido Xaa en la posición 9 de SEC ID nº 73 se selecciona de entre la valina, la isoleucina.

Son posibles unas deleciones en los dominios según la invención indicados anteriormente. Según un modo de realización particular de la invención, se delecciona X₁₀.

La invención se refiere asimismo a un dominio peptídico según la invención, caracterizado por que induce una respuesta inmune contra un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W, consistiendo dicho dominio peptídico en SEC ID nº 74. El dominio peptídico así definido es reconocido por un receptor situado en la superficie de un linfocito B o T o de un anticuerpo circulante.

Por "respuesta inmune" se entiende el conjunto de los mecanismos biológicos que permiten que un organismo pluricelular mantenga la coherencia de las células y tejidos que lo constituyen y asegure su integridad en respuesta a cualquier agresión que modifique las estructuras moleculares de sus constituyentes o que introduzca unas moléculas extrañas en el organismo.

En el contexto de la invención, se describe también una secuencia nucleotídica que codifica para un dominio peptídico tal como se ha definido anteriormente. Unas secuencias de este tipo se pueden preparar por síntesis química e ingeniería genética utilizando las técnicas bien conocidas por el experto en la materia y descritas por ejemplo en Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

En el contexto de la invención, se describe también un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica anterior, así como los medios necesarios para su expresión.

A título de vector de expresión, se pueden citar por ejemplo los plásmidos, los vectores virales de tipo virus de la vacuna, adenovirus, baculovirus, poxvirus, retrovirus, los vectores bacterianos de tipo salmonella, BCG.

Por "medios necesarios para su expresión" se entiende cualquier medio que permite obtener un péptido a partir de una secuencia nucleotídica, tal como en particular un promotor, un terminador de transcripción, un origen de replicación y preferentemente un marcador de selección.

Los vectores de expresión anteriores también pueden comprender unas secuencias necesarias para la focalización de los péptidos hacia unos compartimientos celulares particulares.

En el contexto de la invención, se describe también un microorganismo o célula hospedante transformada por lo menos por un vector de expresión anterior.

A título de ejemplos de microorganismos que convienen en el contexto de la invención, se pueden citar las levaduras, tales como las de las familias siguientes: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Hanseluna*, *Yarrowia*, *Schwaniomyces*, *Zygosaccharomyces*; siendo preferidas *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* y *Kluveromyces lactis*; y las bacterias, tales como *E. coli* y las de las familias siguientes: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces*.

A título de ejemplos de células hospedantes transformadas, se pueden citar las células que proceden de animales tales como los mamíferos, los reptiles, los insectos y equivalentes. Las células eucariotas preferidas son las células que proceden del hámster chino (células CHO), del mono (células COS y Vero), del riñón de hámster joven (células BHK), del riñón de cerdo (células PK 15) y del riñón de conejo (células RK13), las líneas celulares humanas de osteosarcoma (células 143 B), las líneas celulares humanas HeLa y las líneas celulares humanas del hepatoma (del tipo células Hep G2), así como las líneas celulares de insecto (por ejemplo de *Spodoptera frugiperda*), una línea celular de riñón embrionario humano (por ejemplo HEK293T). Las células hospedantes se pueden proporcionar en cultivos en suspensión o en frasco, en cultivos de tejidos, unos cultivos de órgano y equivalentes.

La invención se refiere también a un anticuerpo monoclonal dirigido contra un dominio peptídico según la invención.

Por "anticuerpo" se entiende tanto un anticuerpo entero como un fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos recombinantes se pueden obtener según unos procedimientos clásicos conocidos por el experto en la materia, a partir de organismos procariotas, tales como bacterias, o a partir de organismos eucariotas, tales como levaduras, células de mamíferos, de plantas, de insectos o de animales, o unos sistemas de producción extracelular. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar según las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia, tales como la técnica de los hibridomas, cuyo principio general se recuerda a continuación.

En primer lugar, se inmuniza un animal, generalmente un ratón (o unas células en cultivo en el marco de inmunizaciones *in vitro*) con un antígeno diana de interés, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productos de anticuerpos se fusionan después con unas

células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente al antígeno de interés podrán ser ensayadas por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son a continuación purificados, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad.

Por "fragmento de anticuerpo" se entiende cualquier fragmento de anticuerpo consecutivo a una respuesta inmune contra un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W. Estos fragmentos de anticuerpos pueden por ejemplo ser obtenidos por proteólisis. Así, pueden ser obtenidos por digestión enzimática, resultando en unos fragmentos de tipo Fab (tratamiento con papaína; Porter RR, 1959, Biochem. J., 73: 119-126) o de tipo F(ab)₂ (tratamiento con pepsina; Nisonoff A. *et al.*, 1960, Science, 132: 1770-1771). También se pueden preparar por vía recombinante (Skerra A., 1993, Curr. Opin. Immunol., 5: 256-262). Otro fragmento de anticuerpo conveniente para los fines de la invención comprende un fragmento Fv que es un dímero constituido por la asociación no covalente del dominio variable ligero (VL) y del dominio variable pesado (VH) del fragmento Fab, por lo tanto por la asociación de dos cadenas polipeptídicas. Con el fin de mejorar la estabilidad del fragmento Fv debido a la disociación de las dos cadenas polipeptídicas, este fragmento Fv puede ser modificado por ingeniería genética insertando un enlace peptídico adecuado entre el dominio VL y el dominio VH (Huston P. *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883). Se habla entonces de fragmento scFv ("single chain Fragment variable"), ya que está constituido por una sola cadena polipeptídica. La utilización de un enlace peptídico compuesto preferentemente de 15 a 25 aminoácidos permite unir el extremo C-terminal de un dominio al extremo N-terminal del otro dominio, constituyendo así una molécula monomérica dotada de propiedades de unión similares a las del anticuerpo en su forma completa. Son convenientes las dos orientaciones de los dominios VL y VH (VL-enlace-VH y VH-enlace-VL) ya que presentan propiedades funcionales idénticas. Por supuesto, cualquier fragmento conocido por el experto en la materia y que presente las características inmunológicas definidas anteriormente es conveniente para los fines de la invención.

La invención se refiere también a la utilización de por lo menos un dominio peptídico según la invención o de por lo menos un anticuerpo según la invención, para la preparación de un medicamento destinado a la inhibición, la prevención o el tratamiento de una infección provocada por un virus que pertenece a grupo de interferencia de HERV-W en un animal, preferentemente el ser humano. El dominio peptídico según la invención se puede utilizar en particular para focalizar unas células que expresan un receptor de la familia hASCT con el fin de transducir una señal, modular el flujo de los aminoácidos (tratamiento del cáncer).

Por "elementos necesarios para una expresión constitutiva de los péptidos" se entiende un promotor ubiquitario o específico de las células eucariotas. A título de elementos necesarios para una expresión inducible de los péptidos, se pueden citar los elementos de regulación del operón de *E. coli* para la resistencia a la tetraciclina (Gossen M. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 89: 5547-5551 (1992)).

La utilización de por lo menos un dominio peptídico según la invención es particularmente adecuada para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de una infección provocada por un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W en un animal, preferentemente el ser humano. La utilización de por lo menos un anticuerpo según la invención es particularmente adecuada para la preparación de un medicamento destinado a la inhibición o el tratamiento de una infección o de una patología inducida por un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W en un animal, preferentemente el ser humano.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica, que comprende a título de sustancia activa, por lo menos un dominio peptídico según la invención, en asociación con un vehículo farmacéuticamente apropiado. La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende a título de sustancia activa, por lo menos un anticuerpo según la invención, en asociación con un vehículo farmacéuticamente apropiado.

Por supuesto, el experto en la materia determinará fácilmente el vehículo farmacéuticamente apropiado y la cantidad de dominio peptídico, de epítomos, de ácidos nucleotídicos o de anticuerpos a utilizar en función de los constituyentes de la composición farmacéutica.

En las composiciones farmacéuticas según la invención, para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, intratraqueal, rectal, transdérmica, la sustancia activa puede ser administrada en formas unitarias de administración o en mezcla con soportes farmacéuticos clásicos, y destinados a una administración por vía oral, por ejemplo en forma de un comprimido, de una cápsula, de una solución bebible, etc., o por vía rectal, en forma de un supositorio, por vía parenteral, en particular en forma de una solución inyectable, en particular por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, etc., según unos protocolos clásicos bien conocidos por el experto en la materia. Para la aplicación tópica, se puede utilizar la sustancia activa en cremas, pomadas, lociones, colirios.

Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, se mezcla la sustancia activa con un

- excipiente farmacéuticamente aceptable también denominado vehículo farmacéutico, tal como gelatina, almidón, lactosa, estearato de magnesio, talco, goma arábiga o análogos. Se puede cubrir los comprimidos de sacarosa, de un derivado celulósico, o de otras materias apropiadas. Se los puede también tratar de tal manera que tengan una actividad prolongada o retardada, y que liberen de manera continua una cantidad predeterminada de la sustancia activa. Se puede también obtener una preparación en cápsulas mezclando la sustancia activa con un diluyente y vertiendo la mezcla en cápsulas blandas o duras. Se puede obtener también una preparación en forma de jarabe o para la administración en forma de gotas, en la que la sustancia activa está presente conjuntamente con un edulcorante, un antiséptico, tal como en particular un metilparabeno y propilparabeno, así como un agente de sabor o un colorante apropiado. Los polvos o los gránulos dispersables en agua pueden contener la sustancia activa en mezcla con unos agentes de dispersión o unos agentes humectantes, o unos agentes de puesta en suspensión, bien conocidos por el experto en la materia. Para una administración parenteral, se utilizan unas suspensiones acuosas, unas soluciones salinas isotónicas o unas soluciones estériles e inyectables que contienen unos agentes de dispersión, unos humectantes farmacológicamente compatibles, tales como en particular el propilenglicol o el butilenglicol.
- El medicamento o la composición farmacéutica según la invención puede comprender además un agente de activación que induce los efectos de una medicación o refuerza o complementa los efectos de la medicación principal, aumentando en particular la biodisponibilidad de la medicación principal.
- La posología depende de la gravedad de la afección y se adaptará según un protocolo clásico. A título indicativo, cuando la sustancia activa es un anticuerpo monoclonal, la dosis semanal es de 1 a 10 mg/kg, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- La invención se refiere también a una composición de diagnóstico para la detección y/o la cuantificación de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W o la detección y/o la cuantificación de una respuesta inmune contra dicho virus, que comprende por lo menos un dominio peptídico según la invención o por lo menos un anticuerpo según la invención.
- Una composición de diagnóstico que comprende por lo menos un dominio peptídico según la invención es particularmente adecuada si se desea determinar si un paciente presenta una respuesta inmune contra un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W, mientras que una composición de diagnóstico que comprende por lo menos un anticuerpo según la invención es particularmente adecuada para la detección y/o la cuantificación de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W.
- La invención se refiere también a un procedimiento de detección y/o de cuantificación de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W, en una muestra biológica extraída en un individuo susceptible de estar infectado por dicho virus, caracterizado por que comprende las etapas que consisten en:
- poner en contacto dicha muestra biológica con por lo menos un anticuerpo según la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el virus y el anticuerpo, y
 - detectar y/o cuantificar la formación de dicho complejo mediante cualquier medio apropiado.
- Por "muestra biológica" se entiende una muestra biológica de origen humano o animal susceptible de contener dicho virus tal como una muestra de sangre, de plasma, de suero, de orina, de líquido cefalorraquídeo, o de tejidos tales como la placenta, los testículos, la próstata, los senos.
- La etapa de puesta en contacto es una etapa clásicamente conocida por el experto en la materia.
- La etapa de detección/cuantificación se puede realizar mediante cualquier medio de detección conocido en el campo de las determinaciones inmunológicas de moléculas muy pequeñas, tal como la detección directa, es decir sin el intermedio de pareja(s) de unión, y la detección indirecta, es decir por medio de pareja(s) de unión.
- La detección directa de la unión entre el anticuerpo o el fragmento de anticuerpos de la invención y el virus se puede realizar, por ejemplo, por resonancia plasmónica de superficie o por voltametría cíclica sobre un electrodo que lleva un polímero conductor. En este caso, el anticuerpo de la invención sirve para inmunocapturar todo o parte del virus, que se eluye después. La elución se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento de elución conocido por el experto en la materia, tal como un choque de pH.
- En el caso de la detección indirecta, la segunda etapa del procedimiento de la invención se puede llevar a cabo según la técnica clásica ELISA de determinación por competición. El anticuerpo de la invención sirve entonces de pareja de unión que sirve para la captura de todo o parte del virus en la muestra. La detección se puede realizar entonces por competición entre todo o parte del virus susceptible de ser contenido en la muestra a ensayar y una cantidad conocida del virus previamente marcado.
- Por marcado, se entiende la fijación de un marcador capaz de generar directa o indirectamente una señal

detectable. Una lista no limitativa de estos marcadores consiste en:

- 5 ▪ las enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la acetilcolina esterasa, la b-galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
- 10 ▪ los cromóforos como los compuestos luminiscentes, colorantes,
- 10 ▪ las moléculas radioactivas como el ³²P, el ³⁵S o el ¹²⁵I,
- 10 ▪ las moléculas fluorescentes tales como la fluoresceína, la rodamina, la Alexa o las ficocianinas, y
- 15 ▪ las partículas tales como las partículas de oro, de látex magnético, los liposomas.

15 También se puede utilizar unos sistemas indirectos de marcado, como por ejemplo por medio de otra pareja ligando/anti-ligando. Las parejas ligando/anti-ligando son bien conocidas por el experto en la materia, y se puede citar por ejemplo las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, biotina/avidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido. En este caso, es el ligando el que está unido a la pareja de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los marcadores descritos en el párrafo anterior o ser el mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

20 Estos sistemas indirectos pueden conducir, en algunas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá hacer referencia a las solicitudes de patente anteriores FR98/10084 o WO95/08000 de la solicitante o al artículo J. Histochem. Cytochem., (1997), 45: 481-491.

25 El marcado de moléculas es ampliamente conocido por el experto en la materia y se describe por ejemplo por Greg T. Hermanson dans Bioconjugate Techniques, 1996, Academic Press Inc, 525B Street, San Diego, CA92101 USA.

30 Según el tipo de marcado utilizado, como por ejemplo utilizando una enzima, el experto en la materia añadirá unos reactivos que permiten la visualización del marcado.

35 Tales reactivos son ampliamente conocidos por el experto en la materia y se describen en particular en Principles and Practice of Immunoessay, 2ª edición, Editado por C. Price, D.J. Newman Stockton Press, 1997, 345 Park Avenue South, New York.

40 La invención se refiere también a la utilización de la composición anterior para el diagnóstico *in vitro* de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W en una muestra o extracción biológica. En particular, el diagnóstico precoz de un virus tal como el SRV1 y SERV2, virus implicados en mecanismos de inmunodeficiencia en el mono, permite proponer un tratamiento adaptado al hospedante antes de la aparición de una inmunodeficiencia. Por otro lado, el diagnóstico precoz de HERV-W, implicado en patologías placentarias, permite modular su expresión por ejemplo durante una preclamsia.

45 En el contexto de la invención, se describe también la utilización de un dominio peptídico según la invención o de un anticuerpo según la invención para inhibir la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor ASCT. Esto permite en particular obtener una inmunoterapia contraceptiva.

50 La invención se refiere también a la utilización de un dominio peptídico según la invención para identificar unas moléculas químicas o biológicas cuya interacción con todo o parte de este dominio peptídico bloquea la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor ASCT. Por ejemplo, cuando se utiliza un dominio peptídico según la invención de HERV-W, esto permite obtener en particular unas moléculas químicas o biológicas muy adecuadas para obtener un tratamiento contraceptivo.

55 La utilización de tales moléculas químicas para inhibir la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor ASCT presenta un interés terapéutico.

60 A título indicativo, se describen a continuación dos procedimientos genéricos que permite el cribado de las moléculas químicas o biológicas susceptibles de inhibir la interacción env/receptor.

60 En un contexto en el que es posible producir una envoltura soluble, conviene determinar si una molécula química o biológica altera la interacción env/receptor según un método de tipo ELISA utilizando unas células que expresan por lo menos un receptor hASCR en fase de captura. Así, en una placa de 96 pocillos, unas células que expresan un receptor hASCT de interés se cultivan o adsorben, y se detecta una interacción env/receptor a través de la utilización de una envoltura soluble marcada (tag histina, fusión GPF), y por lo tanto capaz de generar una señal de referencia dosificable. Si después de la preincubación de dicha envoltura soluble con una

molécula química o biológica, se observa una reducción de la señal, esto significa que la molécula química o biológica altera la interacción env/receptor. Alternativamente, es posible utilizar un vector retroviral pseudotipado por la envoltura de interés y que expresa un marcador detectable (LacZ) y proceder al mismo ensayo. Es también posible seleccionar unas moléculas de interés a través de una medición de inhibición de fusión. Se utilizan unas células que expresan el receptor de interés (cell-recept), por ejemplo unas células HeLa o XC-RDR así como unas células que expresan constitutivamente un marcador (por ejemplo lacZ) así como transitoriamente o de manera estable la envoltura de interés (cell-env-LacZ); la envoltura de interés se ha modificado previamente a nivel de su cola intracitoplásmica por intercambio con el dominio intracitoplásmico de env HERV-W con el fin de hacerla constitutivamente fusogénica (Cheynet *et al.*, 79(9): 5586-5593, 2005). La puesta en presencia de los dos tipos celulares, "cell-recept" en exceso y "cell-env-LacZ" en defecto, conduce a la formación de células multinucleadas gigantes o sincitiales, que contiene 1 o 2 núcleos azules que vienen de "cell-env-LacZ" y unas decenas de núcleos blancos que vienen de "cell-recept". Un mismo co-cultivo realizado en presencia de molécula química o biológica que alteran la interacción env/receptor conduce a una disminución del número de sincitia y a su contenido en núcleo. Es posible una automatización de tales mediciones con la ayuda de una videocámara ccd.

En el contexto de la invención, se describe también la utilización de un dominio peptídico según la invención para generar unos anticuerpos que bloquean la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor hASCT.

Se describe también un procedimiento para determinar una región polipeptídica necesaria para la interacción ente la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor hASCT caracterizado por que:

- se identifica la secuencia nucleotídica y/o peptídica de la envoltura precursor de dicho virus
- se excluye la parte señal
- se detecta un dominio serina-ácido aspártico-X_a-X_b-X_c-X_d-X_e-Ácido aspártico-X_f-X_g, en el que
X_a, X_b, X_c, X_d, X_e, X_f, X_g, son unos aminoácidos cualquiera que corresponden a la SEC ID nº 43
- se excluye del extremo C-terminal entre 15 y 25 aminoácidos, preferentemente 20 aminoácidos, después de dicho dominio serina-ácido aspártico-X_a-X_b-X_c-X_d-X_e-Ácido aspártico-X_f-X_g que corresponde a la SEC ID nº 43

Preferentemente X_a, X_b, X_c es un aminoácido que es la glicina, X_d es un aminoácido seleccionado de entre la prolina y la valina; X_e es un aminoácido seleccionado de entre la glutamina, la leucina, la treonina; X_f es un aminoácido seleccionado de entre la lisina, la treonina, la metionina, la glutamina, X_g es un aminoácido seleccionado de entre la alanina, la lisina, la isoleucina, la treonina, la valina.

En el sentido de la presente invención, se identifica la secuencia nucleotídica y/o consecuente peptídico de la envoltura precursor de dicho virus mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, que podrá en particular referirse a Maniatis (Ed 19899).

Se excluye la parte señal mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia tal como se describe en "Improved Prédiction of Signal Peptide: SignalP 3.0" Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne y Søren Brunak. *J. Mol. Biol.*, 340:783-795, 2004.

Se detecta dicho dominio mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, es decir utilizando un programa de tipo Blast o Fasta (véase en particular Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ., Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10).

Las figuras adjuntas se dan a título de ejemplo explicativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

La figura 1 ilustra las características y propiedades fenotípicas de proteínas recombinantes solubles derivadas de Env-W. En particular, la figura 1a ilustra la proteína recombinante soluble más grande que abarca todo o parte de las subunidades SU y TM (Env-Gp60) y la proteína recombinante soluble que corresponde a la subunidad SU (EnvSU). La figura 1b representa el análisis por citometría de flujo del ensayo de fijación de la proteína recombinante EnvSU sobre las células XC hASCT2 y XC hASCT1 que expresa respectivamente los receptores hASCT2 y hASCT1. La figura 1c ilustra el ensayo de interferencia de fijación sobre las células TE671 (control hASCT2), TE671RD (hASCT2 bloqueado) y TE671galv (Pit1 bloqueado).

La figura 2 ilustra la definición del dominio mínimo de fijación de la envoltura ERV-W sobre el receptor hASCT2 (RBD por receptor binding domain). En particular, la figura 2a describe el conjunto de los mutantes

de delección concebidos a partir de EnvSU. La figura 2b representa el análisis por citometría de flujo del ensayo de fijación de las proteínas recombinantes derivadas de EnvSU sobre las células XC hASCT2 que expresan el receptor hASCT2, en particular la fijación de los mutantes Env197, Env168 y Env144 y el defecto de fijación de los mutantes Env69-317, Env169-317 y Env117.

La figura 3a ilustra la definición de un péptido inmunógeno en el interior del dominio según la invención (RBD) que corresponde a la región 21-144 del precursor de la proteína de envoltura de HERV-W e identificado por SEC ID n 74. La figura 3b muestra la inhibición de la fijación de RBD sobre su receptor con la ayuda de un anticuerpo producido a partir del péptido inmunógeno (antiSU-EnvW) y la ausencia de inhibición de la unión RBD-receptor en presencia de un anticuerpo no específico (antiTM-EnvW).

La figura 4 representa la alineación de las secuencias retrovirales de envolturas que pertenecen al mismo grupo de interferencia y presenta los límites del péptido señal, de la sub-unidad SU (Surface unit) y de la sub-unidad TM (Trans membrane) así como el sitio de fijación al receptor. Las secuencias son HERV-W (Human Endogenous Retroviral Family W), RD114 (Cat Endogenous retrovirus), REV (Avian Reticuloendotheliosis Virus), BAEV (Baboon endogenous virus (strain M7)), SRV1 (Simian retrovirus SRV-1), SRV2 (Simian retrovirus SRV-2) y MPMV (Simian Mason-Pfizer virus).

Los ejemplos siguientes se dan a título ilustrativo y no tienen ningún carácter limitativo. Permitirán comprender mejor la invención.

Ejemplo 1: caracterización molecular y fenotípica de envolturas recombinantes

Construcción y producción de la subunidad SU de envoltura HERV-W.

A partir del vector de expresión phCMV-Env-W (Blond J Virol, Vol 74(7): 3321-3329, 2000) que contiene el gen de la envoltura HERV-W (538 aminoácidos) (clone PH74, Blond *et al.* J Virol Vol 73(2): 1175-1185, 1999), se ha concebido un vector phCMVEnv-Gp60 que permite la expresión de una proteína de envoltura recombinante soluble.

La envoltura soluble (Gp60,1-435) se ha construido como se describe a continuación:

- (1) el sitio de escisión nativo RNKR (AA 314 a 317) entre las subunidades SU y TM se ha mutado en AAAR, con el fin de permitir la producción de una proteína de fusión estable y no de dos subunidades SU-TM escindidas y después reasociadas por un puente disulfuro.
- (2) las regiones transmembranaria (tm) e intracitoplásmica (CYT) que corresponden a los aminoácidos 436 a 538 se han suprimido con el fin de obtener una proteína soluble.
- (3) se han añadido un brazo espaciador de composición (GGGS)₃ seguido de una cola polihistidina (RGS-HHHHHH) en la posición C-terminal, con el fin de permitir la purificación de esta proteína por IMAC y la detección por un anticuerpo monoclonal anti-histidina (Qiagen, RGS H6).

A partir del vector phCMVEnv-Gp60 que expresa la envoltura soluble, se ha construido el vector phCMV-EnvSU, permitiendo la producción de una proteína SU. La SU soluble es una proteína de fusión que contiene una cola polihistidina C-terminal de secuencia RGS-HHHHHH inmediatamente aguas abajo de la secuencia AAAR, con el fin de permitir la purificación de esta proteína por IMAC y la detección por un anticuerpo monoclonal anti-histidina (Qiagen, RGS H6).

La estructura esquemática de las diferentes proteínas producidas a partir de los vectores phCMV-Env-W, phCMV-EnvGp60 et phCMV-EnvSU se ilustra en la figura 1a.

Producción de la envoltura soluble.

El plásmido de expresión phCMV-EnvGp60 o phCMV-EnvSU se transfecta en las células HEK293T por precipitación con fosfato de calcio. El sobrenadante que contiene la envoltura GP60 o SU se recoge después de 48 horas de producción en un medio sin suero y se filtra sobre membranas de 0,45 µm para eliminar los restos celulares. Se analizan directamente 20 µl de sobrenadante sobre gel de poliacrilamida y por transferencia western con un anticuerpo monoclonal anti-histidina (Qiagen, RGS H6). Las proteínas GP60 y SU son correctamente expresadas en forma soluble.

Ensayo de fijación y análisis por citometría de flujo

Las líneas estables XChASCT2 y XChASCT1 que expresan constitutivamente los receptores hASCT2 (XChASCT2) o hASCT1 (XChASCT1) se han establecido después de la transfección de las células XC XC (sarcoma de rata) por unos vectores que expresan uno u otro receptor humano hASCT, después selección de un

clon como se ha descrito anteriormente (Frendo *et al.*, Mol Cell Biol, Vol 23(10): 3566-3574, 2003). Las células humanas siguientes son descritas en Blond J Virol, Vol 74(7): 3321-3329, 2000. Las células TE671 expresan hASCT2. Las células TE671RD expresan constitutivamente la envoltura RD114 (retrovirus endógeno de gato) que pertenece al mismo grupo de interferencia y que reconocen por lo tanto el receptor hASCT2. Los TE671galv expresan constitutivamente la envoltura GALV (gibbon ape leukemia virus) que pertenece a otro grupo de interferencia y que reconoce el receptor PIT1.

Se han lavado las células en PBS y recogidas por despegue con un 0,02% de versene en PBS. Se han incubado un total de 10^6 células con 1 ml de sobrenadante filtrado que contiene la envoltura soluble (Gp60 o SU) durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron con PBA (PBS y un 0,5% de azida de sodio) que contiene un 2% de suero fetal de ternera y se han marcado durante 1 hora a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-histidina (RGSH6, Qiagen). Las células se lavaron una vez con PBA y se incubaron con un anticuerpo secundario acoplado al isotiocianato de fluoresceína durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron dos veces con PBA y se analizaron por citometría en flujo.

Utilizando las células dianas XChASCT2, los inventores han puesto en evidencia que la proteína recombinante Gp60 que corresponde a una forma soluble de la envoltura presenta una característica fenotípica idéntica a la de la envoltura salvaje, a saber que es capaz de fijarse sobre las células XC que expresan el receptor hASCT2.

Utilizando las células dianas XChASCT2, XChASCT1, TE671, TE671RD, TE671 galv, los inventores han puesto en evidencia que la proteína recombinante que corresponde a la subunidad SU de la envoltura presenta unas características fenotípicas idénticas a las de la envoltura salvaje. En primer lugar, la sub-unidad SU es capaz de fijarse a los dos receptores hASCT1 y hASCT2 (figura 1b). Además, esta proteína se ha ensayado frente a células humanas TE671 y células derivadas TE671RD y TE671galv. La proteína SU soluble se fijaba sobre las células TE671 que expresan el receptor hASCT2 y las células TE671galv bloqueadas para el receptor PIT1, pero no se fijaba sobre las células TE671RD bloqueadas para el receptor hASCT2 (figura 1c). La proteína recombinante SU y la envoltura del retrovirus RD114 interferían específicamente.

Ejemplo 2: Identificación de los dominios de interacción de la parte SU de la envoltura W con su receptor hASCT2.

Con el fin de identificar los límites de la región de la envoltura que se fija al receptor hASCT2, los inventores han construido un conjunto de mutantes de delección a partir de los extremos N- y C-terminales. Los dominios de la sub-unidad SU se obtuvieron por PCR y se sub-clonaron en el vector de expresión pHCMV-EnvSU y se secuenciaron. Los plásmidos de expresión pHCMV-EnvSU, Env69-317, Env197, Env168, Env169-317, Env117 y Env144 (Figure 2a) se transfectaron en las células HEK293T por precipitación con fosfato de calcio. Las condiciones de obtención y de análisis de las proteínas son idénticas a las detalladas en el ejemplo 1.

Las proteínas EnvSU, Env69-317, Env197 estaban correctamente expresadas en forma soluble. Utilizando las células XC que expresan constitutivamente hASCT2, los inventores han demostrado que la proteína Env197 era capaz de fijarse al receptor expresado a la superficie de las células como la sub-unidad SU (1-317). Así, los 176 primeros restos de la sub-unidad SU madura (por lo tanto desprovista de su péptido señal) eran suficientes para fijarse a la superficie de las células que expresan el receptor hASCT2. La delección de la región 21-68 conlleva una pérdida de la fijación al receptor que indica también su implicación en el dominio de fijación al receptor (RBD por receptor binding domain). Por el contrario, la proteína truncada Env168 mostraba una capacidad de fijación al receptor hASCT2 más débil.

Con el fin de obtener unas cantidades equivalentes en los sobrenadantes entre las diferentes proteínas truncadas, los inventores han fusionado dos dominios más pequeños de la región N-terminal de SU (Env117 y Env144) a la región C-terminal de la sub-unidad SU (Env169-317), no fijando este último dominio a hASCT2. El nivel de expresión de las proteínas Env117 y Env144 era similar y las proteínas estaban expresadas en forma soluble. El ensayo de fijación mostraba que sólo la proteína Env144 era capaz de fijarse sobre las células que expresan el receptor hASCT2. La ausencia de fijación de la proteína Env117 a la superficie de las células indicaba la pérdida de por lo menos un determinante de fijación en el interior de la región 117-144.

En consecuencia, los límites de los dominios de interacción de la envoltura W con su receptor son definidos por los aminoácidos 21 a 144.

Se señala que, de manera general, las proteínas (incluyendo las proteínas de envoltura) destinadas a la secreción o a la expresión membranarias son sintetizadas a nivel del retículo endoplásmico granuloso (RE). La translocación de las proteínas neosintetizadas en RE está condicionada por un péptido señal N-terminal (Walter y Lingappa 1986). La región hidrófoba del péptido señal inicia la penetración en la membrana del retículo, arrastrando consigo mismo el resto del péptido neosintetizado. La translocación que empieza al mismo tiempo que la síntesis, es el péptido durante la traducción que atraviesa la membrana de RE. Mientras que la proteína pasa en la luz de RE, la secuencia señal está escindida por una enzima celular específica, la señal peptidasa (Walter P, Johnson AE: Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum

membrane. *Annu Rev Cell Biol* 1994, 10:87-119.). La translocación de Env en RE se detiene por el dominio transmembranario (hidrófobo) de la glicoproteína que se ancla a las membranas fosfolipídicas. En la luz de RE, las regiones (SU y parte de TM) destinadas a volverse extracitoplásmica son replegadas (los puentes disulfuro formados), glicosiladas y oligomerizadas. Después de la oligomerización, las proteínas en maduración son transportadas en el aparato de Golgi en el que sufren nuevos procesos de maduración de los glicanos así como la escisión por unas endoproteasas de tipo furino que reconocen un motivo R/KXXR que conduce a las dos sub-unidades SU y TM.

La proteína madura está dirigida a la membrana plásmica gracias a un motivo presente en la cola intracitoplásmica que contiene una tirosina (Y-X-X)alifática/aromática).

Ejemplo 3: Ensayo de inhibición *in vitro* de la fijación de la envoltura sobre su receptor (definición de un péptido y generación de un anticuerpo de conejo)

A partir de la región definida en el ejemplo 2 y de una determinación de las regiones potencialmente antigénicas de la sub-unidad SU, se ha definido un péptido 112-129, TGMSDGGGVQDQAREKHV+C, 19 aminoácidos). Se ha añadido una cisteína en la posición C-terminal para el acoplamiento KLH (keyhole limpet hemocyanin, véase Frendo *et al.*, *Mol Cell Biol*, Vol 23(10): 3566-3574, 2003). Este péptido se ha utilizado para inmunizar un conejo y después para purificar el anticuerpo policlonal dirigido contra la región 112-119 contenida en el suero de este conejo.

La proteína Env144 se pre-incuba a 37°C durante una hora o bien con el anticuerpo policlonal anti-SU o bien con un anti-TM. La formación del complejo proteína Env144-anticuerpo anti-SU reducía drásticamente la fijación de la envoltura sobre las células que expresan el receptor hASCT2. Por el contrario, la utilización de un anticuerpo no dirigido contra el rbd no alteraba la fijación de éste sobre el receptor hASCT2.

Ejemplo 4: Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de envoltura de HERV-W.

Inmunización de los ratones por ADN

Se inmunizaron tres ratones BALB/c hembras de diez semanas (IFFA-Credo) por inyección directa de ADN plasmídico desnudo (pHCMV-env-W) que contiene el gen de la envoltura HERV-W. Las inyecciones se realizaron por vía intradérmica con la ayuda de una pistola ("gene gun"). Se han efectuado cinco inyecciones de 2 µg de ADN en primer lugar para cada ratón seguidas de un recuerdo con dos inyecciones de 4 µg de ADN. Los sueros se han extraído y se ha determinado el título en anticuerpo para cada suero. El título del anticuerpo era demasiado bajo, por lo tanto se ha preparado un lisado celular.

Preparación del lisado celular.

Las células de rhabdomyosarcoma TelCeB6 (ATCC CRL8805) se transfectaron por el plásmido pHCMV-env-W. Después de veinte horas y presencia de sincitia, se realizó un extracto celular en tampón PBS 0,5% Tritón. Los extractos proteicos se determinaron por Bradford. La concentración en antígeno env-W correspondía a 9,5 µg/µl de proteínas totales.

Inmunización de los ratones por extracto de lisado celular.

Los mismos ratones han recibido en primer lugar una inyección de 10 µg de lisado celular por vía intraperitoneal seguida de una inyección de recuerdo de 2 z 100 µg de lisado celular por vía intraperitoneal. Tres días antes de la fusión con las células de mieloma, se ha efectuado una nueva inyección, por vía intravenosa, de 22 µg de la proteína de envoltura soluble Gp60 obtenida a partir del plásmido pHCMV-Env-Gp60 como se describe en el ejemplo 1 anteriormente, purificada antes de la inyección sobre resina Ni-NTA (Qiagen) según las condiciones siguientes: fijación en tampón fosfato pH 8, lavados en tampón fosfato pH 8 y en acetato de amonio pH 6, elución en tampón de acetato de amonio pH 3,5 y concentración por "speed vac." Se reservaron así 47 µg de la proteína Gp60 eucariota así obtenida para la inyección por vía intravenosa descrita anteriormente. Después de la fusión, se ensayaron los sobrenadantes de los hibridomas por inmunofluorescencia sobre las células transfectadas y fijadas (TelCeb6), se cribaron los anticuerpos mediante un ensayo funcional en ELISA utilizando la proteína Env-W a una concentración de 9,2 µg/µl de proteínas totales y una proteína Env AS como control negativo a una concentración de 13,3 µg/µl de proteínas totales, y se seleccionaron los anticuerpos con más rendimiento.

Se obtuvieron así los anticuerpos monoclonales 2H1H8, 12C7A3 y 1F11B10. Los anticuerpos monoclonales 2H1H8 y 12C7A3 se dirigen contra la parte N-terminal no glicosilada de la región SU de la proteína Env-HERV-W. Se dirigen contra rdb como se muestra mediante un ensayo en transferencia western con la ayuda de Env 144. El anticuerpo monoclonal 1F11B10 se dirige contra la parte C-terminal glicosilada de la región SU de la proteína Env-HERV-W como se muestra mediante un ensayo en transferencia western con la ayuda de Env 169-317. No reconoce Env 144.

Ejemplo 5: Ensayo de inhibición *in vivo* de la fijación de la envoltura sobre su receptor y de inhibición de la formación de sincitia con la ayuda de anticuerpos monoclonales por ensayo de fusión de célula a célula (co-cultivo)

5 El plásmido de expresión de la glicoproteína de envoltura se transfecta en las células TELCeB6 por precipitación al fosfato de calcio a dos cantidades 100 y 500 ng (Cosset *et al.*, Journal of Virology, 69 (10): 6314-6322 (1995)). Las células que expresan la envoltura se desenganchan del soporte 20 horas después de la transfección y se pre-incuban a 37°C durante una hora, respectivamente, con el anticuerpo monoclonal anti-HIV 23A5, el anticuerpo monoclonal anti-TM Env-HERV-W 6A2B2 (obtenido anteriormente), los anticuerpos monoclonales anti-SU Env-HERV-W 2H1H8 12C7A3 y 1F11B10 (dilución al 1/50). Después, se re-inoculan a concentración igual (0,4 x 10⁵ células/pocillo) en placas de 12 pocillos. Unas células humanas indicadoras de carcinoma epitelioide (Hela, ATCC CCL-2,) se añaden entonces a las células transfectadas a razón de 2 10⁵ células por pocillo y el co-cultivo se prosigue durante 24 h. Se puede efectuar entonces una coloración XGal (5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido para teñir el núcleo de las células TELCeB6 (Cosset *et al.*, Journal of Virology, 69 (10): 6314-6322 (1995)). Se sigue de una coloración por soluciones de May-Grünwald y Giemsa (MERCK) efectuada según las recomendaciones del proveedor. La fusión observada corresponde a una fusión "from within", es decir a una fusión de célula a célula, a partir de una célula que expresa la envoltura, por oposición a una fusión "from without" que corresponde a una formación de sincitia consecutiva a una fusión virión-célula(s). Los resultados presentados en la tabla 1 siguiente expresan el número de células fusionadas contadas.

Tabla 1

| Anticuerpo | 23A5 | 6A2B2 | 2H1H8 | 1F11B10 | 12C7A3 |
|--------------------|------|-------|-------|---------|--------|
| 100 ng | 261 | 231 | 130 | 223 | ND |
| 500 ng | 217 | 273 | 73 | 210 | 11 |
| ND: no determinado | | | | | |

25 Los resultados presentados anteriormente muestran que la formación del complejo proteico Env-anticuerpo anti-SU 2H1H8 y 12C7A3 reducen drásticamente la fijación de la envoltura sobre las células que expresan el receptor hASCT2 así como la fusión de las células. Por el contrario, la utilización de un anticuerpo no dirigido contra rdb (6A2B2 o 1F11B10) no altera la fijación de la envoltura y la fusión de las células de manera significativa, como se puede constatar por comparación con los resultados obtenidos con el anticuerpo de control anti-HIV 23A5.

Ejemplo 6: Estudio de la interacción *in vivo* entre la proteína de envoltura y el receptor hASCT2 y de la formación *in vivo* de sincitia.

35 Para verificar los resultados obtenidos *in vitro*, se ha concebido un modelo animal. Unas células de rabdomosarcoma TelCeB6 (ATCC CRL8805), en cultivo en el medio DMEM (Gibco Invitrogen 41966-029) complementado con suero de Sudamérica, se han transfectado respectivamente con la ayuda del kit LipofectAMINE PLUS™ (Gibco Invitrogen), con el ADN que corresponde al gen *env* HERV-W clonado en sentido a la concentración de 2 µg/µl (ADN 409), con el ADN que corresponde al gen *env* HERV-W clonado en antisentido a la concentración de 1,5 µg/µl (ADN 410) y con el ADN que corresponde a un gen *env* HERV-W mutado a la concentración de 1,3 µg/µl (ADN LQMV) según el protocolo detallado a continuación. Las células transfectadas por el ADN 409 son capaces de expresar la proteína de envoltura W fusogénica, las células transfectadas por el ADN 410 no son capaces de expresar la proteína de envoltura y las células transfectadas por el ADN LQMV son capaces de expresar una proteína de envoltura W mutada, no fusogénica.

1). Protocolo:

1^{er} día: Puesta en cultivo de las células TelCeB6:

- 50
- Inoculación de las cajas de 100mm de diámetro → 50-70% de confluencia;
 - Incubación en medio DMEM complementado (6 ml por caja) durante 24 horas a 37°C bajo 5% de CO₂.

2^o día: Transfección con el kit LipofectAMINE PLUS™:

55 1 Precomplejación del ADN

- Mezcla de 750µl de medio no complementado con los ADN antes citados en un tubo falcon de 15 ml (referencia 2096), es decir 2µl de 409 o 3µl de 410 o 3µl LQMV;
- 60 - Agitación bajo Vortex del PLUS Reagent y añadir 20µl a la solución de ADN;

- Agitación bajo Vortex inmediatamente 10 segundos a 1400 rpm.
- Incubación durante 15 minutos a T° ambiente.

5 2 Preparación de las células

- Sustitución por 5 ml de medio no complementado.

10 3 Dilución de la Lipofectamina

En un tubo y para una caja, mezclar 30 µl de LipofectAMINE Reagent con 750 µl de medio no complementado.

4 Complejación del ADN

15 Mezclar los 780 µl de Lipofectamina diluida y los 772 µl de solución de ADN pre-complejado (total: 1552 µl); Agitación bajo Vortex inmediatamente 10 s a 1400 rpm, Incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5 Transfección y obtención de animales receptores injertados con las células dianas, tratados o no por inyección de anticuerpos anti-Env

20 Depositar los 1552 µl en una caja; Incubación durante 2-3 horas a 37°C bajo 5% CO₂; Sustitución del medio de transfección por 6ml de medio complementado; Incubación durante 1 hora a 37°C bajo 5% CO₂;

25 Inyección por vía intraperitoneal (IP) a los ratones SCID (bajo un volumen de 1 ml), 1/5 de cada caja al 70% de confluencia, con o sin inyección suplementaria de anticuerpos anti-proteína Env (anticuerpo monoclonal 2H1H8, anticuerpo policlonales 69 (anti-SU) y 71 (anti-TM) al 1/100).

30 Obtención de animales que toleran el injerto y que permiten la diseminación de las células injertadas en el organismo, paralelamente al establecimiento de una pseudo-ascitis en la cavidad peritoneal.

3^{er} día:

35 Extracción de las células de cada animal por lavado peritoneal: inyección de 2 ml de aire seguido de 2 ml de suero fisiológico y después masaje y recuperación de los 2 ml de líquido peritoneal (protocolo implementado para la recuperación en el animal injertado de células implantadas en la cavidad peritoneal);

Observación en microscopio de "fase invertida" con recuento de las sincitia y/o después de la coloración sobre lámina;

40 Se efectúa la lectura inmediatamente después de la colocación sobre las láminas con una cámara cuadrículada en presencia de azul triptano (exclusión de las células muertas). Se recuenta el número de células que han fusionado entre sí por campo cuadrículado con un objetivo de "gran ángulo" (40) que permite establecer el recuento sobre más de un centenar de células con el fin de disponer de series de recuento estadísticamente representativas.

45 Un alícuota celular de cada extracción se fija en presencia de metanol/acetona (v/v) y después se conserva a -20°C hasta la coloración con cristal violeta (1%). Las láminas teñidas son objeto de tomas fotográficas.

2) Ratones:

50 Se inoculan unos lotes de 2 ratones con:

las células transfectadas con los tres tipos de plásmido (ADNs 409, 410 y LQMV) sin anticuerpo (3x2=6 ratones)

55 las células transfectadas con los tres tipos de plásmido (ADNs 409, 410 y LQMV) con el anticuerpo monoclonal 2H1H8 (3x2=6 ratones)

3) Resultados:

60 El número de células fusionadas se determina por lectura directa sobre cámara de numeración cuadrículada para 100 células se indica en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2

| Lectura ECP (azul triptano): lectura directa de las sincitia | | | |
|--|---------------|-------------|-------|
| Líneas | Recuento S1 * | Recuento S2 | Media |
| 409 control | 19 | 22 | 20,5 |
| 409 + 2H1H8 | 3 | 4 | 3,5 |
| 410 control | 8 | 11 | 9,5 |
| 410 + 2H1H8 | 2 | 3 | 2,5 |
| LQMV control | 8 | 5 | 6,5 |
| LQMV + 2H1H8 | 1 | 1 | 1 |
| S1* y S2* = ratón 1 y ratón 2 | | | |

5 Cada cifra representa el número de células fusionadas y visualizadas por campo estudiado. Algunas células pueden ser superpuestas en la trayectoria óptica, por lo tanto el recuento de las células que aparecen fusionadas en los controles es superior a cero. La realidad de las sincitia y de la discriminación con apilamientos de células se verificaron después por coloración de las células sobre lámina, con visualización de múltiples núcleos celulares incluidos en un espacio delimitado por la continuidad de una sola y única membrana celular. Por otro lado, unas fotos que muestran unas células en proceso de fusión han permitido objetivar la realidad de la fusión a partir del análisis en microscopía en contraste de fase y ausencia total de fenómeno equivalente en los controles.

10 Para objetivar estadísticamente el análisis primario representado por las cifras indicadas en la tabla 2, se ha efectuado un ensayo de Chi-2 para comparar los datos de la tabla 2.

15 Los resultados del análisis estadístico tienen en cuenta el "ruido de fondo" de la lectura primaria, sin análisis secundario después de la coloración sobre lámina o búsqueda de células típicas en proceso de fusión que no se ven nunca en los controles son los siguientes:

20 i) Validación estadística de la especificidad del efecto patógeno *in vivo*:

Env expresada (409): 20,5 positivos contado en media sobre 100 células,
 Env antisentido (410): 9,5 positivos contados en media sobre 100 células,
 Env mutada (LQMV): 6,5 positivos contados en media sobre 100 células,
 Media de los controles (410 y LQMV): $9,5 + 6,5/2 = 8\%$
 Env frente a control 410: $\text{Chi-2} = 5,89$ ($p < 0,02$)
 Env frente a control LQMV: $\text{Chi-2} = 9,83$ ($p < 0,002$)
 Env frente a los dos controles (410 y LQMV): $\text{Chi-2} = 7,69$ ($p < 0,01$)
 Control 410 frente a control LQMV: $\text{Chi-2} = 0,61$ (Diferencia no significativa).

30 Los controles son por lo tanto estadísticamente muy equivalentes y no hay diferencia "real" relacionada con el tipo de control.

35 Los resultados obtenidos a partir de esta fase del análisis (sin excluir el ruido de fondo relacionado con las imágenes artefactuales y comparando entre ellos los dos tipos de controles (que se muestran como equivalentes) es estadísticamente muy significativa (globalmente $p < 0,01$). Los análisis ulteriores, por coloración, de la especificidad de los efectos sólo confirman por lo tanto la especificidad del efecto obtenido *in vivo* en presencia de la proteína Env, validando así el modelo animal el estudio *in vivo* de sincitia cuya fusión se ha inducido por Env HERV-W.

40 ii) Validación estadística de la actividad terapéutica de los anticuerpos ensayados sobre el efecto patógeno *in vivo*:

Los Env expresada (409): 20,5 positivos contados en media sobre 100 células,
 Env expresada (409) + anticuerpo monoclonal 2H1H8: 3,5 positivos contados en media sobre 100 células.
 Env sola frente a inyección del anticuerpo 2H1H8: $\text{Chi-2} = 15,38$ ($p < 0,001$)

50 resultados obtenidos muestran un efecto estadísticamente significativo para el anticuerpo monoclonal (probabilidad de resultado debido al azar (p) inferior a 0,001). Los análisis ulteriores, por coloración, de la especificidad de los efectos sólo confirman la especificidad del efecto obtenido *in vivo* en presencia de la proteína Env y de anticuerpos, validando así el efecto terapéutico sobre el modelo animal.

Ejemplo 7: Estudio *in vivo* de la unión de la proteína Env HERV-W de células que poseen o que no poseen receptores hASCT de tipo 1 o 2 y de la inhibición de esta unión por inyección de anticuerpos dirigidos contra Env HERV-W.

5 1) Material

Proteína soluble: sobrenadante filtrado sobre 0,45 µm que contiene la proteína soluble (células 293T transfectadas con el plásmido 460 (envoltura-espaciador-His6). Expresión verificada por transferencia western con un anticuerpo anti-RGS-His.

10

Anticuerpo: anticuerpo monoclonal 2H1H8 (IgG, 5,50 mg/ml).

Células: XChASCT2, clon celular XC (ATCC CCL-165, células de rata) que expresan el receptor hASCT2

15

Medio DMEM (Gibco Invitrogen 41966-029) con suero de Sudamérica. Pre-incubación, incubación, marcado en tubo Eppendorf 1,5 ml.

2) Protocolo

20 1 Inoculación IP (intraperitoneal) de las células XChASCT1, XChASCT2 y de las células controles XChASCT- a ratones SCID

Inyección a los ratones de 1/5 de frasco al 70% de confluencia bajo un volumen de 2 ml.

25 2. Pre-incubación

Incubación del sobrenadante proteína soluble (sobrenadante filtrado de la línea 293T) con el anticuerpo monoclonal 2H1H8 (990 µl de sobrenadante con 10 µl de anticuerpos (dilución al 100^o)) durante 1 hora a 37°C en la incubadora de las células con una agitación de vez en cuando (cada 15 minutos).

30

3. Inoculación

Inoculación de las proteínas solas o con el anticuerpo, en IP (intraperitoneal) a los ratones injertados con las células (1 10⁶ células por punto, es decir 1/5 de una caja de 100 mm de diámetro confluyente).

35

Después de la inyección del anticuerpo (200 microlitros), mantenimiento en IP durante 6 horas, con un masaje peritoneal de vez en cuando (cada 30-60 minutos).

4. Recuperación de las células por lavado peritoneal de los ratones injertados.

40

- centrifugación 3000 rpm durante 5 minutos a +4°C.

- recuperación del residuo celular y dilución en los medios de marcado (mantenimiento a +4°C hasta la fijación).

45

5. Marcado

- Anticuerpo primario:

50

Se recoge el residuo por 100 µl de anticuerpos anti-RGS His (dilución al 100^a –Qiagen) en un tampón PBA (PBS con un 2% de suero de ternera fetal y un 0,1% de azida de sodio), mantenido a +4°C.

Una hora en hielo con una agitación de vez en cuando (cada 15 minutos). Lavado en tampón PBA (1 ml por tubo), mantenido a +4°C.

55

- Anticuerpo secundario:

Centrifugación 3000 rpm durante 5 minutos a +4°C.

60

Se recoge el residuo por 100 µl de anticuerpos anti-ratones-FITC (dilución al 20^a –DAKO, referencia: F0479) en un tampón PBA), mantenido a +4°C.

Una hora en hielo con una agitación de vez en cuando (cada 15 minutos).

65

Dos lavados en tampón PBA (1 ml por tubo), mantenido a +4°C.

Residuo recogido por 500 µl de PBA, mantenido a +4°C, y análisis por FACS. Alternativamente, análisis por IF después de la fijación sobre lámina en acetona/metanol (50%/50%) a -20°C y contra-coloración con azul EVANS.

3) ratones:

Se han inoculado unos lotes de 2 ratones con:

cada tipo de células (que expresan los 2 tipos de receptores hASCT1 y hASCT2 y que no expresan el receptor hASCT – como control) sin anticuerpos (3x2=6 ratones)

los tres tipos de células con la proteína Env y el anticuerpo monoclonal 2H1H8 (3x2=6 ratones).

4) Resultados

Los resultados por lectura en inmunofluorescencia (IF) en microscopio se presentan en la tabla 3 siguiente:

Tabla 3

| Lectura IF: número de células fluorescentes/número de células totales (NF/NT) en un mismo campo | | |
|---|-------------------|-------|
| Líneas | NF / NT | Media |
| XC control | 1/18,0/10 | 1/28 |
| XC + 2H1H8 | 0/20 | 0/20 |
| XChASCT1 control | 12/40, 3/12, 9/25 | 24/77 |
| XChASCT1 +2H1H8 | 1/25, 0/18, 1/30 | 2/73 |
| XChASCT2 control | 8/22, 15/35 | 23/57 |
| XChASCT1 + 2H1H8 | 1/45 | 1/45 |

Cada cifra representa el número de células visualizadas como fluorescentes por campo estudiado. Algunas células pueden haber fijado una fluorescencia de manera no específica, por lo tanto el recuento de las células que aparecen fluorescentes en las condiciones control es por lo tanto superior a cero, en uno de los dos campos recontados (media de los dos campos = 1/28, es decir un 0,036%, lo que es muy correcto para el ruido de fondo de tal técnica de lectura). La realidad de las células que han fijado la proteína Env sobre su receptor hASCT1 o hASCT2 se ha verificado después por análisis citofluorométrico.

Para objetivar estadísticamente el análisis presentado en la tabla 3, se ha efectuado un ensayo de Chi-2 para comparar los datos extraídos en las condiciones según las cuales (i) la proteína Env puede fijarse sobre un receptor hASCT1 (hASCT1 control) o hASCT2 (hASCT2 control) presente en la superficie de las células injertadas sobre ratones SCID frente a las células control injertadas que no tienen ningún receptor (X control) sobre las cuales la proteína Env inyectada a los animales correspondientes no puede fijarse y no da fluorescencia membranaria en presencia de un anticuerpo anti-Env y (ii) la proteína Env puede fijarse sobre un receptor hASCT1 (hASCT1 control) o hASCT2 (hASCT2 control) presente en la superficie de las células injertadas sobre ratones SCID frente a la inyección de un anticuerpo monoclonal dirigido contra Env-SU.

Los resultados del análisis estadístico se presentan a continuación:

i) validación estadística de la especificidad del efecto patógeno *in vivo*:

hASCT1 control: 24 positivos contados en media sobre 77 células,
 hASCT2 control: 23 positivos contados en media sobre 57 células,
 células hASCT-: 1 positivo contado en media sobre 28 células.
 Env+injertos hASCT1 frente a hASCT-: Chi-2 = 8,62 (p< 0,01)
 ENV+injertos hASCT2 frente a hASCT-: Chi-2 = 12,53 (p< 0,001)
 Env+injertos hASCT1 frente a Env+injertos hASCT2: Chi-2 = 1,21 (Diferencia no significativa).

Las células que expresan los receptores hASCT1 o hASCT2 en su superficie son por lo tanto estadísticamente muy equivalentes y no hay diferencia de unión de Env sobre el receptor relacionada con el sub-tipo 1 o 2, en las condiciones del experimento.

Los resultados obtenidos con los animales injertados con las células que expresan los receptores membranarios hASCT1 o hASCT2 son estadísticamente significativos frente a resultados obtenidos con los animales control injertados con las células que no expresan ninguno de estos receptores en su superficie.

Estos resultados confirman la especificidad del efecto obtenido *in vivo* en presencia de la proteína Env en los modelos animales.

- ii) validación estadística de la actividad terapéutica de los anticuerpos ensayados sobre el efecto patógeno *in vivo*:

5 Env+injertos hASCT1 control: 24 positivos contados en media sobre 77 células
 Env+injertos hASCT1 + anticorps monoclonal 2H1H8: 2 positivos contados en media sobre 73 células.
 Env+injertos hASCT1 sola frente a inyección de anticuerpo 2H1H8: Chi-2 = 21,14(p< 0,001)

10 Los resultados obtenidos muestran un efecto estadísticamente significativo para el anticuerpo monoclonal (probabilidad de resultado debido al azar (p) inferior a 0,001).

Env+injertos hASCT2: 23 positivos contados en media sobre 57 células
 Env+injertos hASCT2 + anticuerpo monoclonal 2H1H8: 1 positivo contado en promedio sobre 45 células.
 Env+injertos hASCT2 sola frente a inyección de anticuerpo 2H1H8: Chi-2 = 20,31(p< 0,001).

15 Los resultados obtenidos muestran un efecto estadísticamente significativo para el anticuerpo monoclonal (probabilidad de resultado debido al azar (p= globalmente inferior a 0,01).

20 La validación de los modelos animales frente a los controles apropiados permite demostrar que los anticuerpos pueden tener una actividad terapéutica inhibiendo significativamente los efectos patógenos de la proteína Env HERV-W.

Ejemplo 8: Alineación de las secuencias del grupo de interferencia

25 Las secuencias proteicas de las envolturas de los retrovirus HERV-W (swiss-prot Q9UQF0), RD114 (swiss-prot Q98654), REV (swiss-prot P31796), BAEV (swiss-prot P10269), SRV1 (swiss-prot P04027), SRV2 (swiss-prot P51515) y MPMV (swiss-prot P07575) se han alineado con la ayuda del programa MacVector con el procedimiento ClustalW. Se indican el péptido señal, la sub-unidad SU (surface unit) y la sub-unidad TM (Trans membrana). Se subraya el sitio de fijación al receptor.

30 **Listado de secuencias**

- <110> bioMerieux SA
- 35 <120> Dominio peptídico necesario para la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor hASCT
- <130> BR56696-INTERECO
- 40 <140>
- <141>
- <150> FR06/50468
- 45 <151> 2006-02-09
- <160> 73
- <170> PatentIn versión 3.3
- 50 <210> 1
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 55 <220>
- <223> secuencia artificial
- <220>
- 60 <221> misc_feature
- <222> (1)..(2)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
- <220>
- 65 <221> misc_feature
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 1
 Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5

5
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia artificial

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

25
 <400> 2
 Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5

30
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> Secuencia artificial

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

50
 <400> 3
 Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5

55
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

60
 <220>
 <223> secuencia artificial

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 4

5 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

25 <400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

30 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 6

50 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

<210> 7
 <211> 12
 55 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <400> 7

5 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

<210> 8
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

25 <400> 8

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

30 <210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

45 <400> 9

50 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

55 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 65 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature

<222> (14)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <400> 10
 5 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10 15

 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> Secuencia artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <400> 11
 30 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10 15

 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 50 <400> 12

 Xaa Pro Cys Xaa
 1 5 10 15
 55 Cys

 <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <400> 13

 10 Xaa Pro Cys
 1 5 10 15

 Xaa Cys

 <210> 14
 15 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <400> 14

 35 Xaa Pro
 1 5 10 15

 Cys Xaa Cys

 40 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <400> 15

 60 Xaa
 1 5 10 15

 Pro Cys Xaa Cys
 20
 65

 <210> 16
 <211> 21
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 15
 <400> 16
 Xaa
 1 5 10 15
 20
 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20
 <210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 40
 <400> 17
 Xaa
 45 1 5 10 15
 Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20
 50
 <210> 18
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 65
 <400> 18

ES 2 637 961 T3

Xaa
 1 5 10 15

5 Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20

<210> 19
 <211> 24
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

25 <400> 19

Xaa
 1 5 10 15

30 Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20

<210> 20
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 50 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 20

Xaa
 55 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25

60 <210> 21
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 10 <400> 21
 Xaa
 1 5 10 15
 15 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25
 <210> 22
 <211> 27
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 35 <400> 22
 Xaa
 40 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25
 <210> 23
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 60 <400> 23
 Xaa
 65 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25

<210> 24
 <211> 29
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 20 <400> 24

 Xaa
 1 5 10 15

 25 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25

 <210> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 45 <400> 25

 Xaa
 1 5 10 15

 50 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25 30

 <210> 26
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 65 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <220>
 <221> misc_feature

<222> (30)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <400> 26
 5 Xaa
 1 5 10 15
 10 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25 30

 <210> 27
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 30 <400> 27

 Xaa
 1 5 10 15
 35 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25 30

 <210> 28
 <211> 33
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 55 <400> 28

 Xaa
 1 5 10 15
 60 Xaa Pro Cys Xaa
 20 25 30

 Cys
 65 <210> 29
 <211> 34
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 15
 <400> 29
 Xaa
 1 5 10 15
 20 Xaa Pro Cys
 20 25 30
 Xaa Cys
 25
 <210> 30
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 50 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(25)
 55 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 30
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

5 <210> 31
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 31
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25

35 <210> 32
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature

<222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 32
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa
 20 25

25 <210> 33
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(28)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 33
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

10

Xaa
 20 25

<210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 34
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25

<210> 35
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 40 <400> 35

 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

 45 Xaa
 20 25 30

 <210> 36
 <211> 31
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (11)..(31)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <400> 36
 20 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa
 20 25 30
 25 <210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (11)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <400> 37
 65 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

5 <210> 38
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(33)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 38

45 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

50 Xaa

<210> 39
 <211> 34
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(34)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 39

25 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa
 20 25 30

30 Xaa Xaa

<210> 40
 <211> 35
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 40

5 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa
 20 25 30
 10 Xaa Xaa Xaa
 35

<210> 41
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente<220>
 30

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente<220>
 35

<221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente<220>
 40

<221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente<220>
 <400> 41

45 Cys Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5

<210> 42
 <211> 12
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial
 55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 65

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <400> 42
 35 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Trp
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 55 <400> 43
 Ser Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa
 1 5 10
 60 <210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 10

<400> 44
 Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20

<220>
 <223> secuencia artificial
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 35

<400> 45
 Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40

<220>
 <223> secuencia artificial
 45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 55

<400> 46
 Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 60 1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65

<220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 10 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

<400> 47

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 15 1 5

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

<400> 48

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

<210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

<400> 49

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 60 1 5 10

<210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(8)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 10 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

<400> 50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 15 1 5 10

<210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

35 <400> 51

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

40 <210> 52
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

<400> 52

60 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 65 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 <400> 53
 15 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 16
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 35 <400> 54
 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 40 1 5 10 15
 <210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 <400> 55
 60 Xaa Pro Cys Xaa
 1 5 10 15
 Cys
 65 <210> 56
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 15
 <400> 56
 Xaa Pro Cys
 1 5 10 15
 20
 Xaa Cys
 <210> 57
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 40
 <400> 57
 Xaa Pro
 1 5 10 15
 45
 Cys Xaa Cys
 <210> 58
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> secuencia artificial
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 65
 <400> 58

ES 2 637 961 T3

Xaa
 1 5 10 15
 5 Pro Cys Xaa Cys
 20
 <210> 59
 <211> 21
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 25 <400> 59
 Xaa
 1 5 10 15
 30 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20
 <210> 60
 <211> 22
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 50 <400> 60
 Xaa
 1 5 10 15
 55 Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20
 <210> 61
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 65 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(19)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

 <400> 61
 10 Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 15 20

 <210> 62
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

 35 <400> 62

 Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 40 20

 <210> 63
 <211> 25
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 60
 <400> 63

 Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 65 20 25

<210> 64
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 <400> 64
 20 Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 25 20 25
 <210> 65
 <211> 27
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 45 <400> 65
 Xaa
 1 5 10 15
 50 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25
 <210> 66
 <211> 28
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 <400> 66

5 Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25

10 <210> 67
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> secuencia artificial

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

<400> 67
 Xaa
 1 5 10 15

25 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25

30 <210> 68
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia artificial

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

45 <400> 68

Xaa
 1 5 10 15

50 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25 30

55 <210> 69
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

15 <400> 69

Xaa
 1 5 10 15

20 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25 30

<210> 70
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

40 <400> 70

Xaa
 1 5 10 15

45 Xaa Pro Cys Xaa Cys
 20 25 30

<210> 71
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina

65 <400> 71

Xaa
 1 5 10 15
 5 Xaa Pro Cys Xaa
 20 25 30
 Cys
 10 <210> 72
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> secuencia artificial
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico o arginina
 <400> 72
 30 Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Pro Cys
 20 25 30
 35 Xaa Cys
 <210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia artificial
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente
 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente naturalmente

<400> 73

20 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Trp
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dominio peptídico de la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W, capaz de interactuar con un receptor hASCT, definido por que empieza por un extremo N-terminal y termina por un extremo C-terminal, y por que:
- 10 el extremo N-terminal está definido por un motivo seleccionado de entre la SEC ID nº 1 a la SEC ID nº 29,
- el extremo C-terminal está definido por un mmotivo seleccionado de entre la SEC ID nº 30 a la SEC ID nº 40,
- 10 y por que dicho dominio peptídico comprende, entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, por lo menos una unidad seleccionada de entre las SEC ID nº 41, SEC ID nº 42 y SEC ID nº 73.
- 15 2. Dominio peptídico tal como el definido en la reivindicación 1, caracterizado por que induce una respuesta inmune contra un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y por que consiste en la SEC ID nº 74 ilustrada en la figura 3a.
- 20 3. Anticuerpo monoclonal dirigido contra un dominio peptídico tal como el definido en la reivindicación 2.
4. Utilización de por lo menos un dominio peptídico tal como el definido en la reivindicación 1 o 2, o de por lo menos un anticuerpo tal como el definido en la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento destinado a la inhibición, a la prevención o al tratamiento de una infección provocada por un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W en un animal, preferentemente el ser humano.
- 25 5. Composición farmacéutica que comprende a título de sustancia activa por lo menos un dominio peptídico tal como el definido en la reivindicación 1 o 2, o bien por lo menos un anticuerpo tal como el definido en la reivindicación 3, en asociación con un vehículo farmacéuticamente apropiado.
- 30 6. Composición de diagnóstico para la detección y/o la cuantificación de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y/o la cuantificación de una respuesta inmune contra un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W, que comprende por lo menos un dominio peptídico tal como el definido en la reivindicación 1 o 2, o por lo menos un anticuerpo tal como el definido en la reivindicación 3.
- 35 7. Procedimiento de detección y/o de cuantificación de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W en una muestra biológica extraída en un individuo susceptible de estar infectado por dicho virus, caracterizado por que comprende las etapas que consisten en:
- 40 - poner en contacto dicha muestra biológica con por lo menos un anticuerpo según la reivindicación 3, en unas condiciones que permiten la formación de un complejo entre el virus y el anticuerpo, y
- detectar y/o cuantificar la formación de dicho complejo mediante cualquier medio apropiado.
- 45 8. Utilización de la composición según la reivindicación 6 para el diagnóstico *in vitro* de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W en una muestra o extracción biológica.
9. Utilización de un dominio peptídico según la reivindicación 1, para identificar unas moléculas químicas o biológicas cuya interacción con la totalidad o parte de este dominio peptídico bloquea la interacción entre la envoltura de un virus que pertenece al grupo de interferencia de HERV-W y un receptor hASCT.

Figura 1a

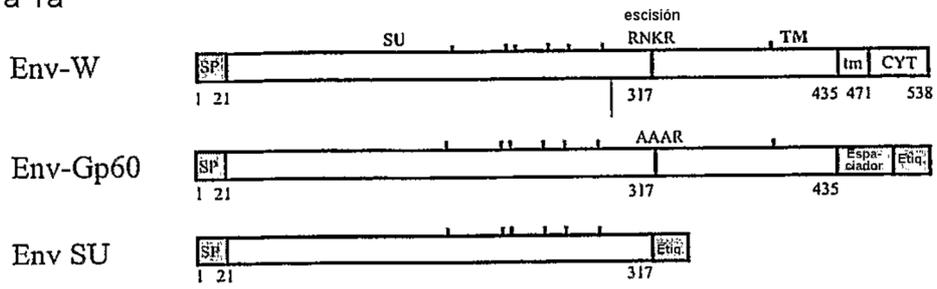


Figura 1b

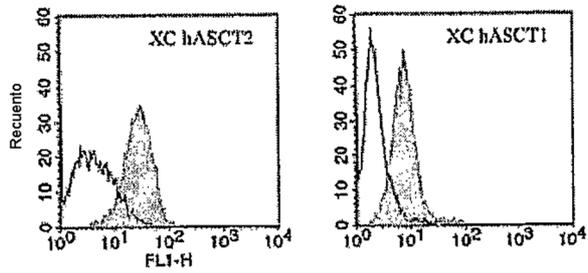


Figura 1c

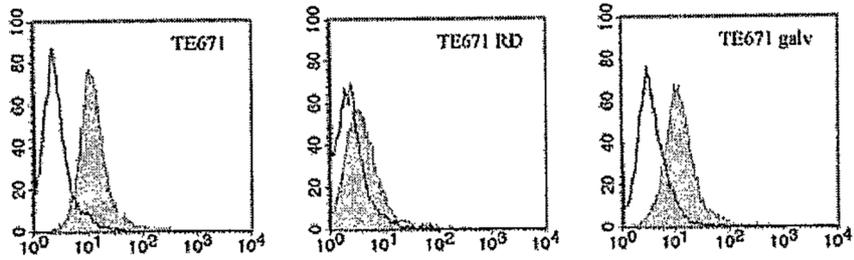


Figura 2a

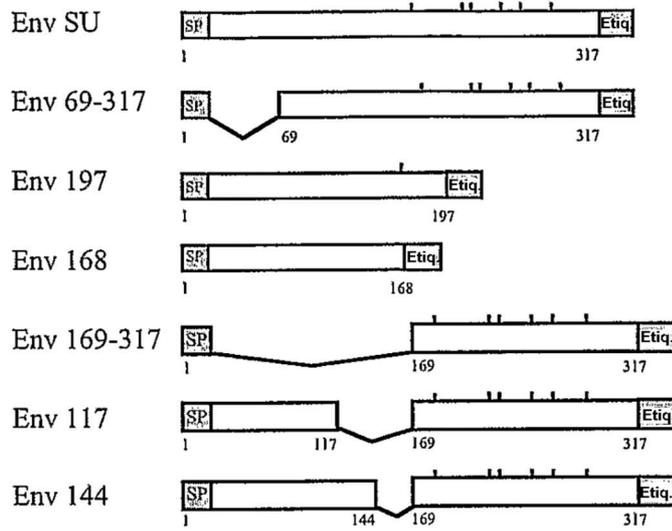


Figura 2b

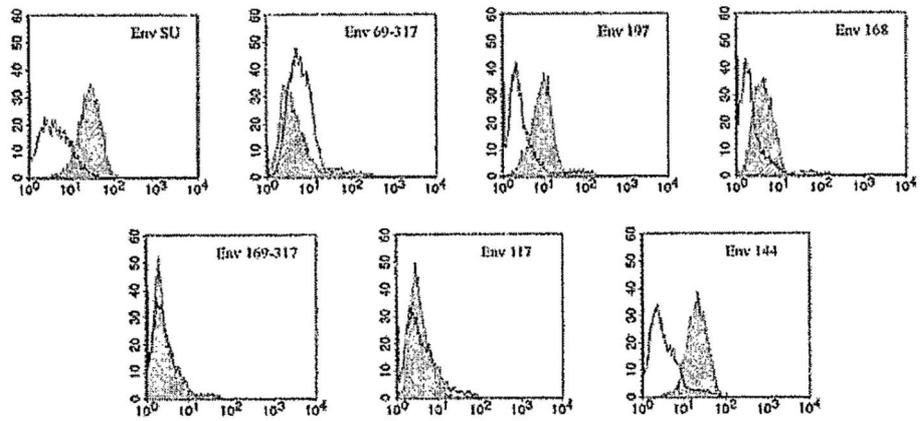


Figura 3a

APFPCRCMTSSSPYQEFLWRMQRPGNIDAPSYRSLKGTPTFTAHTHMPRNCYHSATLCMHANTHYWTGKMINPSCPGGLGVTVCWYFTQTGMSDGGGVODQAREKHVYKEVISQLTRVHGTSS

Figura 3b

