

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 921**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**C07K 14/115** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2009 E 09784341 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2356257**

54 Título: **Proteínas mutantes de la proteína F de PIV-5 y de PIV-2**

30 Prioridad:

**21.11.2008 FR 0806547**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.07.2015**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

**3, rue Michel-Ange**

**75794 Paris Cedex 16 , FR;**

**UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON 1  
(33.3%) y**

**LES HOSPICES CIVILS DE LYON (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ROSA CALATRAVA, MANUEL, MELCHIOR, JEAN-  
PIERRE;**

**TERRIER, OLIVIER y**

**DURUPT, FRANÇOIS, EDOUARD, JULIEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 541 921 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**

Proteínas mutantes de la proteína F de PIV-5 y de PIV-2

5 Campo técnico

La presente solicitud se refiere a proteínas mutantes de la proteína de fusión (proteína F) del virus *Parainfluenza* (PIV) que están actualmente catalogadas bajo PIV de tipo 5 (PIV-5 o PIV5) y PIV de tipo 2 (PIV-2 o PIV2).

10 La presente solicitud se refiere a productos que derivan de ellos, tales como:

\* ácidos nucleicos, vectores, células,

15 \* inhibidores de fusión de tipo anticuerpo, aptámeros, ARN interferente,

\* mielomas, hibridomas,

\* células madre y progenitoras.

20 La presente solicitud se refiere también a estas proteínas mutantes y productos que derivan de ellas para su utilización en aplicaciones médicas y biotecnológicas.

Técnica anterior

25 El virus *Parainfluenza* (PIV) que está actualmente catalogado bajo PIV de tipo 5 (PIV-5 o PIV5) es un virus con envoltura del género *Rubulavirus* de la familia de las *Paramyxoviridae*. PIV-5 se conocía anteriormente bajo el nombre de SV5 (*Simian Virus 5*), ya que su aislamiento se realizó inicialmente a partir de cultivos primarios de células de mono. El hospedante natural de PIV-5 parece ser sin embargo el perro, en el que causa una tos conocida con el nombre de tos de las perreras.

30 Después, se han obtenido algunos aislados de PIV-5 a partir de muestras extraídas en humanos, pero que han sido colocadas en cultivo sobre células animales. Además, no está asociado ningún síntoma o enfermedad al PIV-5 en el ser humano. La cuestión de saber si el ser humano es efectivamente un hospedante para PIV-5 está por lo tanto hoy día todavía sujeta a debate.

35 En cualquier caso, el virus PIV-5 es actualmente considerado como un virus animal.

El virus de la *Parainfluenza* (PIV) que está actualmente catalogado bajo el PIV de tipo (PIV-2 o PIV2) es también un virus con envoltura del género *Rubulavirus* de la familia de los *Paramyxoviridae*.

40 Hoy día, sólo se han identificado unos aislados humanos de PIV-2 (hPIV-2), de manera que el PIV-2 está considerado como un virus humano.

45 Los virus PIV-5 y PIV-2 son muy parecidos el uno del otro, tanto en términos de secuencias de ácidos nucleicos, como de secuencias proteicas, de organización, de estructura y de morfología.

Entre los virus de *Parainfluenza* humanos, el PIV-2 es el virus más parecido a PIV-5 que se ha encontrado en el ser humano.

50 El PIV-2 se puede considerar, y así se considera por lo menos por los inventores, como el equivalente humano de PIV-5.

La infección por PIV-5 o PIV-2 conduce a la formación de estructuras plurinucleares denominadas sincitio, que resulta de la fusión de células del hospedante infectado.

55 La entrada de los virus PIV-5 y PIV-2 en la célula hospedante se realiza mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana celular.

60 Esta fusión implica dos glicoproteínas virales: la proteína de fijación hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F).

La proteína de fusión F de PIV-5 y PIV-2 se sintetiza en forma de un simple precursor (F0) y se presenta en forma de un homotrímero glicosilado. La proteína de fusión F de PIV-5 y PIV-2 necesita una escisión proteolítica por unas furinas del hospedante para generar una forma "pre-activada" que consiste en dos subunidades unidas por unos puentes disulfuros: una gran subunidad F1 carboxi-terminal y una pequeña subunidad amino-terminal F2.

65

La sub-unidad F1 está compuesta de un péptido de fusión hidrófobo (FP) así como dos dominios repetidos en heptadas (HR-1 y HR-2), que presentan una conformación de tipo super-enrollado ("coiled-coil"). Después de la activación por HN, la proteína de fusión sufre un conjunto de cambios conformacionales que resultan en la inserción del péptido de fusión en la membrana celular diana. Tras lo cual se produce la interacción entre los dominios HR-1 y HR-2 que acercan la envoltura viral de la membrana celular (Russell *et al.* 2006). Estos dominios son conocidos por formar un haz ("bundle") de seis hélices muy estable constituido de una estructura trimérica super-enrollada ("coiled-coil") en la que tres dominios HR-1 están unidos con tres dominios HR-2 en orientación antiparalela. Esta conformación representa la forma de post-fusión de la proteína F (Baker *et al.* 1999, Sergel-Germano *et al.* 2000, West *et al.* 2005).

La proteína de fusión F de PIV-5 y PIV-2 necesita una proteína HN que proviene del mismo tipo viral para que no haya promoción de la fusión (Yao *et al.* 1997). Sin embargo, la naturaleza precisa de las interacciones que existen entre F y HN no es todavía bien conocida.

No obstante, varios estudios han mostrado que algunas cepas de PIV-5 y de PIV-2 difieren en su necesidad de HN para la activación de la fusión.

Por ejemplo, Ito *et al.* 1997 describen dos cepas de "SV5" (PIV-5) a saber W3A y WR, cuyas proteínas F difieren sólo por los tres aminoácidos (residuos 22, 443 y 516). La proteína F de la cepa W3A es capaz de inducir la fusión de manera autónoma, es decir en ausencia de la proteína HN, mientras que la proteína F de la cepa WR no es capaz de ello.

Ito *et al.* 1997 indican que la actividad fusogénica de la proteína F de la cepa WR puede ser reestablecida sustituyendo el aminoácido de la posición 22 de esta proteína por un aminoácido prolina.

Ito *et al.* 2000 sugieren que el aminoácido E de la posición 132 y el aminoácido A de la posición 290 de la proteína F de las cepas W3A y WR podrían estar implicados en la capacidad de la proteína F de estas cepas para ser autónoma de la proteína HN.

Paterson *et al.* 2000 indican que la presencia del aminoácido prolina de la posición 22 de la proteína F de la cepa W3A, la presencia del aminoácido 443 de la proteína F de la cepa WR podrían aumentar la capacidad fusogénica de estas cepas virales.

Russell *et al.* 2003 indican que el hecho de sustituir los residuos L447 y I449 de la proteína F de la cepa W3A por unos aminoácidos aromáticos podría aumentar la capacidad fusogénica de esta cepa viral.

Gardner y Dutch 2007 indican que la mutación I49A de la proteína F de un virus "SV5" (PIV-5) de tipo salvaje tendría un efecto pro-fusogénico.

Gardner *et al.* 2007 indican que la mutación V402A de la proteína F de un virus "SV5" (PIV-5) de tipo salvaje tendría un efecto pro-fusogénico.

En lo referente a la proteína PIV-2, no parece haber documento en la técnica anterior que describiera la introducción de mutación(es) en la secuencia de la proteína F de este virus, a fin de intentar aumentar su autonomía y su capacidad fusogénica.

Por otra parte, existen otras numerosas proteínas virales capaces de fusión, tales como por ejemplo las proteínas HA1/HA2 de *Influenza*, la proteína G de los *Rhabdovirus*, las proteínas gp41/gp120 del VIH.

Los conocimientos actuales en cuestión de capacidades de fusogenicidad y de autonomía de estas diferentes proteínas virales siguen siendo hoy día muy limitados.

En cualquier caso, los conocimientos actuales en cuestión de proteínas de fusión virales no aportan un dominio técnico que sea suficiente para considerar unas aplicaciones médicas y/o biotecnológicas efectivas.

#### Resumen de la invención

Los inventores han considerado que el hecho de disponer de una proteína de fusión que sea hiperfusogénica y que tenga asimismo una gran autonomía en su capacidad de fusión permitiría aportar una solución a un cierto número de situaciones médicas y biotecnológicas.

Los inventores han realizado entonces una selección selectiva frente a la proteína F de PIV-5 y/o PIV-2 con respecto al conjunto de las demás proteínas de fusión virales, tales como las proteínas HA1/HA2 de *Influenza*, la proteína G de los *Rhabdovirus*, las proteínas gp41/gp120 del VIH.

Después, han construido unas proteínas F mutantes, que son capaces de fusogenicidad en ausencia de la proteína HN.

5 Las proteínas mutantes de la invención demuestran una fuerte capacidad de fusogenicidad y una fuerte autonomía. No necesitan la presencia de la proteína HN para inducir la fusión celular y la formación de sincitio.

Los inventores muestran además que es posible introducir en estas proteínas mutantes un sitio de escisión diferente del que presenta la proteína F en estado natural, y más particularmente un sitio de escisión específico del tejido.

10 Los inventores proponen además unas aplicaciones médicas (terapéuticas, preventivas, paliativas, pero también de diagnóstico) y/o biotecnológicas de las proteínas mutantes de la invención y/o de los productos que resultan o que derivan de ello.

15 Más particularmente, los inventores proponen utilizar las proteínas mutantes de la invención o los ácidos nucleicos que los codifican, para tratar, prevenir o paliar, por vía *in vivo* o por vía *ex vivo*, las enfermedades o disfunciones para las cuales se desea inducir o aumentar la formación de sincitio, tales como los cánceres, (más particularmente los cánceres metastáticos, preferiblemente los melanomas metastáticos) o las deficiencias del desarrollo placentario.

20 Los inventores proponen además unos agentes que bloquean la proteína F de PIV-5 y/o PIV-2, tales como unos anticuerpos, unas células dendríticas recombinantes, unos antisentidos, unas ARNsi, unos ácidos nucleicos aptámeros, para tratar, prevenir o paliar, por vía *in vivo* o por vía *ex vivo*, las enfermedades o disfunciones para las cuales se desea inhibir o bloquear la formación de sincitio, tales como las infecciones por virus con envoltura, las alergias, las enfermedades autoinmunes, los rechazos de injerto.

25 Los inventores proponen además unos medios de diagnóstico para detectar la formación excesiva, o por el contrario insuficiente, de sincitio.

Los inventores proponen además diferentes medios biotecnológicos para el cribado de principios activos capaces de disminuir la formación de sincitio.

30 Los inventores proponen además unas células cancerosas, más particularmente unos mielomas, que comprenden una proteína mutante de la invención. Los inventores proponen además unos hibridomas que comprenden una proteína mutante de la invención.

35 Las células cancerosas, más particularmente los mielomas de la invención, son capaces de fusionarse con otra célula, y más particularmente con un linfocito B, sin utilizar polietilenglicol (PEG), ni electroporación, ni ningún otro medio inductor de fusión. Las células cancerosas, más particularmente los mielomas de la invención, son capaces de fusión autónoma.

40 Los hibridomas de la invención pueden ser producidos por una fusión (de linfocitos B con mielomas) que no requiere la utilización de polietilenglicol (PEG), ni electroporación, ni ningún otro medio inductor de fusión. En efecto, los hibridomas de la invención pueden ser producidos utilizando al menos una célula cancerosa, más particularmente al menos un mieloma de la invención.

45 Los inventores proponen además unas células madres o progenitoras recombinantes, que expresan una proteína mutante de la invención, y sus aplicaciones en la producción de fibras musculares.

Otros aspectos de la invención se encuentran descritos en la parte "descripción detallada" más adelante.

50 Breve descripción de las figuras

El juego de figuras de la solicitud tal como se deposita, se ha depositado en colores. Es accesible mediante consulta en el dossier en la Oficina.

55 Figura 1A: secuencia de la proteína F de PIV-5 de referencia (SEC ID NO: 31; secuencia de la proteína F del aislado WR) y secuencia CDS correspondiente (SEC ID NO: 30; secuencia de ácidos nucleicos que codifican la proteína de la SEC ID NO: 31).

En negrita y subrayado dentro de la secuencia SEC ID NO: 31, se señalan los aminoácidos de las posiciones:

- 60
- 22 (L),
  - 49 (I),
  - 132 (E, mutación pre-existente en este aislado),
  - 147 (T);

65

    - 158 (T),
    - 290 (A, mutación pre-existente en este aislado),

- 402 (V),
- 443 (P, mutación teóricamente pre-existente en este aislado),
- 447 (L),
- 449 (I), y
- 463 (A).

Figura 1B: secuencia de la proteína F de PIV-2 de referencia (SEC ID NO: 33; secuencia de la proteína F del aislado Greer) y secuencia CDS correspondiente (SEC ID NO: 32; secuencia de ácidos nucleicos que codifican la proteína de la SEC ID NO: 33).

En negrita y subrayado dentro de la secuencia de SEC ID NO: 33, se señalan los aminoácidos de posiciones:

- 24 (I),
- 53 (I),
- 133 (K),
- 151 (T),
- 162 (S),
- 294 (I),
- 406 (A),
- 428 (S),
- 439 (S),
- 445 (I),
- 474 (S).

Figura 2A: alineación de la proteína F de PIV-5 (aminoácidos 4 a 529 de la SEC ID NO: 31) sobre la de PIV-2 (aminoácidos 8 a 533 de la SEC ID NO: 33); la identidad proteica es del 47,7% entre estas dos proteínas. La secuencia consenso resultante de esta alineación se referencia bajo la SEC ID NO: 34.

Figura 2B: aminoácido(s) y mutación(es) dentro de la proteína F de PIV-2, que corresponde a los de la proteína F de PIV-5

Figura 3: ilustración de la sustitución del sitio de escisión natural (SEC ID NO: 23) de la proteína F de PIV-5 por un sitio de escisión tejido-específico, en este caso por el sitio de una enzima expresada específicamente por el tejido metastático, a saber la metalo-proteasa matricial 9 (MMP-9).

Sitio consenso de un sitio MMP-9: secuencia de la SEC ID NO: 27 (sitio PXXhyS/T con X = cualquier aminoácido y Hy = cualquier aminoácido hidrófobo, es decir cualquier aminoácido de entre F, M, V, L, I).

Secuencia ilustrativa de un sitio MMP-9: secuencia de la SEC ID NO: 28, secuencia de la SEC ID NO: 29.

Figura 4: estructura del plásmido pcDNA3.1 en el que se ha clonado la secuencia que codifica la proteína F de PIV-5.

- Amp: gen de resistencia a la ampicilina
- pCMV: promotor del Citomegalovirus
- MCS: sitio de clonación múltiple (*Multiple Cloning Site*)
- F PIV5: proteína F de PIV-5
- BGHpolyA: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (*Bovine Growth Hormone polyA*)

Figuras 5A, 5B, 5C, 5D: visualización de las mutaciones realizadas por los inventores en la proteína F de PIV-5

Figura 6A: ilustración de las observaciones realizadas con microscopio durante ensayos de fusión semi-cuantitativos (grupo amplio de mutantes realizados por los inventores)

Figura 6B: diagrama que presenta los resultados de fusión obtenidos al final de los ensayos de fusión semi-cuantitativos (grupo amplio de mutantes realizados por los inventores)

Figura 7A: ilustración de las observaciones realizadas con microscopio durante ensayos de fusión semi-cuantitativos (grupo amplio de mutantes realizados por los inventores)

Figura 7B: diagrama que presenta los resultados de fusión obtenidos al final de los ensayos de fusión semi-cuantitativos (selección de mutantes realizados por los inventores)

Figuras 8A, 8B, 8C: resultados de los ensayos de fusión cuantitativos (selección de mutantes realizados por los inventores)

Figura 9: ilustraciones de las observaciones realizadas bajo inmunofluorescencia en microscopía confocal para proteínas mutantes de la invención que presentan un sitio de escisión diferente del sitio de escisión natural de la proteína F de PIV5 (proteínas mutantes Fus8M y Fus8.7M de la invención, que derivan de las proteínas mutantes Fus8 y Fus8.7 de la invención por sustitución del sitio de escisión natural por el sitio de escisión MMP-9 de SEC ID NO: 28).

Descripción detallada

En la presente solicitud, el término proteína incluye dentro de su alcance el término de glicoproteína. Este en particular el caso para las proteínas F y HN, que son en realidad unas glicoproteínas.

Proteína F de PIV-5 y PIV-2 (proteína no mutante):

Una secuencia de la proteína F de PIV-5 se presenta en la figura 1A (secuencia proteica de la SEC ID NO: 31; secuencia ácido nucleico codificante de la SEC ID NO: 30). Se trata de la secuencia del aislado WR, que es un aislado de simio. Estas secuencias son las disponibles en la base de datos Genbank bajo el número AB021962.

La muestra de aislado WR que los inventores han recibido de ATCC y que han utilizado para la construcción y la producción de las proteínas mutantes descritas en los ejemplos siguientes no presentaba sin embargo el aminoácido P en la posición 443 de la proteína F (al contrario de lo que se esperaba a la vista de la secuencia disponible en Genbank), sino el aminoácido S. Esta secuencia alternativa de la proteína F del aislado WR es por lo tanto idéntica a la secuencia

SEC ID NO: 31, con la excepción del aminoácido en la posición 443 que es S y no P. con fines de brevedad, esta secuencia alternativa se anotará aquí como "SEC ID NO: 31 con S en 443".

La secuencia de SEC ID NO: 31 y la secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", preferiblemente la secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443 ", sirven de referencia de secuencia(s) de la proteína F de PIV-5 en el ámbito de la presente solicitud de patente.

Dicho esto, existen por supuesto unos aislados de PIV-5 diferentes del aislado WR, y en particular:

- otros aislados de simios, tales como por ejemplo el aislado W3A,

- unos aislados de otros animales no humanos, tales como:

\* unos aislados caninos, por ejemplos los aislados caninos CPI+, CPI-, H221, 78524, T1,

\* unos aislados porcinos, por ejemplo el aislado porcino SER,

- unos aislados denominados "humanos" que proceden de extracciones efectuadas sobre seres humanos pero que han sido puestos en cultivo sobre células animales (véase la parte introductiva anterior), tales como el aislado MIL, el aislado DEN, el aislado LN, el aislado MEL, y el aislado que, en el documento WO 02 077211, está descrito como un "criptovirus".

Las variaciones de secuencias de las proteínas F de estos diferentes aislados PIV-5 son muy débiles.

Una descripción de estas variaciones se da en Chatziandreou *et al.* 2004, cuyo contenido, y más particularmente la tabla 3, y los comentarios que están asociados a ella durante este artículo, son incorporados como referencia en la presente solicitud de patente.

La tabla 3 de este artículo se reproduce aquí:

Tabla 1 (reproducida del artículo Chatziandreou *et al.* 2004):

Cepa													aa
W3A (SEC ID NO: 35)	WR (SEC ID NO: 31)	MIL (SEC ID NO: 36)	DEN (SEC ID NO: 37)	LN (SEC ID NO: 38)	MEL (SEC ID NO: 39)	Criptovirus (SEC ID NO: 40)	CPI+ (SEC ID NO: 41)	CPI- (SEC ID NO: 42)	H221 (SEC ID NO: 43)	78524 (SEC ID NO: 44)	T1 (SEC ID NO: 45)	SER (SEC ID NO: 46)	
G						S							2
T		I	I	I	I								3
I									R	R	R		4
F						S							7
A									S	S	T		17
S		G	G	G	G								19
P	L												22

ES 2 541 921 T3

Cepa													aa
W3A (SEC ID NO: 35)	WR (SEC ID NO: 31)	MIL (SEC ID NO: 36)	DEN (SEC ID NO: 37)	LN (SEC ID NO: 38)	MEL (SEC ID NO: 39)	Criptovirus (SEC ID NO: 40)	CPI+ (SEC ID NO: 41)	CPI- (SEC ID NO: 42)	H221 (SEC ID NO: 43)	78524 (SEC ID NO: 44)	T1 (SEC ID NO: 45)	SER (SEC ID NO: 46)	
S							P	P					71
V											M		76
N									Y	Y	Y		92
E							K	K	K	K	K	K	132
A						T							134
A									V	V	V		135
A												T	149
V						I							176
I				M									271
T								A					279
A											V		290
T							K	K					307
M						I	I	I	I	I	I	I	310
M					R								346
L				F									366
V												M	370
Y									F	F			377
M							I	I					407
Y						H	H	H					408
N						D							417
F							L	L					420
V											I		428
S						T	T	T	T	T	T	T	438
S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	443
H							N	N					451
I												M	489
L		F	F	F	F								498
L							S	S					500
V							A	A					507
K							R	R					510
V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	516
K		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	529
Stop	Stop	Q				S	S	S	S	S	S	S	530
		H					Y	Y					533
		S			Stop	P							535
		Q				R	R	R	R	R	R	R	536

aa: posición del aminoácido

En la tabla anterior, una casilla vacía indica que la proteína F en cuestión presenta el mismo aminoácido que la proteína F de la cepa W3A indicada en la columna de la izquierda.

- 5 Los aminoácidos cuyas posiciones no están expresamente listadas en esta tabla son por supuesto idénticos a los que les corresponden en la secuencia de la proteína F de W3A. Estos aminoácidos son en sí mismos idénticos a los que les corresponden en la secuencia de la proteína F del aislado WR (véase la secuencia de la SEC ID NO: 31).

- 10 Así, las secuencias de SEC ID NO: 35 a 46 son las secuencias que resultan de la sustitución en la secuencia de la SEC ID NO: 31 de los aminoácidos indicados en la tabla 1 para cada una de estas secuencias (y, llegado el caso, de la adición de la secuencia de la SEC ID NO: 31 de los aminoácidos indicados en la parte C-terminal).

La proteína F del aislado W3A, así como la de los otros aislados anteriormente mencionados, presenta:

- 15 - en la posición 147, el aminoácido T,  
 - en la posición 158, el aminoácido T,  
 - en la posición 447, el aminoácido L, y  
 - en la posición 449, el aminoácido I.
- 20 Se observa así que los aislados W3A y WR no presentan la extensión citoplásmica que, en los otros aislados, se extiende más allá de la posición 529. Según el aislado en cuestión, esta extensión citoplásmica contiene de dos a siete aminoácidos.
- 25 Se observa también que las secuencias de las proteínas F de estos aislados varían de menos del 5% (más particularmente, de como máximo el 3%) con respecto a la secuencia de la proteína F de la cepa WR (sin tener en

cuenta la extensión citoplásmica, es decir calculando este porcentaje sobre la longitud de la proteína F de WR); véase el final de la página 85 del artículo de Chatziandreou *et al.* 2004.

Una proteína F de PIV-5 puede por lo tanto consistir en:

- la secuencia de la SEC ID NO: 31, o dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", o en
- una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 31 o de esta secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", pudiendo esta secuencia variante estar definida por:

\* ser de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 31 o inferior de un máximo de 7 aminoácidos de la SEC ID NO: 31 o superior de un máximo de 7 aminoácidos a la de la SEC ID NO: 31 [dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443" presenta el mismo tamaño que la secuencia de la SEC ID NO: 31], preferiblemente de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 31 o superior de un máximo de 7 aminoácidos a la de la SEC ID NO: 31, y

\* presentar una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 31 o a dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443" (siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 31 o, llegado el caso, de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443").

Las secuencias variantes de la proteína F de PIV-5 de SEC ID NO: 31 comprenden en particular las secuencias de las proteínas F de los aislados W3A, MIL, DEN, LN, MEL, criptovirus, CPI+, CPI-, H221, 78524, T1 y SER mencionados antes (véase la tabla 1 anterior y el artículo de Chatziandreou *et al.* 2004).

De manera similar, la secuencia que, en la presente solicitud, sirve de referencia para la proteína F de PIV-2 es la secuencia de la cepa Greer que se representa en la figura 1B (secuencia proteica de la SEC ID NO: 33, secuencia ácido nucleico que codifica la SEC ID NO: 32).

Por supuesto, existen unos aislados PIV-2 diferentes del aislado Greer, tales como por ejemplo los aislados Toshiba, V98, V94.

La secuencia de la proteína F de estos otros aislados PIV-2 está muy próxima de la del aislado Greer, pero presenta algunas pequeñas variaciones que son unas variaciones inter-aislados. Así, una proteína F de PIV-2 puede por lo tanto consistir en:

- la secuencia de la SEC ID NO: 33, o en
- una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 33, pudiendo esta secuencia variante ser definida por:

\* ser de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33 o inferior en un máximo de dos aminoácidos al de la SEC ID NO: 33 o superior en un máximo de dos aminoácidos al de la SEC ID NO: 33, preferiblemente de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33, siendo preferiblemente de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33, y

\* presentar una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 33 (siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 33).

La secuencia consenso (SEC ID NO: 34) que resulta del alineamiento de la secuencia de la proteína F de PIV-5 (SEC ID NO: 31) sobre la de PIV-2 (SEC ID NO: 33) es la siguiente, y se puede leer en la figura 2A. Esta secuencia consenso puede ser retranscrita de la siguiente manera:

I---V-----G-----L-IGVI---R-LMYYT-----FIVVKL  
 -P-----CNITS---YN-T--KLL-P---ENL--I-----R-RF  
 AGVV-GLAALGVATAAQ-TAAVA-VKAN-NAAAI-NL---IQ-TN-AV-D  
 V-A-----TAVQA-QD-IN-----IT-A-C-A-DA-IGSILNLYLTEL  
 TTIFHNQITNPAL-P-IQALRILLGSTLP-V-E---NT----AELLSSG  
 LLTGQI-----YMQM-I-I-PT----QP----IDL---ISA----QEV--  
 Q-P-R-----Q-YPA—C--TPN-V-CRYN-----CL-GNL  
 --CTF-P--G-FL-RF---G--YANC-S-LC-C—P—V--Q-----  
 -ID--C---LD--F-IT--N-TY-----I---PLD-S---  
 ---NKSL--A---A-S-----A-T---LS-IA-L-----L---L  
 L-----KL-----R-----H-(SEC ID NO: 34),

Indicando el símbolo "-" que las proteínas F de PIV-5 y de PIV-2 tienen en esta posición unos aminoácidos diferentes.

5

Esta secuencia consenso puede también ser formalizada de la siguiente manera:

IXXXVXXXXXXXXGXXXXXXXXLXXIGVIXXXRXLMYYTXXXXXFIVVKL  
 XPXXXXXXXXCNITSXXYNXTXXKLLXPXXENLXXIXXXXXXXXXXXRFR  
 AGVVXGLAALGVATAAQXTAAVAVKANXNAAIXNLXXIXQXTNXAVXD  
 VXXXXXXXXXTAVQAXQDXINXXXXXXXXITXAXCXAXDAXIGSILNLYLTEL  
 TTIFHNQITNPALXPVXIQALRILLGSTLPXVXEXXXNTXXXXAELLSSG  
 LLTGQIXXXXXXXXXYMQMXIXIXPTXXXXQPXXXXIDLXXISAXXXXQEVXX  
 QXPXXXXXXXXXXQYPAXXCXXTPNXVXCRYNXXXXXXXXXXXXCLXGNL  
 XXCTFXPXXGXFLXRFXXXXGXXYANCXSXLCXCXXPXXVXXQXXXXXXXX  
 XIXXXCXXXXLDXXXFXITXXNXTYXXXXXXXXXXXXIXXXPLDXSXXX  
 XXXNKSLXXAXXXXAXSXXXXXXXXXXAXTXXXLSXIXLXXXXLXXXXL  
 LXXXXXKLXXXXXXXXRXXXXXXXXHX (SEC ID NO: 34),

10

con X = cualquier aminoácido.

15

La secuencia de la proteína F del aislado WR de PIV-5 es la secuencia de la SEC ID NO: 34 precedida de los aminoácidos MGT en el extremo N-terminal (véanse las figuras 1A y 2A).

20

La secuencia de la proteína F del aislado Greer de PIV-2 es la secuencia de la SEC ID NO: 34, precedida de los aminoácidos MHHLHPM (SEC ID NO: 86) en el extremo N-terminal y seguida de los aminoácidos ENPAFFSKNNHGNIYGIS (SEC ID NO: 87) en el extremo C-terminal (véanse las figuras 1B y 2A).

25

La secuencia de las proteínas F de PIV-5 y PIV-2 se puede considerar como una secuencia que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 34, preferiblemente como la secuencia de una proteína F de virus PIV que comprende la secuencia de SEC ID NO: 34. Más particularmente, la secuencia de las proteínas F de PIV-5 y PIV-2 se puede considerar como:

a) la secuencia de la SEC ID NO: 34:

- precedida de 3 a 7 aminoácidos en el extremo N-terminal, más particularmente de 3 aminoácidos (tales como MGT) o de 7 aminoácidos (tales como MHHLHPM) en el extremo N-terminal, y

30

- eventualmente seguida de 18 aminoácidos en el extremo C-terminal, más particularmente de los aminoácidos ENPAFFSKNNHGNIYGIS en el extremo C-terminal, o

b) una secuencia variante de la secuencia descrita en a) anteriormente, siendo dicha secuencia variante:

- o bien:

i. de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 31 o inferior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31 o superior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31, preferiblemente de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 31 o superior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31, y

ii. que presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 31 o a dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443" (siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 31 o, llegado el caso, de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443");

- o bien:

i. de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33 o inferior en un máximo de dos aminoácidos al de la SEC ID NO: 33 o superior en un máximo de dos aminoácidos al de la SEC ID NO: 33, preferiblemente de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33, y

ii. que presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 33 (siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 33).

#### Proteínas mutantes de la invención:

La presente solicitud se refiere a una proteína mutante, cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia que es susceptible de derivar de la de la proteína F de un virus PIV-5 o PIV-2:

- por sustitución:

- del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 22, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 24, por el aminoácido P (mutación 22P en F de PIV-5; mutación 24P en F de PIV-2), y

- del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 132, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 133 (mutación 132E en F de PIV-5; mutación 133E en F de PIV-2), por el aminoácido E, y

- del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 290, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 294, por el aminoácido A (mutación 290A en F de PIV-5; mutación 294A en F de PIV-2), y

- del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 449, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 439, por el aminoácido P (mutación 449P en F de PIV-5; mutación 439P en F de PIV-2),

- y, opcionalmente:

- por sustitución del sitio de escisión nativo (o natural) de dicha proteína F por otro sitio de escisión enzimática, y/o por inserción en dicha proteína F de un sitio de escisión enzimático diferente del sitio de escisión nativo (o natural) de esta proteína F, y/o

- por supresión de una parte C-terminal de dicha proteína F, extendiéndose dicha parte C-terminal en dirección N-terminal a partir del último aminoácido en el extremo C-terminal de la proteína, pero sin extenderse más allá del dominio HR2 de dicha proteína F.

Dichas posiciones de aminoácidos se calculan con respecto a la secuencia de la forma precursora (F0) de dicha proteína F (es decir la secuencia de la proteína F antes de la escisión), contando las posiciones del extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal.

Las posiciones indicadas en la proteína F de PIV-2 son las posiciones que corresponden a las indicadas en la proteína F de PIV-5: véase la figura 2B, que da la tabla de las correspondencias de posiciones.

La secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5 o PIV-2 es tal como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, se puede definir como que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 34 (secuencia consenso de las proteínas F de PIV-5 y PIV-2).

5 *Proteína mutante de la proteína F de PIV-5:*

Según un aspecto de la invención, una proteína mutante de la invención comprende una secuencia que es susceptible de derivar de la de la proteína F de un virus PIV-5.

10 La secuencia de dicha proteína F de PIV-5 es tal como se ha definido anteriormente. Puede consistir en particular en:

- la secuencia de la SEC ID NO: 31 (secuencia de la proteína F del aislado WR de PIV-5 presentada en la figura 1A), o de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", o en

15 - una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 31 o de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", esta secuencia variante:

20 \* es de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 31 (es decir que consiste en 529 aminoácidos), o es de un tamaño superior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31 (es decir que consiste en 530, 531, 532, 533, 534, 535 o 536 aminoácidos), o es de un tamaño inferior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31 (es decir que consiste en 522, 523, 524, 525, 526, 527 o 528 aminoácidos), y

25 \* presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 31 o a dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 31 o (llegado el caso) de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443".

Preferentemente, la secuencia de dicha proteína F de PIV-5 consiste en:

30 - la secuencia de la SEC ID NO: 31 (secuencia de la proteína F del aislado WR de PIV-5 presentada en la figura 1A), o dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", o en

35 - una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 31 o de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", esta secuencia variante:

40 \* es de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 31 (es decir que consiste en 529 aminoácidos), o es de un tamaño superior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31 (es decir que consiste en 530, 531, 532, 533, 534, 535 o 536 aminoácidos), y

45 \* presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 31 o a dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 31, o, llegado el caso, de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443".

Unos ejemplos de tales secuencias variantes comprenden en particular la secuencia de la proteína F de uno de los aislados W3A, MIL, DEN, LN, MEL, Criptovirus, CPI+, CPI-, H221, 78524, T1 y SER presentada en la tabla 1 en la presente solicitud (véase anteriormente), es decir en una de las secuencias de la SEC ID NO: 35 a 46.

50 Preferentemente, la secuencia de dicha proteína F de PIV-5 consiste en la secuencia de la SEC ID NO: 31 (secuencia de la proteína F del aislado WR de PIV-5 presentada en la figura 1A), o en dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", muy preferiblemente en dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443".

55 Dicha secuencia susceptible de derivar de la de la proteína F de PIV-5 puede no comprender mutación diferente que las mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes, con respecto a dicha secuencia de la proteína F de PIV-5. Es el caso en particular de la secuencia de la SEC ID NO: 65 (Fus8).

60 Alternativamente, dicha secuencia susceptible de derivar de la de la proteína F de PIV-5 puede ser susceptible de derivar de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes y por al menos una mutación diferente de estas mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes, preferiblemente por:

- al menos una mutación de pre-fusión seleccionada de entre:

65 - la sustitución del aminoácido en la posición 49 por el aminoácido A,  
- la sustitución del aminoácido en la posición 402 por el aminoácido A,

## ES 2 541 921 T3

- la sustitución del aminoácido en la posición 443 por el aminoácido P,
- la sustitución del aminoácido en la posición 447 por el aminoácido P, y/o por

5

- al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

- la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo.

10

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F de PIV-5, es susceptible de derivar de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes, y por:

- al menos una mutación de pre-fusión seleccionada de entre:

15

- la sustitución del aminoácido en la posición 49 por el aminoácido A,
- la sustitución del aminoácido en la posición 402 por el aminoácido A, y/o par

- al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

20

- la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo.

Dicho aminoácido hidrófobo se selecciona ventajosamente de entre V, I, L, preferiblemente V.

25

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F de PIV-5, es susceptible de derivar de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes, y por:

- al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

30

- la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo;

y

35

- al menos otra mutación de post-fusión, a saber la sustitución del aminoácido en la posición 463 por un aminoácido hidrófobo, preferentemente V, I o L, más preferiblemente V.

40

Tal secuencia susceptible de derivar de la de dicha proteína F puede ser en particular una secuencia seleccionada de entre las secuencias de las SEC ID NO: 67 a 79 (Fus10, Fus10.4, Fus10.5, Fus 11, Fus8.1, Fus8.2, Fus8.4, Fus8.5, Fus8.6, Fus8.7, Fus10.1, Fus10.2, Fus10.3, respectivamente); véase la tabla 4 más adelante.

45

Preferentemente, dicha secuencia susceptible de derivar de la de dicha proteína F de PIV-5 es susceptible de derivar de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes, y por al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

- la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo.

50

Tal secuencia susceptible de derivar de la de dicha proteína F puede ser en particular una secuencia seleccionada de entre las secuencias de las SEC ID NO: 68 a 79 (Fus10.4, Fus10.5, Fus 11, Fus8.1, Fus8.2, Fus8.4, Fus8.5, Fus8.6, Fus8.7, Fus10.1, Fus10.2, Fus10.3, respectivamente); véase la tabla 4 más adelante.

55

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F de PIV-5, es susceptible de derivar de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes, y por:

- al menos una mutación de pre-fusión seleccionada de entre:

60

- la sustitución del aminoácido en la posición 49 por el aminoácido A,
- la sustitución del aminoácido en la posición 402 por el aminoácido A,

y por

65

- al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

- la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo.

5 Tal secuencia susceptible de derivar de la de dicha proteína F puede ser en particular una secuencia seleccionada de entre las secuencias de SEC ID NO: 68, 69, 70 (Fus10.4, Fus10.5, Fus 11, respectivamente); véase la tabla 4 más adelante.

10 Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F de PIV-5, es susceptible de derivar de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 22P, 132E, 290A, 449P mencionadas antes, y por las dos mutaciones de post-fusión, es decir por:

- la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo.

15 Tal secuencia susceptible de derivar de la de dicha proteína F puede ser en particular una secuencia seleccionada de entre las secuencias de SEC ID NO: 76, 78 (Fus8.7, Fus10.2, respectivamente); véase la tabla 4 más adelante.

Tabla 4: selección de las proteínas mutantes de la invención (proteínas mutantes de la proteína F de PIV-5)

N° de Fus	Resultado de fusión (véase la figura 6B)	SEC ID NO:	Mutación(es) adicional(es) además de las tres mutaciones de autonomía (22P, 132E, 290A) y de la mutación de pre-fusión 449P	
			Pre-fusión	Post-fusión
8	Aproximadamente 7	65	-	-
10	Aproximadamente 6	67	49 <sup>a</sup>	-
10.4	Aproximadamente 7	68	402A	147V, 158V, 463V
10.5	Aproximadamente 7,5	69	49A, 402A	147V, 158V, 463V
11	Aproximadamente 7,5	70	402A	-
8.1	Aproximadamente 6,5	71	-	147V
8.2	Aproximadamente 6,5	72	-	158V
8.4	Aproximadamente 7,5	73		147V, 158V
8.5	Aproximadamente 6,5	74		147V, 463V
8.6	Aproximadamente 6	75		158V, 463V
8.7	Aproximadamente 9	76		147V, 158V, 463V
10.1	Aproximadamente 5	77		158V
10.2	Aproximadamente 7	78		147V, 158V
10.3	Aproximadamente 6,5	79		147V, 158V, 463V

20 Las mutaciones indicadas en la tabla 4 se pueden introducir en la proteína F de cualquier aislado PIV-5, es decir del aislado WR o de un aislado variante.

25 Por lo tanto, se pueden introducir más particularmente en la secuencia de la proteína F de la SEC ID NO: 31 presentada en la figura 1A (proteína F de WR disponible en la base de datos de Genbank bajo el número AB021962).

30 Como se ha indicado anteriormente, la muestra del aislado WR que los inventores han recibido de ATCC y que han utilizado para la construcción y la producción de las proteínas mutantes descritas en los ejemplos siguientes no presentaba sin embargo el aminoácido P en la posición 443 de la proteína F (contrariamente a lo que se esperaba a la vista de la secuencia disponible en Genbank), sino el aminoácido S. Las mutaciones indicadas en la tabla 4 pueden por lo tanto ser introducidas en dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443" (SEC ID NO: 65, 67 a 79).

35 *Proteína mutante de la proteína F de PIV-2:*

Según otro aspecto de la invención, una proteína mutante de la invención comprende una secuencia que es susceptible de derivar de la de la proteína F de un virus PIV-2.

40 La secuencia de dicha proteína F de PIV-2 es tal como se ha definido anteriormente. Puede consistir en particular en:

- la secuencia de la SEC ID NO: 33 (secuencia de la proteína F del aislado Greer de PIV-2 presentada en la figura 1B), o en

45 - una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 33, esta secuencia variante:

\* es de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33 (es decir que consiste en 551 aminoácidos), o es de un tamaño superior en un máximo de 2 aminoácidos al de la SEC ID NO: 33 (es decir que consiste en 552 o 553 aminoácidos), o es de un tamaño inferior en un máximo de 2 aminoácidos al de la SEC ID NO: 33 (es decir que consiste en 549 o 550 aminoácidos), y

5 \* presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 33, siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 33.

10 Preferentemente, la secuencia de dicha proteína F de PIV-2 consiste en:

- la secuencia de la SEC ID NO: 33 (secuencia de la proteína F del aislado Greer de PIV-2 presentada en la figura 1B), o en

15 - una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 33, esta secuencia variante:

\* es de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33 (es decir que consiste en 551 aminoácidos), o es de un tamaño superior en un máximo de 2 aminoácidos al de la SEC ID NO: 33 (es decir que consiste en 552 o 553 aminoácidos), y

20 \* presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 33, siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 33.

25 Más preferiblemente, la secuencia de dicha proteína F de PIV-2 consiste en:

- la secuencia de la SEC ID NO: 33 (secuencia de la proteína F del aislado Greer de PIV-2 presentada en la figura 1B), o en

30 - una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 33, esta secuencia variante:

\* es de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33 (es decir, que consiste en 551 aminoácidos), y

35 \* presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 33, siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de SEC ID NO: 33.

Muy preferiblemente, la secuencia de dicha proteína F consiste en la secuencia de la SEC ID NO: 33 (secuencia de la proteína F del aislado Greer de PIV-2 presentada en la figura 1B).

40 Dicha secuencia susceptible de derivar de la de la proteína F de PIV-2 puede no comprender una mutación diferente de las mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas anteriormente, con respecto a dicha secuencia de la proteína F de PIV-2. Este es por ejemplo el caso de la proteína mutante que comprende o que consiste en la secuencia de la SEC ID NO: 90.

45 Alternativamente, dicha secuencia susceptible de derivar de la de la proteína F de PIV-2 puede ser susceptible de derivar de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas anteriormente y por al menos una mutación diferente de estas mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas antes, preferiblemente por:

50 - al menos una mutación de pre-fusión seleccionada de entre:

- la sustitución del aminoácido en la posición 53 por el aminoácido A,
- la sustitución del aminoácido en la posición 406 por el aminoácido A,
- 55 - la sustitución del aminoácido en la posición 428 por el aminoácido P,
- la sustitución del aminoácido en la posición 445 por el aminoácido P,

y/o por

60 - al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

- la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo.

65 Este es por ejemplo el caso de la proteína mutante que comprende una de las secuencias de las SEC ID NO: 91 a 103 (o que consiste en una de estas secuencias).

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F deriva de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas anteriormente y por:

- 5 - al menos una mutación de pre-fusión seleccionada de entre:
- la sustitución del aminoácido en la posición 53 por el aminoácido A,
  - la sustitución del aminoácido en la posición 406 por el aminoácido A,

10 y/o por

- al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:
- 15 - la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,  
- la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo.

Este es por ejemplo el caso de la proteína mutante que comprende una de las secuencias de las SEC ID NO: 91 a 103 (o que consiste en una de estas secuencias).

20 Ventajosamente, dicho aminoácido hidrófobo se selecciona de entre V, I, L, preferiblemente V.

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F, deriva de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas anteriormente y por:

- 25 - al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:
- la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,
  - la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo;

30 y

- al menos otra mutación de post-fusión, a saber la sustitución del aminoácido en la posición 474 por un aminoácido hidrófobo, preferentemente V, I o L, más preferiblemente V.

35 Este es por ejemplo el caso de la proteína mutante que comprende una de las secuencias de las SEC ID NO: 92, 93, 98, 99, 100, 103 (o que consiste en una de estas secuencias).

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F, deriva de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas anteriormente y por al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

- 40 - la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,  
- la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo.

45 Este es por ejemplo el caso de la proteína mutante que comprende una de las secuencias de las SEC ID NO: 92, 93 y 94 a 103 (o que consiste en una de estas secuencias).

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F, deriva de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas anteriormente, y por:

- 50 - al menos una mutación de pre-fusión seleccionada de entre:
- la sustitución del aminoácido en la posición 53 por el aminoácido A,
  - la sustitución del aminoácido en la posición 406 por el aminoácido A,

55 y por

- al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:
- 60 - la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,  
- la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo.

Este es por ejemplo el caso de la proteína mutante que comprende una de las secuencias de las SEC ID NO: 92, 93 (o que consiste en una de estas secuencias).

65

Preferentemente, dicha secuencia, que es susceptible de derivar de la de dicha proteína F, deriva de esta secuencia de la proteína F por dichas mutaciones 24P, 133E, 294A, 439P mencionadas anteriormente y por las dos mutaciones de post-fusión, es decir por:

- 5 - la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,
- la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo.

Este es por ejemplo el caso de la proteína mutante que comprende una de las secuencias de las SEC ID NO: 92, 93, 97, 100, 102, 103 (o que consiste en una de estas secuencias).

10 La presente solicitud se refiere más particularmente a las proteínas mutantes de la proteína F de PIV-2 que corresponden a las presentadas en la tabla 4 anterior para PIV-5, teniendo en cuenta que, como se indica en la figura 2B:

- 15 - la mutación 49A de F PIV-5 corresponde a la mutación 53A en F PIV-2,
- la mutación 402A de F PIV-5 corresponde a 406A en F PIV-2,
- la mutación 147V de F PIV-5 corresponde a 151V en F HIV-2,
- la mutación 158V de F PIV-5 corresponde a 162V en F PIV-2,
- 20 - la mutación 463V de F PIV-5 corresponde a 474V en F PIV-2.

Tabla 5: selección de las proteínas mutantes de la invención (proteínas mutantes de la proteína F de PIV-2)

SEC ID NO:	Mutación(es) adicional(es) además de las tres mutaciones de autonomía (24P, 133E, 294A) y de la mutación de pre-fusión 439P	
	Pre-fusión	Post-fusión
90	-	-
91	53A	-
92	406A	151V, 162V, 474V
93	53A, 406A	151V, 162V, 474V
94	406A	-
95	-	151V
96	-	162V
97		151V, 162V
98		151V, 474V
99		162V, 474V
100		151V, 162V, 474V
101		162V
102		151V, 162V
103		151V, 162V, 474V

25 La mutaciones indicadas en la tabla 5 se pueden introducir en la proteína F de cualquier aislado PIV-2, es decir del aislado Greer o de un aislado variante. Por lo tanto, pueden ser más particularmente introducidas en la secuencia de la proteína F de la SEC ID NO: 33 presentada en la figura 1B (proteína F de Greer; SEC ID NO: 90 a 103).

*Sitio de escisión:*

30 Conforme a la presente invención, una proteína mutante de la invención puede comprender una secuencia que es susceptible de derivar de la de la proteína F de un virus PIV-5 o PIV-2 por:

- las mutaciones mencionadas anteriormente, y además por

35 - sustitución del sitio de escisión nativo de dicha proteína F por otro sitio de escisión enzimática, y/o por inserción en dicha proteína F de un sitio de escisión enzimática diferente del sitio de escisión nativo de esta proteína F, preferentemente por sustitución del sitio de escisión nativo de dicha proteína F por otro sitio de escisión enzimática.

40 El sitio de escisión de una proteína F de PIV-5 o PIV-2 es el sitio de escisión de las dos subunidades (F1 y F2) de esta proteína F; véase la figura 9 para una ilustración sobre la proteína F de PIV-5.

En la forma nativa de la proteína F de PIV-5 y PIV-2, este sitio de escisión es un sitio escindido por furinas.

45 En la forma nativa de la proteína F de PIV-5, este sitio de escisión consiste en la secuencia RRRRR (SEC ID NO: 23). Se sitúa en las posiciones 98 a 102 de la forma nativa de la proteína F de PIV-5 (véase la figura 1A; véase la figura 9). Un ejemplo de fragmento de secuencia de la proteína F de PIV-5 que comprende el sitio de escisión nativo (o natural) de la proteína F de PIV-5 es: IGENLETIRNQLIPTRRRRRRFRAGVVIGL (SEC ID NO: 24).

En la forma nativa de la proteína F de PIV-2, el sitio de escisión consiste en la secuencia KTRQKR (SEC ID NO: 25). Se sitúa en las posiciones 101 a 106 de la forma nativa de la proteína F de PIV-2 (véase la figura 1B). Un ejemplo de fragmento de secuencia de la proteína F de PIV-2 que comprende el sitio de escisión nativo (o natural) de la proteína F de PIV-2 es LTPLIENLSKISTVTDKTRQKR FAGVVVGLAALGVA (SEC ID NO: 26).

5 Preferentemente, dicho sitio de escisión diferente del sitio de escisión nativo es un sitio de escisión específico de tejido.

10 Preferentemente, dicho sitio de escisión diferente del sitio de escisión nativo es un sitio de escisión para una enzima expresada específicamente por uno o más tejidos tumorales, muy preferiblemente un sitio de escisión para una enzima expresada específicamente por uno o más tejidos metastásicos.

15 Por ejemplo, dicho sitio de escisión diferente del sitio de escisión nativo puede ser un sitio de escisión para una metalo-proteasa, tal como el sitio de escisión para la metalo-proteasa matricial 9 (MMP-9); véase el ejemplo 2 siguiente.

20 Un sitio de escisión para la metalo-proteasa matricial 9 (MMP-9) puede comprender o consistir en la secuencia PXXHyS/T (SEC ID NO: 27) con X = cualquier aminoácido, y con Hy = cualquier aminoácido hidrófobo (es decir cualquier aminoácido de entre F, M, V, L, I).

Por ejemplo, un sitio de escisión para la metalo-proteasa matricial 9 (MMP-9) puede comprender o consistir en la secuencia PRRIT (SEC ID NO: 28) y/o la secuencia IGENLETIRNQLIPTPRRITFAGVVIGL (SEC ID NO: 29).

25 Unos ejemplos de proteínas mutantes de la invención que comprenden tal sitio de escisión (por sustitución del sitio de escisión nativo) comprenden las proteínas mutantes cuya secuencia susceptible de derivar de la proteína F (de PIV-5) es la secuencia de la SEC ID NO: 88 o 89 (Fus8M y Fus8.7M, respectivamente; véase el ejemplo 2 siguiente).

30 Ácidos nucleicos de la invención:

La presente solicitud se refiere también a un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una proteína mutante según la invención (según el código genético universal y teniendo en cuenta la degeneración de este código), y a un ácido nucleico complementario de tal ácido nucleico (ácido nucleico de misma longitud perfectamente complementaria).

35 Tales ácidos nucleicos derivan de la secuencia de la SEC ID NO: 30 (secuencia que codifica la proteína F de PIV-5 nativa), o de una secuencia alternativa que codifica dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", o de una secuencia variante que codifica una proteína F variante, o bien de la secuencia de la SEC ID NO: 32 (secuencia que codifica la proteína F de PIV-2 nativa) o de una secuencia variante que codifica una proteína F variante.

40 Vectores de la invención:

La presente solicitud se refiere también a un vector de ácido nucleico, más particularmente a un vector de transfección, transducción o transformación, que comprende al menos un ácido nucleico según la invención.

45 Tal vector puede ser ventajosamente un vector de expresión.

Preferentemente, se trata de un vector que permite la expresión de dicho al menos un ácido nucleico en una célula animal (célula animal no humana y/o célula humana), más preferiblemente:

50 - en una célula humana, ventajosamente en una célula humana patológica, más particularmente una célula humana tumoral, más preferiblemente una célula de melanoma metastática, o

- en una célula placentaria.

55 Tal vector de expresión puede ser ventajosamente un vector adenoviral.

Este vector adenoviral puede comprender unos elementos de regulación de la expresión de dicho ácido nucleico, preferiblemente un promotor, que permite una expresión de dicho ácido nucleico en células tumorales, preferentemente en células metastásicas, más preferiblemente en células de melanoma metastásicas.

60 Preferentemente, esta expresión es específica. Ventajosamente, esta expresión es suficientemente específica para permitir la expresión de dicho ácido nucleico en dichas células tumorales o metastásicas, sin que haya por tanto expresión significativa en células no tumorales (incluso no-metastásicas).

65 Ventajosamente, tal vector adenoviral es un vector adenoviral oncolítico.

Alternativamente, un vector de expresión de la invención puede ser un vector adenoviral que comprende unos elementos de regulación de la expresión de dicho ácido nucleico, preferiblemente un promotor, que permite una expresión de dicho ácido nucleico en células placentarias, preferentemente en células placentarias patológicas que presentan una insuficiencia de fusogenicidad.

5 Preferentemente, esta expresión es específica. Ventajosamente, esta expresión es suficientemente específica para permitir la expresión de dicho ácido nucleico en dichas células placentarias, sin que haya por tanto expresión significativa en células no placentarias.

10 Un vector de la invención puede alternativa o complementariamente ser un vector que permite la inserción de dicho al menos un ácido nucleico en el genoma de una célula animal (célula animal no humana y/o célula humana), más preferiblemente de una célula humana, ventajosamente de una célula humana patológica, más particularmente de una célula humana tumoral, preferiblemente una célula humana metastásica, más preferiblemente en células de melanoma metastásicas. Tal vector está más particularmente destinado a la terapia génica de los tumores, particularmente de los tumores metastásicos, más particularmente de los melanomas metastásicos.

15 La presente solicitud se refiere también a un vector que comprende al menos un ácido nucleico de la invención, y que permite la inserción de dicho al menos un ácido nucleico en el genoma de una célula animal (célula animal no humana y/o célula humana), más preferiblemente de una célula humana, ventajosamente de una célula placentaria, preferiblemente una célula placentaria humana. Tal vector está más particularmente destinado a la terapia génica de las enfermedades o estados que impliquen una deficiencia del desarrollo placentario.

#### Células de la invención:

25 La presente solicitud se refiere también a una célula, que comprende al menos una proteína mutante según la invención, y/o al menos un ácido nucleico, ADN o ARN según la invención, y/o al menos un vector según la invención.

30 Tal célula puede ser una célula humana o una célula animal no humana.

Preferentemente, tal célula es una célula tumoral, preferiblemente una célula metastásica, más preferiblemente una célula de melanoma metastásica.

35 Tal célula encuentra en particular unas aplicaciones como célula de capacidad fusogénica capaz de inducir la formación de sincitio, tal como se describe a continuación.

40 Alternativamente, una célula de la invención puede ser una célula no tumoral del sistema inmunitario humano o animal no humano, preferiblemente una célula dendrítica no tumoral humana o animal no humana, expresando dicha célula en su superficie al menos una proteína mutante según la invención. Tal célula encuentra en particular aplicaciones como agente capaz de inducir la producción de inhibidor de la fusión celular, por ejemplo por inmunización activa, tal como se describe a continuación.

#### Aplicaciones médicas (pro-fusión):

45 Una proteína mutante de la invención, y/o un ácido nucleico, ADN o ARN de la invención, y/o un vector de la invención, y/o una célula de la invención, pueden ser utilizados en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique la presencia y/o la proliferación de células patológicas y/o no favorables al estado de salud del organismo, más particularmente en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique una insuficiencia de fusogenicidad celular, preferiblemente en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado neoplásico, tal como un tumor, un tumor metastásico, ventajosamente un melanoma metastásico.

50 Tales enfermedades o estados pueden ser tratados y/o prevenidos y/o paliados por disminución o supresión de estas células patológicas y/o no favorables.

55 Una proteína mutante de la invención expresada en la superficie de tales células inducirá la fusión de estas células, y a continuación la formación de sincitio, que conduce a la destrucción (o por lo menos a la disminución del número) de estas células.

60 Una proteína mutante de la invención, y/o un ácido nucleico, ADN o ARN de la invención, y/o un vector de la invención, y/o una célula de la invención, se pueden utilizar en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique una deficiencia del desarrollo placentario.

65 Tales enfermedades o estados pueden ser tratados y/o prevenidos y/o paliados por inducción o estimulación de la fusión celular placentaria.

La presente solicitud se refiere por lo tanto también a una composición farmacéutica o a un medicamento que comprende al menos una proteína mutante de la invención y/o al menos un ácido nucleico, ADN, ARN de la invención, y/o al menos un vector de la invención y/o una célula de la invención.

5 Tal composición farmacéutica o tal medicamento puede, en particular, estar destinado al tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique la presencia y/o la proliferación de células patológicas y/o no favorables al estado de salud del organismo, tal como se ha indicado anteriormente (por ejemplo, tumor, tumor metastásico, melanoma metastásico), o al tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique una insuficiencia de fusogenicidad celular (por ejemplo, deficiencia del desarrollo placentario).

Tal composición farmacéutica o tal medicamento pueden comprender además al menos un vehículo farmacéutica y/o fisiológicamente aceptable.

15 Una proteína mutante de la invención (o un ácido nucleico, ADN, ARN, o un vector de expresión de la invención), se puede utilizar para ser expresada por una célula humana o una célula animal no humana, preferiblemente para ser expresada en la superficie de tal célula.

20 Esta célula puede ser una célula patológica, preferiblemente una célula tumoral, más preferiblemente una célula metastásica, más preferiblemente una célula de melanoma metastásico, o puede ser una célula no-tumoral, por ejemplo una célula sana.

25 Más particularmente, unas células patológicas que han sido extraídas de un paciente humano o de un sujeto animal no-humano enfermo, pueden ser tratadas *ex vivo* (o *in vitro*) mediante la puesta en contacto con al menos una proteína mutante de la invención y/o al menos un ácido nucleico, ADN o ARN de la invención y/o al menos un vector de expresión de la invención a fin de hacerle expresar una proteína mutante de la invención.

30 Alternativa o complementariamente, unas células no patológicas pero localizadas cerca de las células patológicas del paciente o sujeto pueden ser extraídas para someterlas a este tratamiento.

Las células así tratadas *ex vivo* (o *in vitro*) pueden entonces estar destinadas a ser re-administradas a dicho paciente o sujeto.

35 Tales células son útiles para el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de la patología que padece dicho paciente o sujeto, por ejemplo un tumor, un tumor metastásico o un melanoma metastásico.

40 Alternativamente, esta célula puede ser una célula placentaria, más particularmente una célula placentaria que sufre una insuficiencia de fusogenicidad. Una vez tratada por expresión de una proteína mutante de la invención en su superficie, tal célula puede estar destinada al tratamiento y/o a la prevención y/o a la paliación de una deficiencia del desarrollo placentario.

45 La presente solicitud se refiere por lo tanto más particularmente a una proteína mutante según la invención, a un ácido nucleico, ADN o ARN según la invención, a un vector según la invención, a una célula según la invención, para una utilización en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado neoplásico, preferiblemente de un tumor, más preferiblemente de un tumor metastásico, muy preferiblemente de un melanoma metastásico.

50 La presente solicitud se refiere también más particularmente a una proteína mutante según la invención, a un ácido nucleico, ADN o ARN según la invención, a un vector según la invención, a una célula según la invención, para una utilización en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una deficiencia del desarrollo placentario.

Inhibidores de fusión según la invención:

55 La presente solicitud se refiere también a unos productos que tienen la capacidad de disminuir o bloquear la fusión celular. Estos productos son unos inhibidores de una o varias proteínas mutantes de la invención.

60 Tales inhibidores se pueden utilizar en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, preferiblemente en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una infección por virus con envoltura (tal como una infección por VIH, *Influenza*, *Parainfluenza*, *Rhabdovirus*), de una alergia, de una enfermedad autoinmune o de un rechazo de injerto.

Preferentemente, un inhibidor según la invención es:

65 - un anticuerpo dirigido contra una proteína mutante según la invención, o un fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub> de tal anticuerpo, o

- un ácido nucleico aptámero o un péptido aptámero que se une específicamente a al menos una proteína mutante según la invención, o a un ácido nucleico, ADN, ARN según la invención, o

5 - una célula del sistema inmunitario recombinante, preferiblemente una célula dendrítica recombinante, que expresa en su superficie al menos una proteína mutante según la invención, o

- un ácido nucleico anti-sentido de un ácido nucleico según la invención, o

10 - un pequeño ARN interferente (*small interfering RNA; siRNA*) que comprende un ARN bicatenario de 19 a 22 nucleótidos, capaz de unirse (de hibridarse) a un ácido nucleico según la invención.

15 La presente solicitud se refiere por lo tanto también a una célula no-tumoral del sistema inmunitario humano o animal no humano, preferiblemente a una célula dendrítica humana o animal no humana, expresando dicha célula en su superficie al menos una proteína mutante según la invención, así como a la utilización de esta célula en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, preferiblemente en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una infección por virus con envoltura (tal como una infección por VIH, *Influenza, Parainfluenza, Rhabdovirus*), de una alergia, de una enfermedad autoinmune o de un rechazo de injerto.

20 La presente solicitud se refiere también a un anticuerpo dirigido contra una proteína mutante según la invención, o contra varias de las proteínas mutantes de la invención. Preferentemente, este anticuerpo es un anticuerpo específico de dicha o dichas proteínas mutantes de la invención. Ventajosamente, este anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Un inhibidor de la invención puede ser un fragmento conservante de tal anticuerpo, tal como un fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub>.

25 Tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar destinado a bloquear o inhibir un mecanismo de fusión celular, por ejemplo administrando este anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un paciente o sujeto que lo necesita.

30 Alternativa o complementariamente, una proteína mutante de la invención puede estar destinada a ser la misma administrada a dicho paciente o sujeto a fin de inducir una inmunización activa contra esta proteína, es decir a fin de inducir la producción por dicho paciente o sujeto de anticuerpos anti-proteína mutante. Si es necesario o deseado, se pueden administrar uno o varios adyuvantes de vacuna de manera conjunta o diferida en el tiempo con esta o estas proteínas mutantes.

35 La presente solicitud se refiere por lo tanto también a una vacuna terapéutica y/o preventiva y/o paliativa, que comprende al menos una proteína mutante de la invención a título de agente inmunógeno, y ventajosamente al menos un adyuvante de inmunización. Tal vacuna puede estar destinada al tratamiento y/o a la prevención y/o a la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, preferiblemente en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una infección por virus con envoltura (tal como una infección por VIH, *Influenza, Parainfluenza, Rhabdovirus*), de una alergia, de una enfermedad autoinmune, o de un rechazo de injerto.

La presente solicitud se refiere también a:

45 - un ácido nucleico aptámero o un péptido aptámero que se une específicamente a al menos una proteína mutante de la invención, o a un ácido nucleico, ADN, ARN de la invención,

50 - una célula del sistema inmunitario recombinante, preferiblemente una célula dendrítica recombinante, que expresa en su superficie al menos una proteína mutante de la invención,

- un ácido nucleico antisentido de un ácido nucleico de la invención,

55 - un pequeño ARN interferente (*small interfering RNA; siRNA*) que comprende un ARN bicatenario de 19 a 22 nucleótidos, capaz de unirse (hibridarse) a un ácido nucleico de la invención, y ventajosamente bloquear o inhibir la transcripción de este ácido nucleico.

60 Tales productos son también unos inhibidores de la invención. Pueden por lo tanto estar destinados al tratamiento y/o a la prevención y/o a la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, tal como se ha indicado anteriormente. Están más particularmente destinados al tratamiento y/o a la prevención y/o a la paliación de una enfermedad o de un estado que implique al menos un gen expresor o hiper-expresor de la proteína F.

65 La presente solicitud se refiere por lo tanto también a una composición farmacéutica o a un medicamento que comprende al menos un inhibidor de la invención.

Tal composición farmacéutica o tal medicamento pueden estar destinados en particular al tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, tal como se ha indicado anteriormente.

- 5 Tal composición farmacéutica o tal medicamento pueden además comprender al menos un vehículo farmacéutica y/o fisiológicamente aceptable.

10 La presente solicitud se refiere más particularmente a un inhibidor según la invención, para una utilización en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, siendo dicha enfermedad o estado una infección por virus con envoltura (preferiblemente una infección por VIH y/o *Influenza* y/o *Parainfluenza* y/o *Rhabdovirus*), una alergia, una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto.

15 La presente solicitud se refiere más particularmente a una proteína mutante según la invención, para una utilización a título de agente inmunógeno en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, siendo dicha enfermedad o estado una infección por virus con envoltura (preferiblemente una infección por VIH y/o *Influenza* y/o *Parainfluenza* y/o *Rhabdovirus*), una alergia, una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto.

20 La presente solicitud se refiere más particularmente a una vacuna o composición vacunal, más particularmente una vacuna o composición vacunal destinada al tratamiento y/o a la prevención y/o a la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, siendo dicha enfermedad o estado una infección por virus con envoltura (preferiblemente una infección por VIH y/o *Influenza* y/o *Parainfluenza* y/o *Rhabdovirus*), una alergia, una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto. Tal vacuna o composición vacunal comprende al menos una proteína mutante según la invención, y opcionalmente al menos un adyuvante fisiológicamente aceptable.

Aplicaciones de diagnósticos y pronósticos:

30 La presente solicitud se refiere también a un método, más particularmente un método *in vitro*, para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad o de un estado que implique:

35 - una formación insuficiente de sincitio, tal como un tumor, un tumor metastásico, un melanoma metastásico o una deficiencia del desarrollo placentario, o por el contrario

- una formación excesiva de sincitio, tal como una infección por virus con envoltura (preferiblemente una infección por VIH y/o *Influenza* y/o *Parainfluenza* y/o *Rhabdovirus*), una alergia, una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto.

40 El método de diagnóstico o pronóstico de la invención comprende la detección de al menos una proteína mutante según la invención o de al menos un ácido nucleico según la invención, por ejemplo en una muestra biológica tal como una muestra biológica que ha sido extraída del paciente o sujeto objeto de dicho diagnóstico o pronóstico.

45 Esta detección se puede realizar, por ejemplo, por secuenciación de las proteínas o ácidos nucleicos contenidos en dicha muestra.

50 Esta detección se puede realizar, por ejemplo, por detección de dicha al menos una proteína mutante de la invención con la ayuda de un anticuerpo, de un péptido aptámero, o de un oligonucleótido aptámero que se une a dicha al menos una proteína mutante, más particularmente con la ayuda de un anticuerpo, péptido aptámero, u oligonucleótido aptámero de la invención.

55 Esta detección se puede realizar, por ejemplo, por detección de dicho al menos un ácido nucleico de la invención con la ayuda de un ácido nucleico, de un péptido aptámero, o de un oligonucleótido aptámero que se une a dicho al menos un ácido nucleico, más particularmente con la ayuda de un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico de la invención, de un péptido aptámero, o de un oligonucleótido aptámero de la invención.

60 La presente solicitud se refiere también a dicho anticuerpo, péptido aptámero, oligonucleótido aptámero, ácido nucleico complementario, para su utilización en un método de diagnóstico o pronóstico de una formación insuficiente, o por el contrario excesiva de sincitio.

Aplicaciones biotecnológicas (cribado):

65 La presente solicitud se refiere también a un método, más particularmente a un método *in vitro*, para el cribado de un compuesto capaz de disminuir o bloquear la formación de sincitio. El método de la invención comprende la puesta en contacto de un compuesto candidato con unas células que expresan al menos una proteína mutante según la invención, a fin de determinar si este compuesto candidato disminuye o bloquea la fusión de dichas células (por

ejemplo, comparando el nivel de fusión alcanzado en presencia de dicho compuesto candidato con el alcanzado en su ausencia).

- 5 Tales compuestos son unos principios activos candidatos para el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, tales como las infecciones por virus con envoltura, las alergias, las enfermedades autoinmunes o los rechazos de injerto.

Aplicaciones biotecnológicas (mieloma, hibridoma):

- 10 La presente solicitud se refiere también a una célula tumoral, más particularmente mieloma, que comprende al menos una proteína mutante según la invención, preferiblemente que comprende al menos tal proteína mutante en su superficie, y/o que comprende al menos un ácido nucleico según la invención, y/o que comprende al menos un vector según la invención, más particularmente un vector de expresión según la invención.

- 15 Tal célula tumoral, más particularmente tal mieloma, se puede utilizar en particular en la producción de un hibridoma (por fusión de esta célula tumoral con un linfocito B), más particularmente en la producción de un hibridoma productor de anticuerpo.

- 20 La presente solicitud se refiere también a un hibridoma, más particularmente a un hibridoma productor de anticuerpo, que comprende al menos una proteína mutante según la invención, y/o al menos un ácido nucleico según la invención, y/o al menos un vector según la invención. Tal hibridoma puede ser producido en particular mediante la puesta en contacto de al menos un linfocito B con al menos una célula tumoral, más particularmente un mieloma, que comprende al menos una proteína mutante según la invención, preferiblemente que comprende al menos tal proteína mutante en su superficie, y/o que comprende al menos un ácido nucleico según la invención, y/o que comprende al menos un vector según la invención. Tal célula tumoral presenta una capacidad fusogénica intrínseca: es por lo tanto capaz de fusionar con dicho al menos un linfocito B, sin la utilización de polietilenglicol (PEG) o de medios de electroporación o de ninguno de los medios que, en la técnica anterior, son clásicamente utilizados para inducir la fusión de una célula tumoral a un linfocito B con el objetivo de producir un hibridoma.

- 30 Aplicaciones biotecnológicas (células madres o progenitoras):

- 35 La presente solicitud se refiere también a una célula madre o progenitora, que comprende al menos una proteína mutante según la invención, preferiblemente que comprende al menos tal proteína mutante en su superficie, y/o que comprende al menos un ácido nucleico según la invención, y/o que comprende al menos un vector según la invención, más particularmente un vector de expresión según la invención.

Tal célula madre o progenitora presenta una capacidad fusogénica intrínseca: es por lo tanto capaz de formar por fusión unas sincitios.

- 40 Si esta célula madre o progenitora presenta además una capacidad de diferenciación en la célula muscular, es entonces capaz de formar una fibra muscular (por fusión celular y formación de un sincitio).

La presente solicitud se refiere por lo tanto también a tal célula madre o progenitora para su utilización en la producción, por ejemplo en la producción *in vitro*, de una fibra muscular.

- 45 Esta producción se puede realizar, por ejemplo colocando una pluralidad de dichas células madres o progenitoras en contacto entre sí sobre, o en un medio de cultivo que permite la proliferación de células madres o, llegado el caso, progenitoras, de manera que la capacidad fusogénica de dichas células madre o progenitoras puedan ejercer, induciendo así la formación de un sincitio, más particularmente de una fibra muscular. Unos ejemplos de medio de cultivo que permiten la proliferación de células madre o, llegado el caso, progenitoras, y que son además apropiados para la expresión de su eventual capacidad para diferenciarse en célula muscular, más particularmente en fibra muscular, son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo el medio MCDB.

- 55 Ejemplos de marcadores celulares que permiten observar la diferenciación de una célula madre o progenitora en célula muscular, más particularmente en fibra muscular, son también conocidos por el experto en la materia, por ejemplo CD56.

- 60 En la presente solicitud, el término "que comprende", con el que "que incluye" o "que contiene" es sinónimo, es un término abierto, que no excluye la presencia de uno o varios elemento(s), ingrediente(s) o etapa(s) de método adicional(es) que no estuviera(n) explícitamente indicado(s), mientras que el término "que consiste" o "constituido de" es un término cerrado, que excluye la presencia de cualquier otro elemento adicional, etapa o ingrediente que no estuviera explícitamente expuesto. El término "que consiste esencialmente" o "esencialmente constituido de" es un término parcialmente abierto, que no excluye la presencia de uno o más elemento(s), ingrediente(s) o etapa(s) adicional(es), en la medida en la que este(os) elemento(s), ingrediente(s) o etapa(s) adicional(es) no afectan materialmente las propiedades de base de la invención.

- 65

Por lo tanto, el término "que comprende" (o "comprende (comprenden)") incluye los términos "que consiste", "constituido", tanto como los términos "que consiste esencialmente" y "esencialmente constituido".

5 El contenido de los documentos y referencias bibliográficas citados en la presente solicitud se incorpora como referencia.

Los ejemplos siguientes son dados a título puramente ilustrativo, no limitan la invención de ninguna manera.

### EJEMPLOS

10 EJEMPLO 1: construcción de los mutantes y medición de su fusogenicidad

Materiales y métodos:

15 Células y virus

La línea celular LLC-MK2 (línea de células de riñón de *Macaca mulatta*) está disponible en *American Type Culture Collection* (ATCC) bajo el número CCL-7. La línea celular A549 (línea de células de carcinoma pulmonar humana) está disponible en ATCC bajo el número CCL-185.

20 La línea recombinante HuH7-Tat (línea de células de hepatoma humano) está disponible por transducción de células de la línea HuH-7 por VIH-1 Tat.

25 La línea HuH-7 está disponible en la Colección Japonesa de los Biorrecursos de Investigaciones *-Japanese Collection of Research Bioresources-* bajo la referencia JCRB0403. La transducción de la línea HuH-7 por HIV-Tat se ha realizado con la ayuda del vector retroviral LXSNTat transduciendo el plásmido Tat.

30 Las células LLC-MK2, A549 y HuH7-Tat se han cultivado en medio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) o DMEM (*Dulbecco/Vogt Modified Eagles' essential minimal Medium*) con el 5% de suero fetal de ternera.

La cepa PIV-5 WR se ha obtenido de ATCC (número ATCC VR-288), y se ha cultivado sobre unas células LLC-MK2 como se describe en Terrier *et al.* 2008.

35 Extracción de ARN, RT-PCR y clonación

El ARN viral se ha extraído del sobrenadante obtenido a partir de una infección de células LLC-MK2 por PIV-5, con la ayuda del kit *Absolutely RNA® microprep kit* (Stratagene, USA), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. La transcripción inversa se ha realizado con la ayuda de hexámeros aleatorios pd(N)6 (Amersham Biosciences, GB) y de una transcriptasa reversa (*Reverse Transcriptase*; RT) del virus de la mieloblastosis aviar (*Avian Myeloblastosis Virus*; AMV) (transcriptasa reversa AMV-RT disponible de Promega).

La amplificación de la secuencia completa de F PIV-5 se ha realizado con un par de cebadores concebido a partir de la secuencia nucleotídica de PIV-5 disponible en las bases de datos (número de acceso GenBank AB021962).

45 El par de cebadores utilizado es el siguiente:

Cebador sentido (SEC ID NO: 1):

50 5' TTGCGGCCGCATGGGTACTATAA 3'

Cebador antisentido (SEC ID NO: 2):

5' CCGCTCGAGTTATGATAAACAAAATTCTCC 3'

55 La amplificación se ha realizado según el protocolo siguiente: 95°C durante 2 min, después 39 ciclos (95°C/30 s 55°C/1 min 72°C/3 min) y una elongación final de 10 min a 72°C. El ADN complementario de F PIV-5 se ha clonado en el plásmido de expresión pcDNA3.1(+) a nivel de los sitios *NotI* y *XhoI* a nivel del sitio múltiple de clonación (véase la figura 4).

60 Los productos PCR y los plásmidos se han purificado, respectivamente por los kits *Nucleospin® ExtractII* y *Nucleospin® plasmid* (Macherey Nagel, Germany), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

El conjunto de las secuenciaciones realizadas en este estudio se ha realizado por MWG Biotech (Ebersberg, Germany).

65 Mutagénesis dirigida por amplificación en cadena por polimerasa (PCR)

5 Se han realizado las proteínas mutantes de la proteína F de PIV-5 por mutación dirigida dentro del plásmido pcDNA3.1 que codifica la proteína de fusión F PIV-5. La(s) mutación(es) se han generado por PCR con la ayuda de cebadores complementarios, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (*QuickChange® Site-Directed Mutagenesis system* disponible de Stratagene). La lista de cebadores utilizados se da en la tabla 2 siguiente. El conjunto de los plásmidos se controló por secuenciación.

Tabla 2: lista de cebadores

Mutación	Región diana en PIV-5		Secuencias de los cebadores utilizadas para la mutagénesis por PCR	SEC ID NO:
L22P	F2	Sentido	5' GGAGCAGGCAGCCTTGATCCAGCTGCTCTCATGCAAATCGG 3'	3
		Antisentido	5' CCGATTTGCATGAGAGCAGCTGGATCAAGGCTGCCTGCTCC 3'	4
K132E	HR1	-	Mutación pre-existente	-
V290A	HR3	-	Mutación pre-existente	-
I49A	F2	Sentido	5' GGCCTCATCAGCATTGCTGTTGTGAAGTTAATGCC 3'	5
		Antisentido	5' GGCATTAACCTCACAACAGCGAATGCTGATGAGGCC 3'	6
V402A	entre HR3 y HR2	Sentido	5' CAGCCAAGTTCATCTCCTGCAACTGTCATTGACATGTAC 3'	7
		Antisentido	5'GTACATGTCAATGACAGTTGCAGGAGAGTGAACCTGGCTG3'	8
S443P	hacia arriba de HR2	Sentido	5' GCTTGAATCATCTCAGATCTTGTCCATTGATCCGTTGGATATATCCC 3'	9
		Antisentido	5' GGGATATATCCAACGGATCAATGGACAAGATCTGAGATGATTCAAGC 3'	10
L447P	hacia arriba de HR2	Sentido	5' CTCAGATCTTGTCCATTGATCCGCCGGATATATCCCAGAATCTAGCTGCG 3'	11
		Antisentido	5' CGCAGCTAGATTCTGGGATATATCCGGCGGATCAATGGACAAGATCTGAG 3'	12
I449P	hacia arriba de HR2	Sentido	5' CTTGTCCATTGATCCGTTGGATCCATCCAGAATCTAGCTGCGGTG 3'	13
		Antisentido	5'CACCGCAGCTAGATTCTGGTGGATTTCTCCAGAATCTAGCTGCGG3'	14
I449F	hacia arriba de HR2	Sentido	5' GCCCATTGATCCGTTGGATTTCTCCAGAATCTAGCTGCGG 3'	15
		Antisentido	5'CCGCAGCTAGATTCTGGGAGAAATCCAACGGATCAATGGGC 3'	16
T147V	HR1	Sentido	5'CTCAAAAATGCAATCCAAAAAGTAAATGCAGCAGTTGCAGATG3'	17
		Antisentido	5' CATCTGCAACTGCTGCATTTACTTTTTGGATTGCATTTTTGAG 3'	18
T158V	HR1	Sentido	5' GCAGATGTGGTCCAGGCCGTACAATCACTAGGAACGGC 3'	19
		Antisentido	5' GCCGTTCTAGTGATTGTACGGCCTGGACCACATCTGC 3'	20
A463V	HR2	Sentido	5' GTGAATAAGAGTCTAAGTGATGTACTACAACACTTAGCACAAAGTG 3'	21
		Antisentido	5' CACTTTGTGCTAAGTGTTGTAGTACATCACTTAGACTCTTATTAC 3'	22

10 La mutación 443P está teóricamente preexistente en la proteína F del aislado WR. Sin embargo, en la muestra de este aislado que los inventores han recibido de ATCC, esta mutación no estaba presente. Por lo tanto, tuvo que ser introducida por los inventores.

15 Transfección de las células

Las células se transfectaron por los plásmidos con la ayuda del reactivo ExGen500 (Fermentas), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Se añadieron de uno a tres microgramos de ADN plasmídico sobre las células (del 70 al 80% confluencia) durante 48h. La eficacia de la transfección se estimó con la ayuda de un plásmido que codifica la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescence Protein; GFP*).

Inmunofluorescencia por microscopía confocal

25 Les células transfectadas se fijaron con la ayuda de paraformaldehído (1% v/v) en tampón fosfato (*Phosphate Buffer Saline; PBS*), después se lavaron dos veces. Los tapices celulares se incubaron en presencia de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de fusión F PIV-5, en este caso el anticuerpo monoclonal F1a descrito en Randall *et al.* 1987, diluido al 1/10 en PBS durante 3h. El anticuerpo monoclonal F1a se obtuvo por inmunización de ratones contra un aislado de PIV-5 (en este caso el aislado LN), preparación de los hibridomas y selección de los anticuerpos anti-F específicos.

30 Después, los tapices celulares se lavaron e incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón IgG-Alexa Fluor® 633 (Invitrogen) diluido al 1/200 en PBS durante 30 minutos. Después, del aclarado, las células se incubaron durante 10 minutos con Dapi (4',6'-Di-Amidino-2-fenolindol) al 1/1000 mezclado o no con aglutinina de gérmenes de trigo (*Wheat Germ Agglutinin; WGA*) acoplada a Alexa Fluor® 488 (WGA-Alexa Fluor® disponible de Invitrogen) al 1/200

en tampón fosfato (*Phosphate Buffer Saline*; PBS). Las imágenes se tomaron con la ayuda de un microscopio confocal TCS SP2 (Leica).

#### Citometría de flujo

5 La citometría de flujo se realizó como se describe anteriormente en la bibliografía (Horvat y Lamb 1992). Se transfectoron unas células A549 por los plásmidos que codifican los diferentes *Fus* y se depositaron sobre hielo. Los tapices celulares se aclararon mediante tampón fosfato PBS (*Phosphate Buffer Saline*; PBS) que comprende el 1% de azida de sodio. Un anticuerpo monoclonal anti-proteína F de PIV-5 (en este caso el anticuerpo monoclonal F1a) se añadió después sobre las alfombras (1/500 en tampón fosfato PBS al 1% en suero fetal de ternero), y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Las alfombras se aclararon e incubaron después en presencia de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor® 488 al 1/1000 (Invitrogen). Después de los aclarados, las células se despegaron suavemente con la ayuda de 500 µl de tampón fosfato PBS a 0,5 mM en EDTA (ácido etilen-diamina-tetraacético). Las células se transfirieron en tubos dedicados a la citometría de flujo que contienen 500 µl de una solución de paraformaldehído 1%. La intensidad de la fluorescencia de 5000 células se midió sobre un citómetro de flujo seleccionador de células (*Fluorescence-activated cell sorting*; FACS), en este caso en el *FACSVantage™ SE flow* de Becton Dickinson.

20 Ensayo de fusión semi-cuantitativo (resultados de fusión establecidos en función del tamaño del sincitio y del número de núcleo)

Los tapices transfectados por los diferentes plásmidos de expresión *Fus* y observados en inmunofluorescencia han permitido un análisis semi-cuantitativo. Este análisis consistió en determinar un resultado de fusión para cada uno de los mutantes según los siguientes criterios:

25 La fusión o no (simples aglomerados), señalada con -/+;

El tamaño del sincitio, anotado en una escala de 1 a 5;

30 El número de núcleos, anotado en una escala de 1 a 5.

El resultado así calculado es la adición de las dos notas; la nota máxima teórica es por lo tanto de 10 y corresponde a un sincitio de tamaño máximo con un número máximo de núcleo.

35 Ensayo de fusión cuantitativo (medición de la actividad luciferasa)

Con el fin de cuantificar la fusión célula-célula, de las células A549 "donantes" (2,5 millones de células por pocillo de placa de 6 pocillos) se co-transfectaron con 2 µg de plásmido pcDNA3.1 que codifica las diferentes proteínas mutantes *Fus* así como 50 ng de un plásmido que expresa la luciferasa bajo la dependencia de la larga repetición terminal del VIH-1 (*Long Terminal Repeat*; LTR) (Lavillette *et al.* 2007).

A título de control negativo, se co-transfectaron unas células con 2 µg de plásmido pcDNA3.1 vacío.

45 Doce horas después de la co-transfección, las células "donantes" se despegaron con la ayuda de tampón fosfato (PBS) a 0,5 mM en EDTA, y se contaron y después se recolocaron en nuevas placas de 6 pocillos (10<sup>5</sup> células/pocillo). Unas células "indicadoras" HuH7-Tat (4.10<sup>5</sup> células/pocillo) se despegaron con la ayuda del tampón PBS-EDTA, después se aclararon y se añadieron a las células "donantes".

50 Se midió la actividad luciferasa a 72h de co-cultivo con la ayuda de un kit de medición de la actividad luciferasa, en este caso el *Luciferase Assay system (E1500)* kit de Promega, siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante.

#### Resultados:

55 Unas proteínas mutantes construidas y producidas por los inventores son presentadas en la tabla 3 siguiente.

En esta tabla 3, los inventores han organizado las diferentes mutaciones según la función que se les atribuye, a saber:

60 - implicación en función de autonomía frente a HN: posiciones 22, 132 y 290 de la proteína F de PIV-5;

- implicación en función de pre-fusión: posiciones 49, 402, 443, 447 y 449 de la proteína F de PIV-5;

- implicación en función de post-fusión: posiciones 147, 158 y 463 de la proteína F de PIV-5.

65 En las figuras 5A, 5B, 5C y 5D, se ilustran las posiciones de las mutaciones de la tabla 3.

Así, se han construido unas proteínas mutantes, producidas y ensayadas por los inventores.

Tabla 3: lista de proteínas realizadas

	Autonomía			Pre-fusión						Post-fusión		
	L22P	K132 E	V29 0A	I49A	V402 A	S443 P	L447 P	I449 P	I449F	T14 7V	T158 V	A463 V
Fus1 (SEC ID NO: 47)		+	+									
Fus1.1 (SEC ID NO: 48)		+	+	+								
Fus1.2 (SEC ID NO: 49)		+	+		+							
Fus2 (SEC ID NO: 50)		+	+			+						
Fus3 (SEC ID NO: 51)	+	+	+									
Fus3.1 (SEC ID NO: 52)	+	+	+							+		
Fus3.2 (SEC ID NO: 53)	+	+	+							+	+	
Fus3.3 (SEC ID NO: 54)	+	+	+								+	
Fus4 (SEC ID NO: 55)	+	+	+	+								
Fus5 (SEC ID NO: 56)	+	+	+		+							
Fus6 (SEC ID NO: 57)	+	+	+			+						
Fus6.1 (SEC ID NO: 58)	+	+	+			+				+		
Fus6.2 (SEC ID NO: 59)	+	+	+			+					+	
Fus6.3 (SEQ D NO: 60)	+	+	+			+				+	+	
Fus7 (SEC ID NO: 61)	+	+	+				+					
Fus7.1 (SEC ID NO: 62)	+	+	+				+			+		
Fus7.2 (SEC ID NO: 63)	+	+	+				+				+	
Fus7.3 (SEC ID NO: 64)	+	+	+				+			+	+	
Fus8 (SEC ID NO: 65)	+	+	+					+				
Fus9 (SEC ID NO: 66)	+	+	+						+			
Fus10 (SEC ID NO: 67)	+	+	+	+				+				
Fus10.4 (SEC ID NO: 68)	+	+	+		+			+		+	+	+
Fus10.5 (SEC ID NO: 69)	+	+	+	+	+			+		+	+	+
Fus11 (SEC ID NO: 70)	+	+	+		+			+				
Fus8.1 (SEC ID NO: 71)	+	+	+					+		+		
Fu8.2 (SEC ID NO: 72)	+	+	+					+			+	
Fus8.4 (SEC ID NO: 73)	+	+	+					+		+	+	
Fus8.5 (SEC ID NO: 74)	+	+	+					+		+		+
Fus8.6 (SEC ID NO: 75)	+	+	+					+			+	+
Fus8.7 (SEC ID NO: 76)	+	+	+					+		+	+	+
Fus10.1 (SEC ID NO: 77)	+	+	+	+				+			+	
Fus10.2 (SEC ID NO: 78)	+	+	+	+				+		+	+	
Fus10.3 (SEC ID NO: 79)	+	+	+	+				+		+	+	+

5 La secuencia de la proteína F de PIV-5 que ha sido utilizada durante la construcción y la producción de estas proteínas mutantes eran una secuencia alternativa de la proteína F de aislado WR. Esta secuencia alternativa era idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 31 (secuencia Genbank), con la excepción del aminoácido en la posición 443 que era S y no P (secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443").

10 Las secuencias de la SEC ID NO: 47 a 79 son por lo tanto las secuencias que resultan de la sustitución, dentro de dicha secuencia alternativa "SEC ID NO: 31 con S en 443", de los aminoácidos indicados para cada una de estas secuencias en la tabla 3 anterior.

15 Una ilustración de las observaciones que han sido realizadas con microscopio durante unos ensayos de fusión semi-cuantitativos se presenta en la figura 6A.

Los resultados obtenidos al final de los ensayos de fusión semi-cuantitativos son presentados en la figura 6B.

20 Las proteínas mutantes Fus 6, Fus 6.1, Fus 6.2 y Fus 6.3 han llevado a la aglutinación de numerosas células, pero ninguna fusión celular.

Las proteínas mutantes Fus 3.3, Fus 3.1, Fus2, Fus 1.1, Fus 1.2 y Fus 1 dan un resultado de fusión nulo.

25 Las proteínas mutantes Fus9, Fus7, Fus 3, Fus5 y Fus4 dan resultados bajos de fusión.

Más allá del resultado de fusión de Fus4, destacan un conjunto de proteínas mutantes con resultados de fusión significativo, a saber:

30 - el grupo de las proteínas mutantes que tienen en común comprender las tres mutaciones de autonomía y la mutación de pre-fusión 449P, tales como las proteínas mutantes Fus8, Fus10, Fus10.4, Fus10.5, Fus11, Fus8.1, Fus8.2, Fus8.4, Fus8.5, Fus8.6, Fus8.7, Fus10.1, Fus10.2, Fus10.3, y

- el grupo de las proteínas mutantes que tienen en común comprender las tres mutaciones de autonomía, la mutación de pre-fusión 447P y al menos una mutación de post-fusión (147V o 158V), tales como Fus7.1, Fus7.2 y Fus7.3.

5 Las figuras 7A y 7B presentan una ilustración de las observaciones realizadas con microscopio y presentan los resultados de fusión para una selección de las proteínas mutantes ensayadas, a saber el grupo de las proteínas mutantes que tienen en común comprender las tres mutaciones de autonomía, y la mutación de pre-fusión 449P, tales como las proteínas mutantes Fus8, Fus10, Fus10.4, Fus10.5, Fus11, Fus8.1, Fus8.2, Fus8.4, Fus8.5, Fus8.6, Fus8.7, Fus10.1, Fus10.2, Fus10.3.

Las figuras 8A, 8B y 8C dan una ilustración de los resultados obtenidos por el ensayo de fusión denominado cuantitativo (ensayo por luciferasa).

15 Las figuras 8A y 8C muestran que las proteínas mutantes que tienen en común comprender las tres mutaciones de autonomía y la mutación de pre-fusión 449P, tales como la proteína mutante Fus8, presentan una capacidad fusogénica más fuerte (en realidad, más de tres veces más fuerte) que la de la proteína Fus3, incluso cuando Fus3 está asociada a la glicoproteína HN, a título de mimética de la situación natural (Figure 8A).

20 La proteína mutante Fus8.7 presenta una capacidad fusogénica más fuerte que la proteína mutante Fus8 (casi dos veces más importante), en sí misma más fuerte que la proteína Fus3 (más de seis veces más importante) incluso cuando Fus3 está asociado a la glicoproteína HN, a título de mimética de la situación natural (figura 8C).

25 La figura 8B ilustra el hecho de que la capacidad fusogénica del grupo de las proteínas mutantes que tienen en común comprender las tres mutaciones de autonomía y la mutación de pre-fusión 449P, no se debe a una simple correlación con el nivel de expresión de superficie obtenido. En efecto, se puede constatar en particular que la expresión de Fus8 es aproximadamente menor de la mitad que la de Fus3 (figura 8B).

30 EJEMPLO 2: Sustitución del sitio de escisión natural por el sitio de una enzima expresada específicamente por el tejido tumoral metastásico

Las proteínas mutantes de la invención, y más particularmente las descritas en el ejemplo 1 anterior, se modificaron más adelante por sustitución del sitio de escisión natural de la proteína F nativa, por ejemplo para sustituirlo por un sitio de escisión específico de tejido.

35 A título ilustrativo, se representan aquí unas proteínas mutantes de la invención cuyo sitio de escisión natural se sustituyó por el sitio de una enzima expresada específicamente por el tejido tumoral metastásico, a saber la metaloproteasa matricial 9 (MMP-9).

40 La figura 9 ilustra la sustitución así realizada para unas proteínas mutantes de la proteína F de PIV-5.

El sitio de escisión natural de la proteína F de PIV-5 es:

45 RRRRR (SEC ID NO: 23).

Un ejemplo de fragmento de secuencia de la proteína F que comprende el sitio de escisión natural de la proteína F de PIV-5 es:

50 IGENLETIRNQLIPTRRRRRRFAGVVIGL (SEC ID NO: 24).

La secuencia consenso de un sitio de escisión MMP-9 es:

PXXHyS/T (SEC ID NO: 27)

55 con X = cualquier aminoácido, y

con Hy = cualquier aminoácido hidrófobo (es decir cualquier aminoácido de entre F, M, V, L, I).

Un ejemplo de sitio de escisión MMP-9 es:

60 PRRIT (SEC ID NO: 28).

Un ejemplo de fragmento de secuencia de la proteína F mutante de la invención que comprende un sitio de escisión MMP-9 es:

65 IGENLETIRNQLIPTPRRITFAGVVIGL (SEC ID NO: 29).

Materiales y métodos:

Las proteínas mutantes de la proteína F de PIV-5 se han producido como se describe en el ejemplo 1 anterior.

La sustitución del sitio de escisión natural por el sitio de escisión seleccionado, en este caso, el sitio de escisión MMP-9 de la SEC ID NO: 28, se ha realizado de la siguiente manera:

La sustitución del sitio de escisión se ha realizado para 3 mutagénesis dirigidas sucesivas dentro del plásmido pcDNA3.1 que codifica la proteína de fusión F PIV-5. Las mutaciones se han generado por PCR con la ayuda de cebadores complementarios, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (*QuickChange® Site-Directed Mutagenesis system* disponible de Stratagene). El conjunto de los plásmidos se ha controlado por secuenciación.

1ª MUTACIÓN R98P

SENTIDO 5' CCAAGTTGATTCCAACCTCCGAGGAGACGCCGGTTTGC 3' (SEC ID NO: 80)

ANTISENTIDO 5' GCAAACCGGCGTCTCCTCGGAGTTGGAATGAACTGG 3' (SEC ID NO: 81)

2ª MUTACIÓN R1011

SENTIDO 5' GATTCCAACCTCCGAGGAGAATCCGGTTTGCAGGAGTGGTG 3' (SEC ID NO: 82)

ANTISENTIDO 5' CACCACTCCTGCAAACCGGATTCTCCTCGGAGTTGGAATC 3' (SEC ID NO: 83)

3ª MUTACIÓN R102T

SENTIDO 5' GATTCCAACCTCCGAGGAGAATCACGTTTGCAGGAGTGGTGATTGG 3' (SEC ID NO: 84)

ANTISENTIDO 5' CCAATCACCACTCCTGCAAACGTGATTCTCCTCGGAGTTGGAATC 3' (SEC ID NO: 85)

Transfección de las células

Se han transfectado las células por los plásmidos con la ayuda del reactivo ExGen500 (Fermentas), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Se añadieron de uno a tres microgramos de ADN plasmídico sobre las células (del 70 al 80% de confluencia) durante 48h. La eficacia de la transfección se estimó con la ayuda de un plásmido que codifica la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescence Protein; GFP*).

Inmunofluorescencia por microscopía confocal

Las células transfectadas se fijaron con la ayuda de paraformaldehído (1% v/v) en tampón fosfato (*Phosphate Buffer Saline; PBS*), después se lavaron dos veces. Los tapices celulares se incubaron en presencia de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de fusión F PIV-5, en este caso el anticuerpo monoclonal F1a descrito en Randall *et al.* 1987, diluido al 1/10 en PBS durante 3h. El anticuerpo monoclonal F1a se obtuvo por inmunización de ratones contra un aislado PIV-5 (en este caso el aislado LN), preparación de los hibridomas y selección de los anticuerpos anti-F específicos.

Los tapices celulares se lavaron después y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratones IgG-Alexa Fluor® 633 (Invitrogen) diluido al 1/200 en PBS durante 30 minutos. Después del aclarado, las células se incubaron durante 10 minutos con Dapi (4',6'-Di-Amidino-2-fenilindol) al 1/1000 mezclado o no con la aglutinina de germen de trigo (*Wheat Germ Agglutinin; WGA*) acoplada a Alexa Fluor® 488 (WGA- Alexa Fluor® disponible de Invitrogen) al 1/200 en tampón fosfato (*Phosphate Buffer Saline; PBS*). Las imágenes se adquirieron con la ayuda de un microscopio confocal TCS SP2 (Leica).

Resultados:

Los inventores obtuvieron así unas proteínas mutantes tales como las proteínas Fus8M y Fus8.7M (SEC ID NO: 88 y 89, respectivamente) que derivan de las proteínas mutantes Fus8 y Fus8.7 por sustitución del sitio de escisión natural por el sitio MMP-9 de la SEC ID NO: 28.

Fus8 (SEC ID NO: 65):

MGTIIQFLVV SCLLAGAGSL DPAALMQIGV IPTNVRQLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDSP  
 ISGCNITSIS SYNATVTKLL QPIGENLETI RNQLIPTRRR RRFAGVVIGL AALGVATAAQ  
 VTAVALVKA NENAAAILNL KNAIQKTNAA VADVVQATQS LGTAVQAVQD HINSVVSPAI  
 TAANCKAQD AIIGSILNLYL TELTTIFHNQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF  
 NTQISAAELL SSGLLTGQIV GLDLTYMQMV IKIELPTLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE  
 VMAQLPTRVM VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACLQ GNLTRCTFSP  
 VVGSFLTRFV LFDGIVYANC RSMCKCMQP AAVILQPSSS PVTVIDMYKC VSLQLDNLRF  
 TITQLANVTY NSTIKLESSQ ILSIDPLDES QNLAAVNKSL SDALQHLAQS DTYLSAITSA  
 TTTSVLSIIA ICLGSLGLIL IILLSVVVWK LLTIVAANRN RMENFVYHK

5 El sitio de escisión natural está en la posiciones 98 a 102 (RRRRR).

Fus8M (SEC ID NO: 88):

MGTIIQFLVV SCLLAGAGSL DPAALMQIGV IPTNVRQLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDSP  
 ISGCNITSIS SYNATVTKLL QPIGENLETI RNQLIPTRRR ITFAGVVIGL AALGVATAAQ  
 VTAVALVKA NENAAAILNL KNAIQKTNAA VADVVQATQS LGTAVQAVQD HINSVVSPAI  
 TAANCKAQD AIIGSILNLYL TELTTIFHNQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF  
 NTQISAAELL SSGLLTGQIV GLDLTYMQMV IKIELPTLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE  
 VMAQLPTRVM VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACLQ GNLTRCTFSP  
 VVGSFLTRFV LFDGIVYANC RSMCKCMQP AAVILQPSSS PVTVIDMYKC VSLQLDNLRF  
 TITQLANVTY NSTIKLESSQ ILSIDPLDES QNLAAVNKSL SDALQHLAQS DTYLSAITSA  
 TTTSVLSIIA ICLGSLGLIL IILLSVVVWK LLTIVAANRN RMENFVYHK

10 El sitio de escisión natural RRRRR se sustituyó por el sitio PRRIT (sitio de MMP-9).

Fus8.7 (SEC ID NO: 76):

MGTIIQFLVV SCLLAGAGSL DPAALMQIGV IPTNVRQLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDSP  
 ISGCNITSIS SYNATVTKLL QPIGENLETI RNQLIPTRRR RRFAGVVIGL AALGVATAAQ  
 VTAVALVKA NENAAAILNL KNAIQKVNAA VADVVQAVQS LGTAVQAVQD HINSVVSPAI  
 TAANCKAQD AIIGSILNLYL TELTTIFHNQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF  
 NTQISAAELL SSGLLTGQIV GLDLTYMQMV IKIELPTLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE  
 VMAQLPTRVM VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACLQ GNLTRCTFSP  
 VVGSFLTRFV LFDGIVYANC RSMCKCMQP AAVILQPSSS PVTVIDMYKC VSLQLDNLRF  
 TITQLANVTY NSTIKLESSQ ILSIDPLDES QNLAAVNKSL SDVLQHLAQS DTYLSAITSA  
 TTTSVLSIIA ICLGSLGLIL IILLSVVVWK LLTIVAANRN RMENFVYHK

15 El sitio de escisión natural está en la posiciones 98 a 102 (RRRRR).

Fus8.7M (SEC ID NO: 89):

20

MGTIIQFLVV SCLLAGAGSL ~~D~~PAALMQIGV IPTNVRQLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDSP  
 ISGCNITSIS SYNATVTKLL QPIGENLETI RNQLIPT~~PRR~~ ITFAGVVIGL AALGVATAAQ  
 VTAAVALVKA ~~N~~ENAAAAILNL KNAIQKVNAA VADVVOAVQS LGTAVQAVQD HINSVVSPAI  
 TAANCKAQD AIIGSILNLYL TELTTIFHNQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF  
 NTQISAAELL SSGLLTGQIV GLDLTYMQMV IKIELPTLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE  
 VMAQLPTRVM VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACLQ GNLTRCTFSP  
 VVGSFLTRFV LFDGIVYANC RSMLCKCMQP AAVILQPSSS ~~P~~VTVIDMYKC VSLQLDNLRF  
 TITQLANVTY NSTIKLESSQ ~~I~~L~~S~~ID~~P~~L~~D~~ES QNLAAVNKSL ~~S~~D~~V~~L~~Q~~H~~L~~A~~Q~~S DTYLSAITS  
 TTTSVLSIIA ICLGSLGLIL IILLSVVVWK LLTIVAANRN RMENFVYHK

El sitio de escisión natural RRRRR se sustituyó por el sitio PRRIT (sitio de MMP-9).

5 Las proteínas mutantes obtenidas son tan funcionales como las proteínas mutantes del sitio de escisión natural de las cuales derivan (inducción de sincitio amplios que comprende numerosos núcleos, expresión de superficie y cuantificación de un alto nivel de fusogenicidad).

10 Este resultado se ilustra mediante la figura 9 (inmunofluorescencia por microscopia confocal realizada como se describe en el ejemplo 1).

La modificación del sitio de escisión no parece modificar de manera significativa la capacidad fusogénica (resultados de fusión muy próximos) y la funcionalidad de las proteínas mutantes de la invención.

15 En lo referente a las proteínas mutantes de la invención que derivan de la proteína F de PIV-2, se puede realizar la misma operación de introducción o sustitución del sitio de escisión.

20 El sitio de escisión natural de la proteína F de PIV-2 es KTRQKR (SEC ID NO: 25), un ejemplo de fragmento de secuencia de la proteína F que comprende el sitio de escisión natural de la proteína F de PIV-2 es LTPLIENLSKISTVTDKTRQKRFAGVVVGLAALGVA (SEC ID NO: 26). En las proteínas mutantes de la invención, un sitio de escisión diferente de este sitio natural de escisión puede ser introducido o venir en sustitución, por ejemplo un sitio de escisión específico de tejido, más particularmente un sitio de escisión de una enzima expresada específicamente por el tejido tumoral metastásico, tal como la metalo-proteasa matricial 9 (MMP-9; sitio de SEC ID NO: 27 o 28 por ejemplo).

25 Referencias bibliográficas

Baker *et al.* 1999, Mol Cell. 3(3):309-19.

30 Chatziandreou *et al.* 2004, Journal of General Virology 85: 3007-3016.

Horvat y Lamb 1992, J. Virol. 66(4): 2443-2455.

Ito *et al.* 1997, J Virol. 71(12): 9855-9858.

35 Ito *et al.* 2000, J Gen Virol. 81(Pt 3):719-727.

Gardner y Dutch 2007, J. Virol. 81(15):8303-14.

40 Gardner *et al.* 2007, Biochemistry 46(17):5094-5105.

Lavillette D. *et al.* 2007, J. Virol. 81(16): 8752-8765

Paterson *et al.* 2000, Virology 270(1):17-30.

45 Randall *et al.* 1987, J. Gen. Virol. 68(Pt11): 2769-2780

Russell *et al.* 2003, J. Cell Biol. 163(2):363-74.

50 Terrier *et al.* 2008, Journal of Clinical Virology, 2008, 43(1): 86-92.

West *et al.* 2005, J Virol. 79(3):1543-1551.

**REIVINDICACIONES**

1. Proteína mutante, cuya secuencia en aminoácidos comprende una secuencia que difiere de la de la proteína F de un virus PIV-5 o PIV-2:
- 5 - por sustitución:
- del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 22, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 24, por el aminoácido P, y
- 10 - del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 132, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 133, por el aminoácido E, y
- 15 - del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 290, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 294, por el aminoácido A, y
- del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5, está en la posición 449, o que, en la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-2, está en la posición 439, por el aminoácido P,
- 20 - y, opcionalmente:
- por sustitución del sitio de escisión nativo de dicha proteína F por otro sitio de escisión enzimático, y/o por inserción en dicha proteína F de un sitio de escisión enzimático diferente del sitio de escisión nativo de esta proteína F, y/o
- 25 - por supresión de una parte C-terminal de dicha proteína F, extendiéndose dicha parte C-terminal en dirección N-terminal a partir del último aminoácido en el extremo C-terminal de la proteína, pero sin extenderse más allá del dominio HR2 de dicha proteína F,
- la secuencia de dicha proteína F de virus PIV-5 o PIV-2 que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 34.
- 30
2. La proteína mutante según la reivindicación 1, caracterizada por que la secuencia de dicha proteína F es una proteína F de PIV-5.
3. La proteína mutante según la reivindicación 2, caracterizada por que la secuencia de dicha proteína F consiste en:
- 35 - la secuencia de la SEC ID NO: 31, o la secuencia alternativa que es idéntica a la secuencia de SEC ID NO: 31 con la excepción del aminoácido en la posición 443, que es S en esta secuencia alternativa (en lugar de P en la SEC ID NO: 31), o en
- 40 - una secuencia variante de esta secuencia de la SEC ID NO: 31 o de dicha secuencia alternativa, esta secuencia variante:
- es de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 31, o es de un tamaño superior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31, o es de un tamaño inferior en un máximo de 7 aminoácidos al de la SEC ID NO: 31, y
- 45 ○ presenta una identidad de secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 31 o a dicha secuencia alternativa, siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de la SEC ID NO: 31 o, llegado el caso, de dicha secuencia alternativa.
- 50
4. La proteína mutante según la reivindicación 3, caracterizada por que la secuencia de dicha proteína F consiste en la secuencia de la SEC ID NO: 31 modificada por las sustituciones de aminoácidos indicados en la tabla 1 en la columna "W3A" o "MIL" o "DEN" o "LN" o "MEL" o "Criptovirus" o "CPI+" o "CPI-" o "H221" o "78524" o "T1" o "SER".
- 55
5. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que su secuencia en aminoácidos no comprende otra mutación con respecto a dicha secuencia de la proteína F de PIV-5.
6. La proteína mutante según la reivindicación 5, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F es la secuencia de la SEC ID NO: 65.
- 60
7. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:
- al menos una mutación de prefusión seleccionada de entre:
- 65 - la sustitución del aminoácido en la posición 49 por el aminoácido A,

- la sustitución del aminoácido en la posición 402 por el aminoácido A,
- la sustitución del aminoácido en la posición 443 por el aminoácido P,
- la sustitución del aminoácido en la posición 447 por el aminoácido P,

5 y/o por

- al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:

- 10
- la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
  - la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo.

8. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 y 7, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:

- 15
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 49, por el aminoácido A, o por

- 20
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 402, 147, 158 y 463 por los aminoácidos A, V, V y V, respectivamente, o por

- 20
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 49, 402, 147, 158 y 463, por los aminoácidos A, A, V, V y V, respectivamente, o por

- 25
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 402, por el aminoácido A, o por

- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 147, por el aminoácido V, o por

- 30
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 158, por el aminoácido V, o por

- 35
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 147 y 158, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por

- 35
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 147 y 463, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por

- 40
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 158 y 463, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por

- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 147, 158 y 463, por los aminoácidos V, V y V, respectivamente.

45 9. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 y 7 a 8, caracterizada por que la secuencia de dicha proteína F es la secuencia de la SEC ID NO: 31 con el aminoácido S en la posición 443, y por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:

- 50
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 49, por el aminoácido A, o por

- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 402, 147, 158 y 463 por los aminoácidos A, V, V y V, respectivamente, o por

- 55
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 49, 402, 147, 158 y 463, por los aminoácidos A, A, V, V y V, respectivamente, o por

- 60
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 402, por el aminoácido A, o por

- 60
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 147, por el aminoácido V, o por

- 65
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 158, por el aminoácido V, o por

- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 147 y 158, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por
- 5 - sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 147 y 463, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 158 y 463, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por
- 10 - sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 147, 158 y 463, por los aminoácidos V, V y V, respectivamente, o por
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 49 y 158, por los aminoácidos A y V, respectivamente, o por
- 15 - sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 49, 147 y 158, por los aminoácidos A, V y V, respectivamente, o por
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 49, 147, 158 y 20 463, por los aminoácidos A, V, V y V, respectivamente.
- 10. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 y 7 a 9, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:
- 25 - la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo, y  
- la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo.
- 11. La proteína mutante según la reivindicación 10, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F es la secuencia de la SEC ID NO: 78.
- 30 12. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 y 7 a 10, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:
- 35 - al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:
  - la sustitución del aminoácido en la posición 147 por un aminoácido hidrófobo,
  - la sustitución del aminoácido en la posición 158 por un aminoácido hidrófobo;
- y
- 40 - al menos otra mutación de post-fusión, a saber la sustitución del aminoácido en la posición 463 por un aminoácido hidrófobo, preferentemente V, I o L, más preferiblemente V.
- 13. La proteína mutante según la reivindicación 1, caracterizada por que la secuencia de dicha proteína F es una 45 proteína F de PIV-2.
- 14. La proteína mutante según la reivindicación 13, caracterizada por que la secuencia de dicha proteína F consiste en:
- 50 - la secuencia de la SEC ID NO: 33, o en  
- una secuencia variante de esta secuencia de SEC ID NO: 33, esta secuencia variante:
  - \* es de un tamaño idéntico al de la SEC ID NO: 33, o es de un tamaño superior en un máximo de 2 aminoácidos al de la SEC ID NO: 33, o es de un tamaño inferior en un máximo de 2 aminoácidos al de la SEC ID NO: 33, y
  - 55 \* presenta una identidad de la secuencia de más del 95%, preferiblemente de al menos el 96%, más preferiblemente de al menos el 97%, con respecto a la secuencia de la SEC ID NO: 33, siendo esta identidad calculada sobre la longitud de la secuencia de SEC ID NO: 33.
- 60 15. La proteína mutante según la reivindicación 13 o 14, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:
  - sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 53, por el aminoácido A, o 65 por

- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 406, 151, 162 y 474, por los aminoácidos A, V, V y V, respectivamente, o por
- 5 - sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 53, 406, 151, 162 y 474, por los aminoácidos A, A, V, V y V, respectivamente, o por
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 406, por el aminoácido A, o por
- 10 - sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 151, por el aminoácido V, respectivamente, o por
- sustitución del aminoácido que, en la secuencia de dicha proteína F, está en la posición 162, por el aminoácido V, respectivamente, o por
- 15 - sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 151 y 162, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por
- sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 151 y 474, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por
- 20 - sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 162 y 474, por los aminoácidos V y V, respectivamente, o por
- 25 - sustitución de los aminoácidos que, en la secuencia de dicha proteína F, están en las posiciones 151, 162 y 474, por los aminoácidos V, V y V, respectivamente.
- 16. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizada por que su secuencia en aminoácidos no comprende otra mutación con respecto a dicha secuencia de la proteína F de PIV-2.
- 30 17. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:
  - al menos una mutación de pre-fusión seleccionada de entre:
    - 35 - la sustitución del aminoácido en la posición 53 por el aminoácido A,
    - la sustitución del aminoácido en la posición 406 por el aminoácido A,
    - la sustitución del aminoácido en la posición 428 por el aminoácido P,
    - la sustitución del aminoácido en la posición 445 por el aminoácido P,
  - 40 y/o por
  - al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:
    - 45 - la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,
    - la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo.
- 18. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 y 17, caracterizada por que dicha secuencia que difiere de la de dicha proteína F difiere además por:
  - 50 - al menos una mutación de post-fusión seleccionada de entre:
    - la sustitución del aminoácido en la posición 151 por un aminoácido hidrófobo,
    - la sustitución del aminoácido en la posición 162 por un aminoácido hidrófobo;
  - 55 y
  - al menos otra mutación de post-fusión, a saber la sustitución del aminoácido en la posición 474 por un aminoácido hidrófobo, preferentemente V, I o L, más preferiblemente V.
  - 60
- 19. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 7, 10, 12, 17, 18, caracterizada por que dicho aminoácido hidrófobo se selecciona de entre V, I, L, preferiblemente V.
- 65 20. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizada por que comprende una secuencia que difiere de la de la proteína F de un virus PIV-5 o PIV-2 por sustitución del sitio de escisión nativo de

dicha proteína F por otro sitio de escisión enzimático, y/o por inserción en dicha proteína F de un sitio de escisión enzimático diferente del sitio de escisión nativo de esta proteína F.

- 5 21. La proteína mutante según la reivindicación 20, caracterizada por que dicho sitio de escisión diferente del sitio de escisión nativo es un sitio de escisión específico de tejido.
22. La proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizada por que es fusogénica.
- 10 23. Ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, o ácido nucleico complementario de tal ácido nucleico.
24. Vector de transfección, transducción o transformación, que comprende al menos un ácido nucleico según la reivindicación 23.
- 15 25. El vector de expresión según la reivindicación 24, caracterizado por que es un vector adenoviral oncolítico.
26. Célula, caracterizada por que comprende al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, y/o al menos un ácido nucleico, ADN o ARN según la reivindicación 23, y/o al menos un vector según la reivindicación 24 o 25.
- 20 27. Una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, un ácido nucleico, ADN o ARN según la reivindicación 23, un vector según la reivindicación 24 o 25, una célula según la reivindicación 26, para una utilización en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado neoplásico, preferiblemente de un tumor metastásico, preferiblemente de un melanoma metastásico.
- 25 28. Una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, un ácido nucleico, ADN o ARN según la reivindicación 23, un vector según la reivindicación 24, una célula según la reivindicación 26, para una utilización en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una deficiencia del desarrollo placentario.
- 30 29. Inhibidor de la fusión celular, caracterizado por que es:
- un anticuerpo dirigido contra una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, o un fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub> de tal anticuerpo,
  - 35 - un ácido nucleico aptámero o un péptido aptámero que se une específicamente a al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, o a un ácido nucleico, ADN, ARN según la reivindicación 23,
  - una célula del sistema inmunitario recombinante, preferiblemente una célula dendrítica recombinante, que expresa en su superficie al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22,
  - 40 - un ácido nucleico anti-sentido de un ácido nucleico según la reivindicación 23,
  - un pequeño ARN interferente (*small interfering RNA; siRNA*) que comprende un ARN bicatenario de 19 a 22 nucleótidos, capaz de unirse a un ácido nucleico según la reivindicación 23.
  - 45
30. La célula según la reivindicación 26, que es una célula del sistema inmunitario humano o animal no humano, preferiblemente una célula dendrítica humana o animal no humana, expresando dicha célula en su superficie al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
- 50 31. El inhibidor de fusión celular según la reivindicación 29, para una utilización en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, siendo dicha enfermedad o estado una infección por virus con envoltura (preferiblemente una infección por VIH y/o *Influenza* y/o *Parainfluenza* y/o *Rhabdovirus*), una alergia, una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto.
- 55 32. Una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para una utilización a título de agente inmunógeno en el tratamiento y/o la prevención y/o la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, siendo dicha enfermedad o estado una infección por virus con envoltura (preferiblemente una infección por VIH y/o *Influenza* y/o *Parainfluenza* y/o *Rhabdovirus*), una alergia, una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto.
- 60 33. Vacuna destinada al tratamiento y/o a la prevención y/o a la paliación de una enfermedad o de un estado que implique un exceso de fusogenicidad celular, siendo dicha enfermedad o estado una infección por virus con envoltura (preferiblemente una infección por VIH y/o *Influenza* y/o *Parainfluenza* y/o *Rhabdovirus*), una alergia, una enfermedad autoinmune o un rechazo de injerto, caracterizada por que comprende al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
- 65

- 5 34. Método *in vitro* para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad que implique una formación insuficiente, o por el contrario excesiva, de sincitio, caracterizado por que comprende la detección en una muestra biológica de al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 o de al menos un ácido nucleico según la reivindicación 23.
- 10 35. Método *in vitro* para el cribado de un compuesto capaz de disminuir o bloquear la formación de sincitio, caracterizado por que comprende la puesta en contacto de un compuesto candidato con unas células que expresan al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, a fin de determinar si este compuesto candidato disminuye o bloquea la fusión de dichas células.
- 15 36. Célula tumoral, más particularmente mieloma, que comprende al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, preferiblemente que comprende al menos tal proteína mutante en su superficie, y/o que comprende al menos un ácido nucleico según la reivindicación 23, y/o que comprende al menos un vector según la reivindicación 24.
- 20 37. La célula tumoral, más particularmente el mieloma, según la reivindicación 36, para una utilización en la producción de un hibridoma.
- 25 38. Hibridoma, caracterizado por que comprende al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, y/o al menos un ácido nucleico según la reivindicación 23, y/o al menos un vector según la reivindicación 24.
- 30 39. Célula madre o progenitora, que presenta una capacidad de diferenciación en célula muscular, caracterizada por que comprende al menos una proteína mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, preferiblemente que comprende al menos tal proteína mutante en su superficie, y/o que comprende al menos un ácido nucleico según la reivindicación 23, y/o que comprende al menos un vector según la reivindicación 24, no siendo dicha célula una célula embrionaria humana.
40. La célula madre o progenitora de la reivindicación 39, para una utilización como célula madre o progenitora de fibra muscular.

ES 2 541 921 T3

>F PIV-5 cepa WR (529aa) (GenBank AB021962')

```

MGTIIQFLVV  SCLLAGAGSL  DLAALMQIGV  IPTNVRQLMY  YTEASSAFIV  VKLMPTIDSP  60
ISGCNITSIS  SYNATVTKLL  QPIGENLETI  RNQLIPTRRR  RRFAGVVIGL  AALGVATAAQ  120
VTAVALVKA   NENAAAAILNL  KNAIQKT_NAA  VADVVOAT_QS  LGTAVQAVQD  HINSVVSPAII  180
TAANCKAQD   AIIGSILNLYL  TELTTIFHNQ  ITNPALSPIT  IQALRILLGS  TLPTVVEKSF  240
NTQISAAELL  SSGLLTGQIV  GLDLTYMQMV  IKIELPTLTV  QPATQIIDLA  TISAFINNQE  300
VMAQLPTRVM  VTGSLIQAYP  ASQCTITPNT  VYCRYNDAQV  LSDDTMAQLQ  GNLTRCTFSP  360
VVGSLFTRFV  LFDGIVYANC  RSMLCKCMQP  AAVILQPSSS  PVTVIDMYKC  VSLQLDNLRF  420
TITQLANVTY  NSTIKLESSQ  ILPIDPLDIS  QNLAAVNKSL  SDALQHLAQS  DTYLSAITSAA  480
TTTSVLSIIA  ICLGSLGLLIL  IILLSVVVWK  LLTIVAANRN  RMENFVYHK   529
  
```

SEC ID NO: 31 (secuencia de la proteína F de PIV-5 de referencia)

```

30          a tgggtactat tattcaattt ctggtggtct
61 cctgtctatt ggcaggagca ggcagccttg atctagcagc cctcatgcaa atcggtgtca
121 ttccaacaaa tgtccggcaa cttatgtatt atactgaggc ctcatcggca ttcattggtg
181 tgaagttaat gcctacaatt gactcgccga ttagtggatg taatataaca tcaatttcaa
241 gctataatgc aacagtgaca aaactcctac agccgatcgg tgagaatttg gagacgatta
301 ggaaccagtt gattccaact cggagaagac gccggtttgc aggggtggtg attggattag
361 ctgcattagg agtagctact gccgcacagg tcaactgccg agtagcacta gtaaaggcaa
421 atgaaaatgc tgcggctata ctcaatctca aaaatgcaat ccaaaaaaca aatgcagcag
481 ttgcagatgt ggtccaggcc acacaatcac taggaacggc agttcaagca gttcaagatc
541 acataaacag tgtggtgaagt ccagcaatta cagcagccaa ttgtaaggcc caagatgcta
601 tcattggctc aatcctcaat ctctatttga ccgagttgac aaccatcttc cacaatcaaa
661 ttacaaaacc tgcattgagt cccattacaa ttcaagcttt aaggatccta ctggggagta
721 ccttgccgac tgtggtcgaa aaatctttca ataccagat aagtgcagct gagcttctct
781 catcagggtt attgacaggc cagattgtgg gattagattt gacctatagc cagatggtca
841 taaaaattga gctgccaact ttaactgtac aacctgcaac ccagatcata gatctggcca
901 ccatttctgc attcattaac aatcaagaag tcatggcca attaccaaca cgtgttatgg
961 tgactggcag cttgatccaa gcctatcccg catcgcaatg caccattaca cccaacactg
1021 tgtactgtag gtataatgat gcccaagtac tctcagatga tactatggct tgcctccaag
1081 gtaacttgac aagatgcacc ttctctccag tggttgggag ctttctcact cgattcgtgc
1141 tgttcgatgg aatagtttat gcaaattgca ggtcgatgtt gtgcaagtgc atgcaacctg
1201 ctgctgtgat cctacagccg agttcatccc ctgtaactgt cattgacatg tacaaatgtg
1261 tgagtctgca gcttgacaat ctcagattca ccactactca attggccaat gtaacctaca
1321 atagcaccat caagcttgaa tcatcccaga tcttgcttat tgatccgttg gatatatccc
1381 agaactctagc tgcggtgaat aagagtctaa gtgatgcact acaacactta gcacaaagtg
1441 acacatatct ttctgcaatc acatcagcta cgactacaag tgtattatcc ataatagcaa
1501 tctgtcttgg atcgttagggt ttaatattaa taactcttgc cagtgtagtt gtgtggaagt
1561 tattgaccat tgctgctgct aatcgaaata gaatggagaa ttttgtttat cataaataa
  
```

// SEC ID NO: 30

(secuencia CDS: secuencia de ácidos nucleicos que codifican la proteína F de PIV-5 referenciada bajo SEC ID NO: 31)

Figura 1A

ES 2 541 921 T3

>F hPIV-2 cepa Greer (551 aa) (Genbank genoma completo [NC\\_003443](#))

```

MHHLHPMIVC IFVMYTGIVG SDAIAGDQLL NIGVIQSKIR SLMYYTDGGA SFIVVKLLPN 60
LPPSNGTCNI TSLDAYNVTI FKLLTPLIEN LSKISTVTDI KTRQKRFAGV VVGLAALGVA 120
TAAQITAAVA IVKANANAAA INNLIASSIQS TNKAVSDVID ASRTIATAVQ AIQDRINGAI 180
VNGITSASCR AHDALIGSIL NLYLTELTTI FHNQITNPAL TPLSIQALRI LLGSTLPIVI 240
ESKLNTNFNT AELLSSGLLT GQIISISPMY MQMLIQINVP TFIMQPGAKV IDLIAISANH 300
KLQEVVVQVP NRILEYANEL QNYPANDCVV TPNSVFCRYN EGSPIPESQY QCLRGNLNSC 360
TFTPIIGNFL KRFAFANGVL YANCKSLLCR CADPPHVVSQ DDTQGISIID IKRCSEMMLD 420
TFSFRITSTF NATYVTDSSM INANIVHLSP LDLSNQINSI NKSLKSAEDW IADSNFFANQ 480
ARTAKTLYSL SAIALILSVI TLVVVGLLIA YIIKLVSQIH QFRSLAATM FHRENPAFFS 540
KNNHGNIYGI S 551

```

SEC ID NO: 33 (secuencia de la proteína F de PIV-2 de referencia)

```

4789 at gcatcacctg
4801 catccaatga tagtatgcat ctttggtatg tacactggaa ttgtaggttc agatgccatt
4861 gctggagatc aactacttaa tataggggtc attcaatcaa agataagatc actcatgtac
4921 tatactgatg gtggtgctag ctttattggt gtaaaattgc tacctaactc tcccccaagc
4981 aatggaacat gcaacatcac cagtctagat gcatataatg ttaccctatt taagttacta
5041 acacccctga ttgagaacct gagtaaaatt tccactgtta cagataccaa aaccgcgcaa
5101 aaacgatttg caggagtagt tgttgactt gctgcattag gagtagccac agccgcacaa
5161 ataactgcag ctgtagcaat agtgaaagct aatgcaaatg ctgctgcgat aaacaatctt
5221 gcatcttcaa ttcaatccac caacaaggca gtatccgatg tgatagatgc atcaagaaca
5281 attgcaaccg cagttcaagc aattcaggat cgcataatg gagctattgt taatgggata
5341 acatctgcat catgccgtgc ccatgatgca ctcatgggtt caatattaaa tctttatctc
5401 actgagetta ccacaatatt tcataatcaa ataacaaacc ctgcgctgac accactctcc
5461 atccaagctt taagaatcct cctcggtagc accttgccaa ttgtcattga gtccaaactc
5521 aacacaaact tcaacacagc agagctgctc agttccggac tgtaactgg tcaaataatt
5581 tccatttccc caatgtacat gcaaatgcta attcaaatca atgttccgac atttataatg
5641 caaccgggtg cgaaggtaat tgatctaatt gctatctccg caaacataa attgcaagaa
5701 gtggttgtag aagttccgaa taggattcta gagtatgcaa atgaactaca aaattaccca
5761 gccaatgact gtgtcgtgac accgaactct gtattttgta gatacaatga gggttccctt
5821 atccctgaat cacaatatca atgcttgagg gggaatctta attcctgcac ttttaccctt
5881 attatcggga actttcttaa gegattcgca tttgctaatg gtgtgctcta tgccaactgc
5941 aatctttgct tatgtagggtg tgccgacccc ccccatgttg tatcccagga tgatacccaa
6001 ggcatcagca taattgatat taagagatgc tctgagatga tgcttgacac tttttcattt
6061 aggatcacat ctactttcaa tgctacgtac gtgacagact tctcaatgat taatgcaaat
6121 attgtacatc taagtctctc agatttgctc aatcaaatca attcaataaa caaatctctt
6181 aaaagtgtct aggattggat tgcagatagc aacttctttg ctaatcaagc caggacagcc
6241 aagacacttt attcactaag tgcaatagca ttaatactat cagtgattac tttgggtgct
6301 gtgggattgc tgattgcta catcatcaag ctgggttctc aatccatca attcagatcg
6361 ctagctgcta caacaatggt ccacagggaa aatcctgcct tcttttccaa gaataacct
6421 ggaacatat atgggatatc ttaa

```

// SEC ID NO: 32 (secuencia CDS: secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína F de PIV-2 referenciada bajo SEC ID NO: 33)

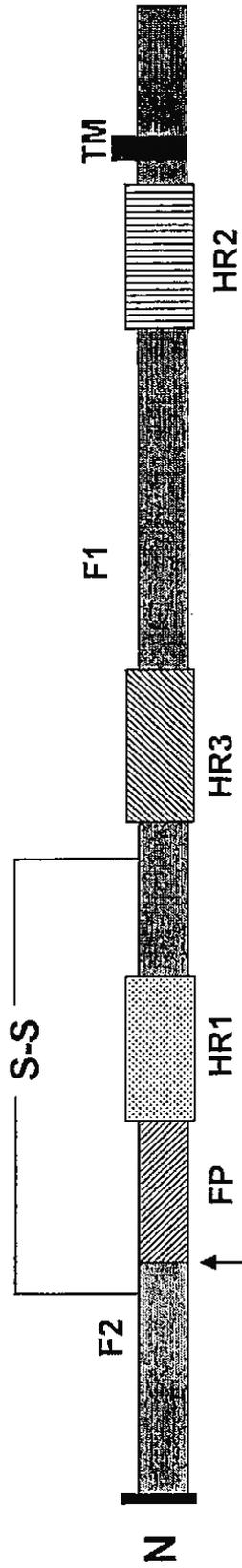
Figura 1B



ES 2 541 921 T3

F de PIV-5 (SEC ID NO: 31)	F de hPIV-2 (SEC ID NO: 33)
L22P	I24P
K132E	K133E
V290A	I294A
S443P	S428P
L447P	I445P
I449P	S439P
V402A	I406A
I49A	I53A
T147V	T151V
T158V	S162 V
A463V	S474V

Figura 2B



IGENLE<sup>1</sup>TIRNQLI<sup>2</sup>PT<sup>3</sup>RRRR<sup>4</sup>RFAGV<sup>5</sup>IGL<sup>6</sup>

TPRRIT

Sitio natural F PIV5 (furinas)

Sitio de escisión / MMP-9

(SEC ID NO: 28)

**P . X . X . Hy . S / T**

Sitio consenso MMP-9

(SEC ID NO:27)

Figura 3

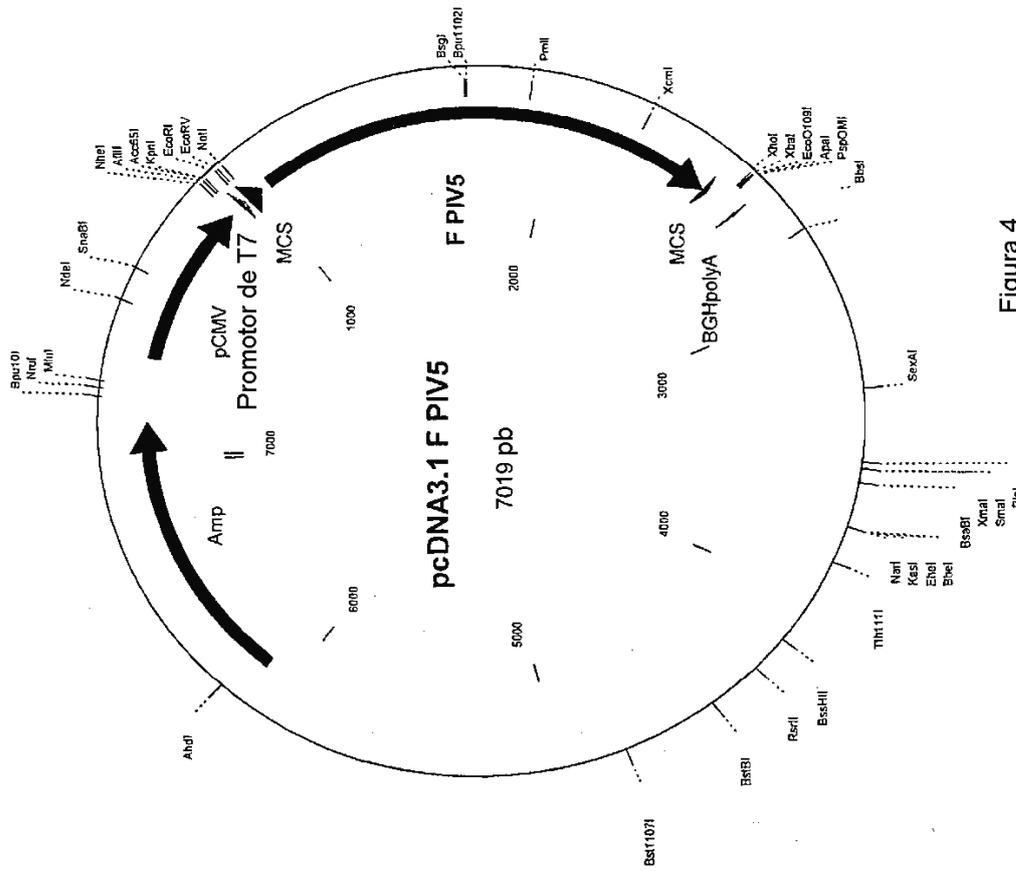


Figura 4

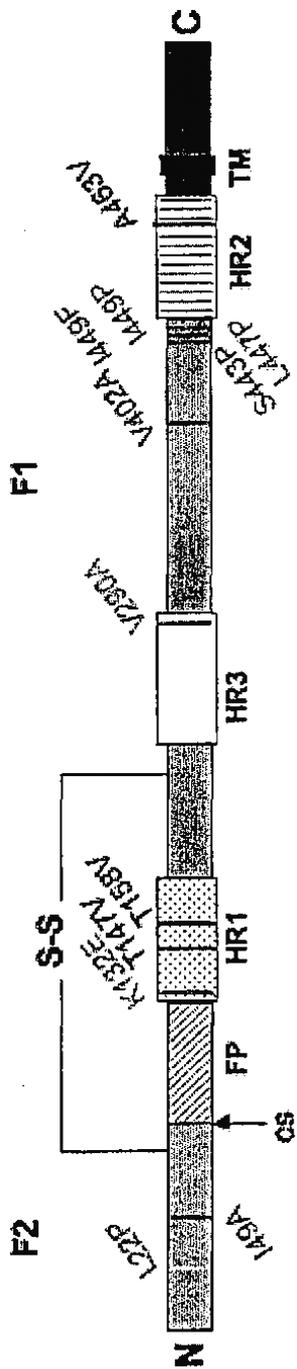


Figura 5A

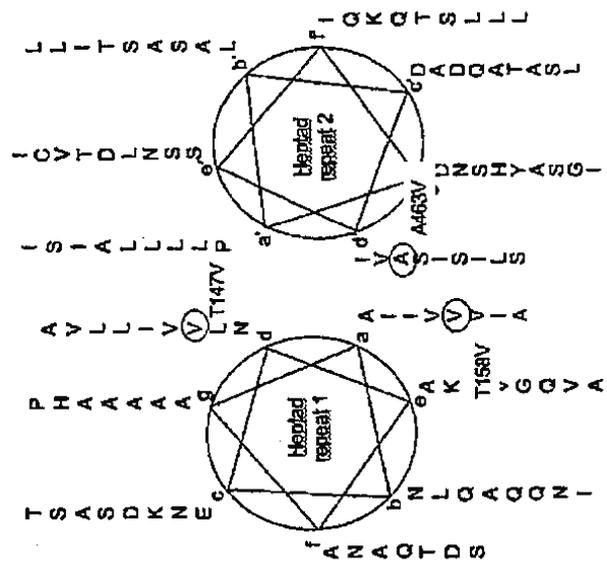


Figura 5B

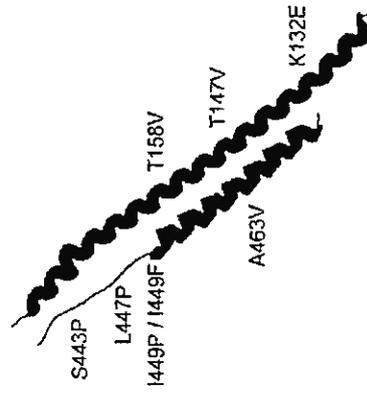


Figure 5D

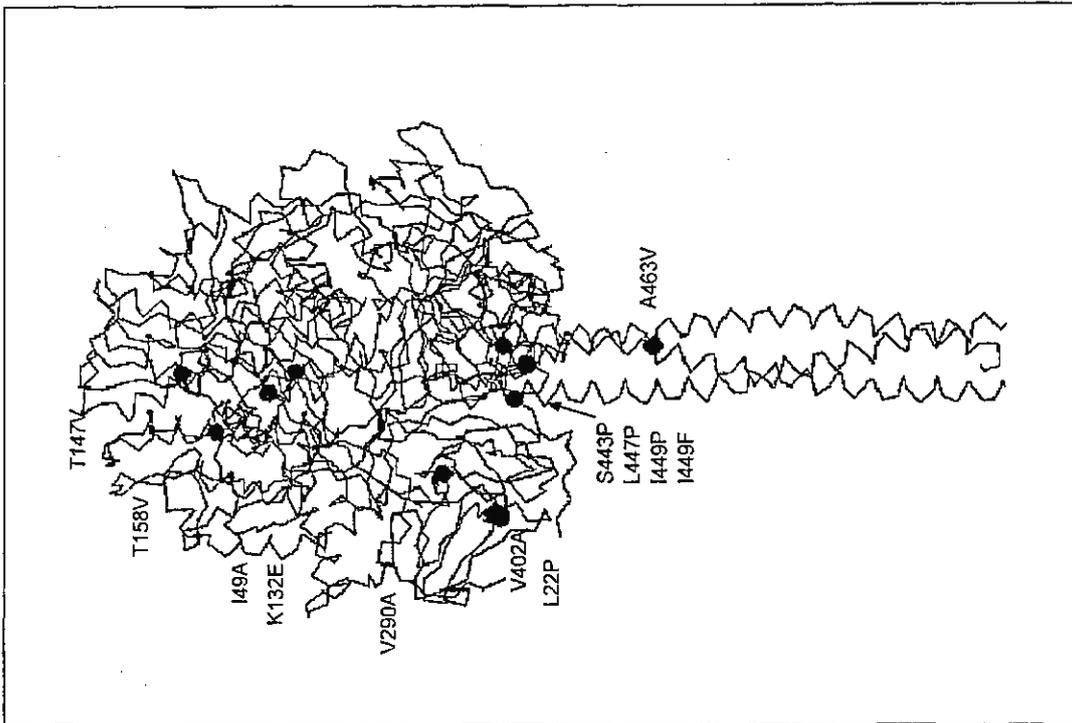


Figure 5C

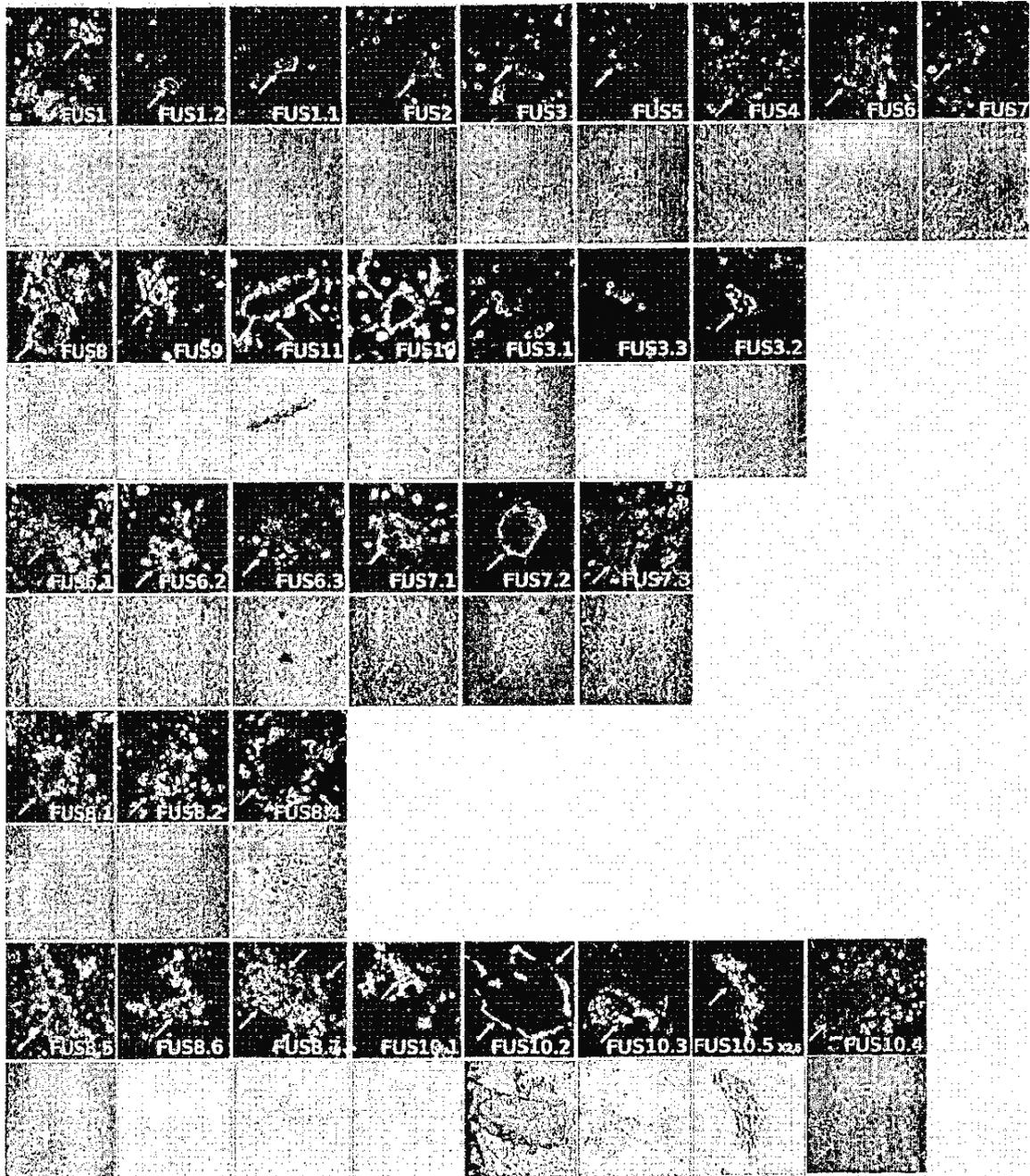


Figura 6A



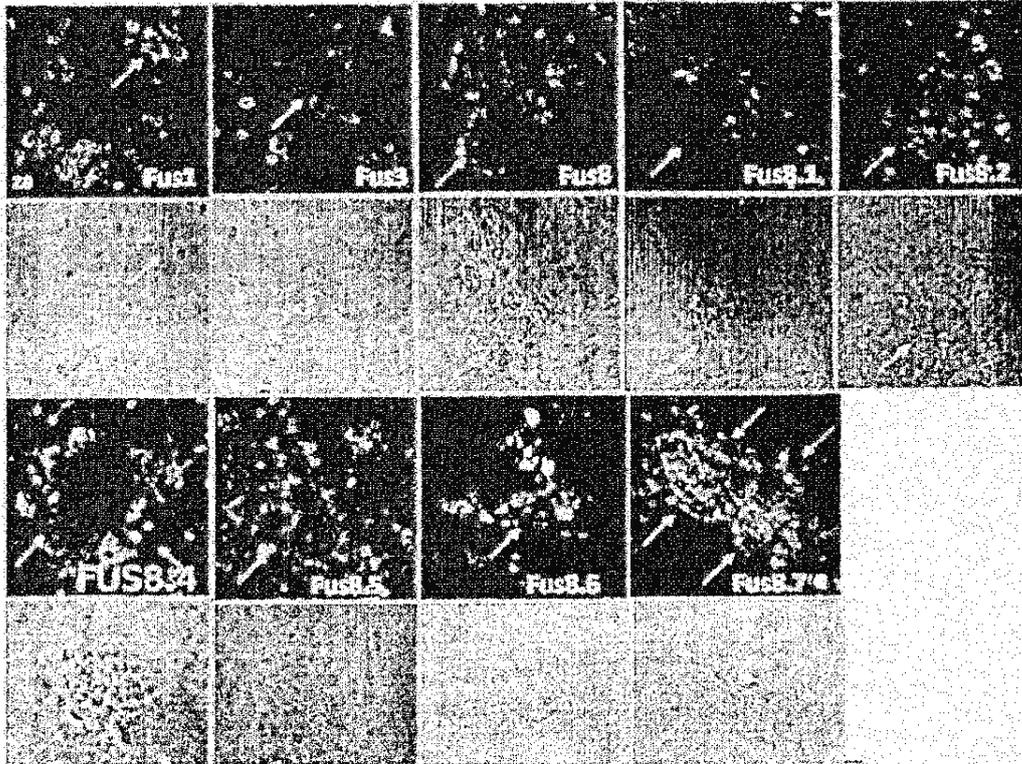


Figura 7A

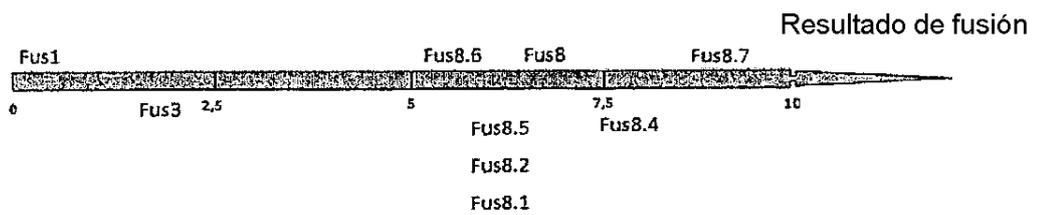


Figura 7B

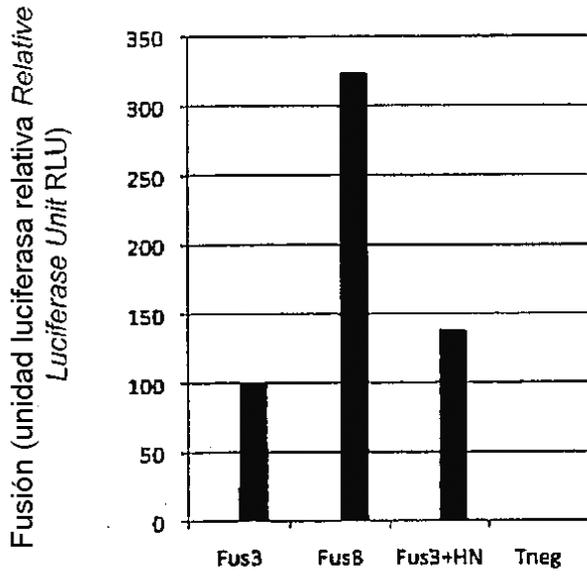


Figura 8A

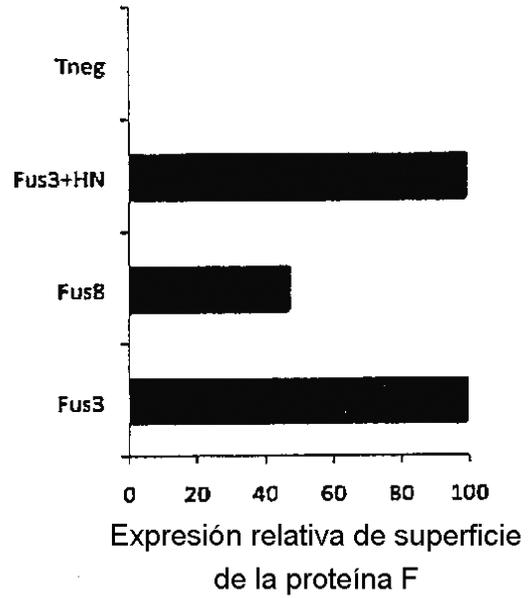


Figura 8B

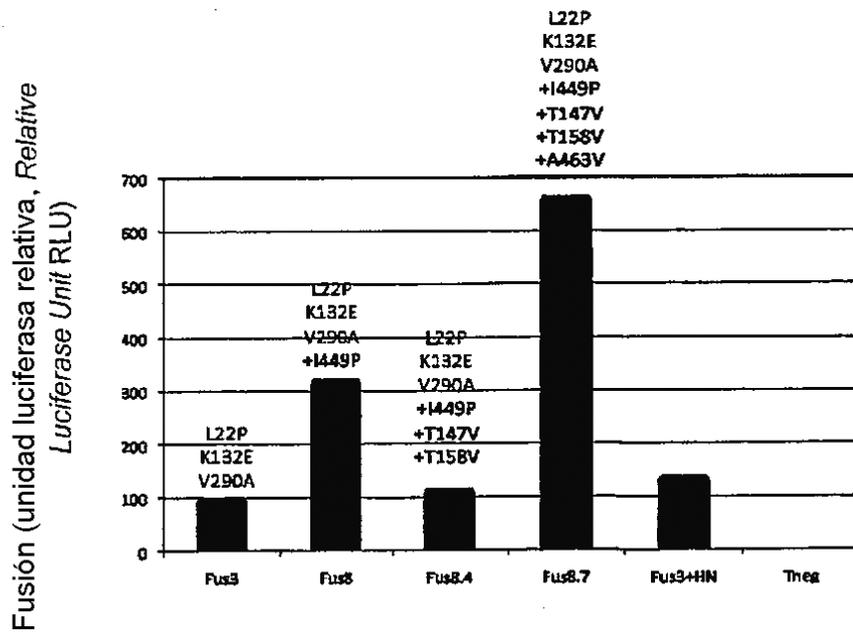


Figura 8C

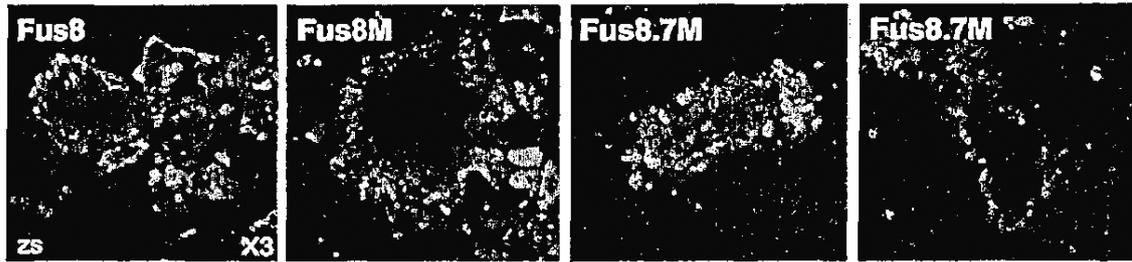


Figura 9