

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-509077

(P2012-509077A)

(43) 公表日 平成24年4月19日 (2012.4.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/115 (2006.01)	C O 7 K 14/115	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 M	4 C O 8 4
C O 7 K 14/08 (2006.01)	C O 7 K 14/08	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 77 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-536919 (P2011-536919)
 (86) (22) 出願日 平成21年11月17日 (2009.11.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年7月20日 (2011.7.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2009/001318
 (87) 国際公開番号 W02010/058100
 (87) 国際公開日 平成22年5月27日 (2010.5.27)
 (31) 優先権主張番号 08/06547
 (32) 優先日 平成20年11月21日 (2008.11.21)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 500174661
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・レシエ
 ルシュ・サイエンティフィック・セ・エン
 ・エール・エスー
 フランス・F-75794・パリ・セデッ
 クス・16・リュ・ミシエール・アンジュ・
 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P I V-5 及び P I V-2 の F タンパク質の突然変異タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、5型PIV (PIV-5またはPIV5) 及び2型PIV (PIV-2またはPIV2) として現在表示されるパラインフルエンザウイルス (PIV) の融合タンパク質 (F タンパク質) の突然変異タンパク質に関する。本発明は、それらに由来する生成物、たとえば、核酸、ベクター、細胞；抗体、アプタマー、干渉RNAの融合阻害剤；骨髓腫、ハイブリドーマ；幹細胞及び前駆細胞などに関する。また本発明は、医学的及び生物工学的適用において使用するための、前記突然変異タンパク質及びそれらに由来する生成物に関する。

【選択図】 なし。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

突然変異タンパク質であって、該アミノ酸配列が、

・置換：

○PIV-5 F タンパク質の配列中の22位のアミノ酸、又は、PIV-2 F タンパク質の配列中の24位のアミノ酸の、アミノ酸 P による置換；及び

○PIV-5 F タンパク質の配列中の132位のアミノ酸、又は、PIV-2 F タンパク質の配列中の133位のアミノ酸の、アミノ酸 E による置換；及び

○PIV-5 F タンパク質の配列中の290位のアミノ酸、又は、PIV-2 F タンパク質の配列中の294位のアミノ酸の、アミノ酸 A による置換；及び

○PIV-5 F タンパク質の配列中の449位のアミノ酸、又は、PIV-2 F タンパク質の配列中の439位のアミノ酸の、アミノ酸 P による置換；

・並びに、任意に：

○前記 F タンパク質の天然の切断サイトの、他の酵素的切断サイトによる置換、及び／又は、前記 F タンパク質の天然の切断サイト以外の酵素的切断サイトの、前記 F タンパク質への挿入；及び／又は

○前記 F タンパク質の C ー末端部分であって、該タンパク質の C ー末端にある最後のアミノ酸から N ー末端方向に伸張するが、前記 F タンパク質の HR2 ドメインを超えては伸張しない C ー末端部分の欠失；

によって、PIV-5 又は PIV-2 ウイルスの F タンパク質の配列から導き出される (derivable) 配列を含む突然変異タンパク質。

【請求項 2】

PIV-5 又は PIV-2 ウイルスの前記 F タンパク質の配列が、配列番号 34 の配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 3】

前記 F タンパク質の配列が PIV-5 の F タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 4】

前記 F タンパク質の配列が、

・配列番号 31 の配列、又は、443 位のアミノ酸が (配列番号 31 の P の代わりに) S であることを除いて配列番号 31 の配列と同じである代替配列；又は

・この配列番号 31 の配列又は前記代替配列の変異配列であって、

○配列番号 31 のものと同じサイズであるか、又は、配列番号 31 のものより最大で 7 アミノ酸だけ大きいサイズであるか、又は、配列番号 31 のものより最大で 7 アミノ酸だけ小さいサイズであり；及び

○配列番号 31 の配列又は前記代替配列に対して、95% を超える配列同一性、好ましくは少なくとも 96%、より好ましくは少なくとも 97% の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号 31 の配列の長さ、又は、適切であれば前記代替配列の長さを用いて算出される、変異配列；

から成ることを特徴とする、請求項 3 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 5】

前記 F タンパク質は、配列番号 35 から 46 の配列の一つから成ることを特徴とする、請求項 4 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 6】

そのアミノ酸配列が前記 PIV-5 F タンパク質配列に対して他の突然変異を含まないことを特徴とする、請求項 3 ～ 5 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 7】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号 65 の配列であることを特徴とする、請求項 6 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 8】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

- 49位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；
- 402位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；
- 443位のアミノ酸のアミノ酸 P による置換；
- 447位のアミノ酸のアミノ酸 P による置換；

及び／又は

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

- 147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

10

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 9】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

- 49位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；
- 402位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

及び／又は

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

- 147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

20

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 10】

前記疎水性アミノ酸が、V、I、Lから選択され、好ましくはVであることを特徴とする、請求項 8 又は 9 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 11】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

- 147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

30

及び

・○少なくとも一つの他の融合後突然変異、即ち、463位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換、好ましくはV、I又はL、より好ましくはVによる置換；

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8～10 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 12】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号67～79の配列から選択される配列であることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8～11 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

40

【請求項 13】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- 147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

から選択される少なくとも一つの融合後突然変異によって前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8～12 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 14】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号68～79の配列から選択される配列であることを特徴とする、請求項 13 に記載の突然変異タンパク質。

50

【請求項 15】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - 49位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；
 - 402位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - 158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8～11 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

10

【請求項 16】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号68、69、70の配列から選択される配列である、請求項 15 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 17】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- 147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8～11 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

20

【請求項 18】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号76、78の配列から選択される配列である、請求項 17 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 19】

前記 F タンパク質の配列がPIV-2 F タンパク質である、請求項 1 又は 2 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 20】

前記 F タンパク質の配列が、

- ・配列番号33の配列；又は
- ・配列番号33の配列の変異配列であって、

30

○配列番号33の配列と同じサイズであるか、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ大きいサイズであるか、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ小さいサイズであり；及び

○配列番号33の配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号33の配列の長さを用いて算出される、変異配列から成ることを特徴とする、請求項 19 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 21】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号90～103の配列から選択される配列である、請求項 19 又は 20 に記載の突然変異タンパク質。

40

【請求項 22】

そのアミノ酸配列が、前記PIV-2 F タンパク質配列に対して他の突然変異を含まないことを特徴とする、請求項 19 又は 20 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 23】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - 53位アミノ酸のアミノ酸 A による置換；
 - 406位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；
 - 428位のアミノ酸のアミノ酸 P による置換；
 - 445位のアミノ酸のアミノ酸 P による置換；

50

及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項19又は20に記載の突然変異タンパク質。

【請求項24】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - 53位のアミノ酸のアミノ酸Aによる置換；
 - 406位のアミノ酸のアミノ酸Aによる置換；

及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項19、20、23の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項25】

前記疎水性アミノ酸が、V、I、Lから選択され、好ましくはVである、請求項23又は24に記載の突然変異タンパク質。

【請求項26】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

及び

・少なくとも一つの他の融合後突然変異、即ち、474位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換、好ましくはV、I又はL、より好ましくはVによる置換；
 によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項19、20、23～25の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項27】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

から選択される少なくとも一つの融合後突然変異によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項19、20及び23～26の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項28】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - 53位のアミノ酸のアミノ酸Aによる置換；
 - 406位のアミノ酸のアミノ酸Aによる置換；

及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項19、20及び23～27の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項29】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換

によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項19、20及び23～28の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項30】

前記Fタンパク質の天然の切断サイトの、他の酵素的切断サイトによる置換によって、及び／又は、前記Fタンパク質の天然の切断サイト以外の酵素的切断サイトの、前記Fタンパク質への挿入によって、PIV-5又はPIV-2ウイルスのFタンパク質の配列から導き出される配列を含むことを特徴とする、請求項1～29の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

10

【請求項31】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、組織特異的切断サイトであることを特徴とする、請求項30に記載の突然変異タンパク質。

【請求項32】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、一または複数の腫瘍組織によって酵素特異的に発現される切断サイトであることを特徴とする、請求項30又は31に記載の突然変異タンパク質。

【請求項33】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、一または複数の転移性組織によって特異的に発現される酵素の切断サイトであることを特徴とする、請求項30～32のいずれか一項に記載の突然変異タンパク質。

20

【請求項34】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、金属プロテアーゼの切断サイトであることを特徴とする、請求項30～33のいずれか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項35】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、マトリクス金属プロテアーゼ9（MMP-9）の切断サイトであることを特徴とする、請求項30～34のいずれか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項36】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、配列PXXHyS/T（配列番号27）を含み、ここで、X＝任意のアミノ酸であり、Hy=F、M、V、L、Iから選択される任意のアミノ酸であることを特徴とする、請求項30～35のいずれか一項に記載の突然変異タンパク質。

30

【請求項37】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、配列PRRIT（配列番号28）及び／又は配列IGENLETIRNQLIPTPRRITFAGVVIGL（配列番号29）を含むことを特徴とする、請求項30～36のいずれか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項38】

配列番号88又は89の配列を含むことを特徴とする、請求項30～37の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項39】

請求項1～38の何れか一項に記載の突然変異タンパク質をコードする、核酸、DNA若しくはRNA、又はそのような核酸の相補的核酸。

40

【請求項40】

請求項39に記載の少なくとも一つの核酸を含む、トランスフェクション、形質導入又は形質転換ベクター。

【請求項41】

発現ベクターであることを特徴とする、請求項40に記載のベクター。

【請求項42】

アデノウイルスベクターであることを特徴とする、請求項41に記載の発現ベクター。

【請求項43】

50

前記核酸の発現を制御するためのエレメントを含み、且つ、腫瘍細胞、好ましくは転移性細胞、より好ましくは転移性黒色腫細胞中の前記核酸の発現を可能にする、アデノウイルスベクターであることを特徴とする、請求項 4 1 又は 4 2 に記載の発現ベクター。

【請求項 4 4】

腫瘍崩壊性のアデノウイルスベクターであることを特徴とする、請求項 4 1 ～ 4 3 の何れか一項に記載の発現ベクター。

【請求項 4 5】

動物細胞、好ましくはヒト細胞、特にヒト腫瘍細胞、好ましくは転移性ヒト細胞のゲノムへの、より好ましくは転移性黒色腫細胞への、前記少なくとも一つの核酸の挿入を可能にするベクターであることを特徴とする、請求項 4 0 に記載のベクター。

10

【請求項 4 6】

請求項 1 ～ 3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び／又は、請求項 3 9 に記載の核酸、DNA又はRNAの少なくとも一つ、及び／又は、請求項 4 0 ～ 4 5 の何れか一項に記載の少なくとも一つのベクターを含むことを特徴とする細胞。

【請求項 4 7】

ヒト細胞又は非ヒト動物細胞であることを特徴とする、請求項 4 6 に記載の細胞。

【請求項 4 8】

腫瘍細胞であり、好ましくは転移性細胞であり、より好ましくは転移性黒色腫細胞である、請求項 4 6 又は 4 7 に記載の細胞。

【請求項 4 9】

疾病又は腫瘍形成状態、好ましくは転移性腫瘍、好ましくは転移性黒色腫の、治療及び／又は予防及び／又は緩和において使用するための、請求項 1 ～ 3 8 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質、請求項 3 9 に記載の核酸、DNA又はRNA、請求項 4 0 ～ 4 5 の何れか一項に記載のベクター、請求項 4 6 ～ 4 8 の何れか一項に記載の細胞。

20

【請求項 5 0】

胎盤の発達不全の治療及び／又は予防及び／又は緩和において使用するための、請求項 1 ～ 3 8 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質、請求項 3 9 に記載の核酸、DNA又はRNA、請求項 4 0 ～ 4 5 の何れか一項に記載のベクター、請求項 4 6 ～ 4 8 の何れか一項に記載の細胞。

【請求項 5 1】

細胞融合の阻害剤であって、

- ・請求項 1 ～ 3 8 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質に対して作られた抗体、又は、該抗体のFab又はF(ab')₂断片；
- ・請求項 1 ～ 3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質に、又は請求項 3 9 に記載の核酸、DNA、RNAに、特異的に結合する核酸アプタマー又はペプチドアプタマー；
- ・請求項 1 ～ 3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現する、組換え免疫系細胞、好ましくは組換え樹状細胞；
- ・請求項 3 9 に記載の核酸のアンチセンス核酸；
- ・19～22のヌクレオチドを含む二重鎖RNAを含み、かつ請求項 3 9 に記載の核酸に結合できる、低分子干渉RNA、siRNA；

であることを特徴とする阻害剤。

30

40

【請求項 5 2】

請求項 4 6 の細胞であって、ヒト又は非ヒト動物の免疫系の細胞、好ましくはヒト又は非ヒト動物の樹状細胞であり、請求項 1 ～ 3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現する細胞。

【請求項 5 3】

過剰な細胞の膜融合性 (cellular fusogenicity) を含む疾病又は状態の治療及び／又は予防及び／又は緩和において使用するための、請求項 5 1 の細胞融合阻害剤であって、前記疾病又は状態が、エンベロープに包まれたウイルスの感染 (好ましくはHIV及び／又

50

はインフルエンザ及び／又はパラインフルエンザ及び／又はラブドウイルスの感染)、アレルギー、自己免疫疾患又は移植片拒絶である、細胞融合阻害剤。

【請求項 5 4】

過剰な細胞の膜融合性を含む疾病又は状態の、治療及び／又は予防及び／又は緩和において免疫原性剤として使用するための、請求項 1～3 8 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質であって、前記疾病又は状態が、エンベロープに包まれたウイルスの感染(好ましくはHIV及び／又はインフルエンザ及び／又はパラインフルエンザ及び／又はラブドウイルス感染)、アレルギー、自己免疫疾患又は移植片拒絶である、突然変異タンパク質。

【請求項 5 5】

過剰な細胞の膜融合性を含む疾病又は状態の治療及び／又は予防及び／又は緩和のためのワクチンであって、前記疾病又は状態がエンベロープに包まれたウイルスの感染(好ましくはHIV及び／又はインフルエンザ及び／又はパラインフルエンザ及び／又はラブドウイルス感染)、アレルギー、自己免疫疾患又は移植片拒絶であり、少なくとも請求項 1～3 8 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 5 6】

不十分な又は対照的に過剰なシンシチウムの形成を伴う疾病の診断又は予後のためのインビトロでの方法であって、請求項 1～3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質又は請求項 3 9 に記載の少なくとも一つの核酸の、生物学的サンプル中における検出を含むことを特徴とするインビトロでの方法。

【請求項 5 7】

シンシチウムの形成を減少させるか又は遮断することのできる化合物をスクリーニングするためのインビトロでの方法であって、候補化合物を、該候補化合物が前記細胞の融合を減少させるか又は遮断するかどうかを決定するために、請求項 1～3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質に接触させることを含むことを特徴とするインビトロでの方法。

【請求項 5 8】

請求項 1～3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質を含み、好ましくは、該少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面上に含み、及び／又は、請求項 3 9 に記載の少なくとも一つの核酸を含み、及び／又は、請求項 4 0、4 1 及び 4 5 の何れか一項に記載の少なくとも一つのベクターを含む、腫瘍細胞、特に骨髓腫。

【請求項 5 9】

ハイブリドーマの産生において使用するための、請求項 5 8 に記載の腫瘍細胞、特に骨髓腫。

【請求項 6 0】

請求項 1～3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び／又は、請求項 3 9 に記載の少なくとも一つの核酸、及び／又は、請求項 4 1 及び 4 5 の何れかに記載の少なくとも一つのベクターを含むことを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項 6 1】

筋細胞への分化能力を有する幹細胞又は前駆細胞であって、請求項 1～3 8 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質を含み、好ましくは該少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面上に含み、及び／又は、請求項 3 9 に記載の少なくとも一つの核酸を含み、及び／又は、請求項 4 0、4 1 及び 4 5 の何れか一項に記載の少なくとも一つのベクターを含むことを特徴とし、前記細胞はヒト胚細胞ではない、幹細胞又は前駆細胞。

【請求項 6 2】

筋繊維幹細胞又は前駆細胞としての使用のための、請求項 6 1 の幹細胞又は前駆細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、現在、5 型PIV (PIV-5又はPIV5) 及び 2 型PIV (PIV-2又はPIV2) として表示さ

10

20

30

40

50

れている、パラインフルエンザウイルス（PIV）の融合タンパク質（Fタンパク質）の突然変異タンパク質に関する。

【0002】

本願は、それらに由来する生成物、例えば：

- ・核酸、ベクター、細胞；
- ・抗体、アダプター、干渉RNAタイプの融合阻害剤；
- ・骨髄腫、ハイブリドーマ；
- ・幹細胞及び前駆細胞

に関する。

【0003】

本願はまた、医学的及び生物工学的な適用において使用するための、これらの突然変異タンパク質及びそれらに由来する生成物に関する。

【背景技術】

【0004】

現在、5型PIV（PIV-5又はPIV5）として表示されているパラインフルエンザウイルス（PIV）は、パラミクソウイルス科のルブラウイルス属のエンベロープに包まれたウイルスである。PIV-5は、最初にサル細胞の初代培養物から単離されたため、従来はSV5（シミアンウイルス5）という名で知られていた。しかしながら、PIV-5の自然な宿主はイヌであると思われ、イヌにおいてケンネルコフ（kennel cough）として知られる咳を引き起こす。

【0005】

その後に、幾つかのPIV-5単離体が、ヒトから収集されたが動物細胞で培養されたサンプルから得られた。さらに、ヒトにおいては、何の症状又は疾病もPIV-5に付随しなかった。このように、ヒトが実際にPIV-5の宿主であるかどうかという問題は今なお熱く討論されている。

【0006】

何れにせよ、PIV-5ウイルスは現在、動物ウイルスであると考えられている。

【0007】

2型PIV（PIV-2又はPIV2）として現在表示されているパラインフルエンザウイルス（PIV）もまた、パラミクソウイルス科のルブラウイルス属のエンベロープに包まれたウイルスである。

【0008】

現在、PIV-2のヒト単離体のみが同定されており（hPIV-2）、そのため、PIV-2はヒトウイルスであると考えられている。

【0009】

PIV-5及びPIV-2ウイルスは、核酸配列、タンパク質配列、組織、構造及び形態の点から互いに極めて類似している。

【0010】

ヒトパラインフルエンザウイルスの中で、PIV-2は、ヒトにおいて発見されたPIV-5に最も近いウイルスである。

【0011】

PIV-2は、PIV-5のヒト同等物であると考えることができ、少なくとも本発明者らによってそのように考えられている。

【0012】

PIV-5又はPIV-2による感染は、シンシチウムとして知られる多核性構造体の形成を導き、これは、感染した宿主由来の細胞が融合した結果である。

【0013】

PIV-5及びPIV-2ウイルスは、ウイルスエンベロープと細胞膜との融合によって宿主細胞へ入る。

【0014】

この融合は、赤血球凝集素ノイラミニダーゼ結合タンパク質（HN）及び融合タンパク質（F）の二つのウイルス糖タンパク質を関与させる。

【0015】

PIV-5及びPIV-2の融合タンパク質Fは、単純な前駆体（F0）の形態で合成され、グリコシル化ホモトリマーの形態である。PIV-5及びPIV-2の融合タンパク質Fは、ジスルフィド架橋を介して連結した二つのサブユニット（大カルボキシ末端サブユニットF1及び小アミノ末端サブユニットF2）から成る「前活性化」形態を生成するために、ホストのフューリン（furines）によるタンパク分解性の切断を必要とする。

【0016】

サブユニットF1は、疎水性融合ペプチド（FP）並びにコイルドコイル型のコンフォメーションを有する二つの7アミノ酸繰り返しドメイン（heptade repeat domains）（HR-1及びHR-2）で構成される。HNによる活性化の後、融合タンパク質は、一連のコンフォメーション変化を起こし、結果として、融合ペプチドの標的細胞膜への挿入を生じる。次に、HR-1及びHR-2ドメイン間の相互作用が生じ、ウイルスエンベロープを細胞膜に近づける（Russell et al, 2006）。これらのドメインは、三つのHR-1ドメインが三つのHR-2ドメインに非平行配向で連結された三量体コイルドコイル構造で構成された6らせん体の極めて安定な束を形成することが知られている。このコンフォメーションは、Fタンパク質の融合後形態を表す（Baker et al, 1999, Sergel-Germano et al, 2000, West et al, 2005）。

【0017】

PIV-5及びPIV-2の融合タンパク質Fは、融合の促進のために、同じウイルス型に由来するHNタンパク質を必要とする（Yao et al, 1997）。しかしながら、FとHNの間に存在する相互作用の詳細な性質は未だに正しく知られていない。

【0018】

しかし、幾つかの研究が、PIV-5及びPIV-2のある株が、融合を引き起こすためのHNの必要性において相違していることを示している。

【0019】

例として、Ito et al (1997) は、そのFタンパク質が3つのアミノ酸（残基22、443及び516）によってのみ相違している「SV5」（PIV-5）の二つの株、即ち、W3A及びWRを開示している。W3A株のFタンパク質は、自律的な（autonomous）様式で、即ち、HNタンパク質の非存在下で融合を誘導することができ、一方、WR株のFタンパク質はその能力を有していない。

【0020】

Ito et al (1997) は、WR株のFタンパク質の膜融合（fusogenic）活性が、このタンパク質の22位のアミノ酸をアミノ酸プロリンで置換することによって回復され得ることを示している。

【0021】

Ito et al (2000) は、W3A及びWR株のFタンパク質の132位のアミノ酸E及び290位のアミノ酸Aが、これらの株のFタンパク質がHNタンパク質に自律的である能力に関与し得ることを示唆している。

【0022】

Paterson et al (2000) は、W3A株のFタンパク質の22位のアミノ酸プロリンの存在、及び、WR株のFタンパク質のアミノ酸443の存在が、これらのウイルス株の膜融合能力を上昇させ得ることを示している。

【0023】

Russell et al (2003) は、W3A株のFタンパク質の残基L447及びI449を芳香族アミノ酸によって置換することにより、このウイルス株のFタンパク質の膜融合活性が上昇され得ることを示している。

【0024】

Gardner及びDutch (2007) は、野生型「SV5」（PIV-5）ウイルスのFタンパク質の突然

10

20

30

40

50

変異 I 4 9 A が、膜融合促進効果 (pro-fusogenic effect) を有するであろうことを示している。

【 0 0 2 5 】

Gardner et al (2007) は、野生型「SV5」 (PIV-5) ウイルスの F タンパク質の突然変異 V 4 0 2 A が、膜融合促進効果を有するであろうことを示している。

【 0 0 2 6 】

タンパク質 PIV-2 に関しては、このウイルスの F タンパク質の配列に突然変異を導入し、それによって自律性及び膜融合能力を上昇させるタイプの試みを記載した従来技術文献は見当たらない。

【 0 0 2 7 】

さらに、インフルエンザタンパク質 HA1/HA2、ラブドウイルス G タンパク質、又は HIV の gp41/gp120 タンパク質などの融合能力を有するウイルスタンパク質が他に多くある。

【 0 0 2 8 】

これらの種々のウイルスタンパク質の膜融合性能力及び自律性に関する現在の知識は、今なお極めて限られている。

【 0 0 2 9 】

いずれにせよ、ウイルス融合タンパク質に関する現在の知識は、有効な医学的及び／又は生物工学的適用を構想するのに十分な技術的ノウハウを提供しない。

【発明の概要】

【 0 0 3 0 】

本発明者らは、高い膜融合性であり、且つ、その融合能力における実質的な自律性を示す融合タンパク質を利用可能にすることが、幾つかの医学的及び生物工学的な状況の解決を提供し得ると考えた。

【 0 0 3 1 】

本発明者らは、従って、例えばインフルエンザの HA1/HA2 タンパク質、ラブドウイルスの G タンパク質、又は HIV の gp41/gp120 タンパク質などの、他の一連のウイルス融合タンパク質から、PIV-5 及び／又は PIV-2 の F タンパク質を精選して選択した。

【 0 0 3 2 】

次いで、本発明者らは、HN タンパク質の非存在下における膜融合能力を有する突然変異 F タンパク質を構築及び生産した。

【 0 0 3 3 】

本発明の突然変異タンパク質は、高い膜融合能力と高い自律性を有することが証明された。それらは、細胞融合を誘導するために HN タンパク質の存在を必要とせず、また、シンシチウムの形成を必要としなかった。

【 0 0 3 4 】

また、本発明者らは、これらの突然変異タンパク質に、F タンパク質が天然の状態で示しているものとは異なる切断サイト、より具体的には組織特異的切断サイトを導入することが可能であることを示した。

【 0 0 3 5 】

また、本発明者らは、本発明の突然変異タンパク質及び／又はそれらに由来するか又はそれらから得られる生成物の医学的適用 (治療的、予防的、緩和的、また診断的) 及び／又は生物工学的適用を提案する。

【 0 0 3 6 】

より具体的には、本発明者らは、癌 (より具体的には転移性の癌、好ましくは転移性黒色腫) 又は胎盤の発達不全などの、シンシチウムの形成を誘導または増加することが望まれる疾病又は機能障害を生体内で又は生体外で治療、予防又は緩和するための、本発明の突然変異タンパク質又はそれらをコードする核酸の使用を提案する。

【 0 0 3 7 】

本発明者らはさらに、エンベロープに包まれたウイルスの感染、アレルギー、自己免疫疾患又は移植片拒絶などの、シンシチウムの形成を阻害又はブロックすることが望まれる

10

20

30

40

50

疾病又は機能障害を生体内で又は生体外で治療、予防又は緩和するための、抗体、組換え樹状細胞、アンチセンス、siRNA、核酸アプタマーなどの、PIV-5及び／又はPIV-2のFタンパク質をブロックする薬剤を提案する。

【0038】

本発明者らはさらに、シンシチウムの過剰な形成、又は反対に不十分な形成を検出するための診断手段を提案する。

【0039】

本発明者らはさらに、他の生物工学的手段、特に、シンシチウムの形成を減少させることができる活性成分をスクリーニングするための手段を提案する。

【0040】

本発明者らはさらに、本発明の突然変異タンパク質を含む、癌細胞、より具体的には骨髄腫を提案する。本発明者らはさらに、本発明の突然変異タンパク質を含むハイブリドーマを提案する。本発明の癌細胞、より具体的には骨髄腫は、ポリエチレングリコール(PEG)も、エレクトロポレーションも、他のいずれの融合誘導手段も用いることなく、別の細胞と、より具体的にはBリンパ球と融合することができる。本発明の癌細胞、より具体的には骨髄腫は、自律的な融合能力を有する。

【0041】

本発明のハイブリドーマは、ポリエチレングリコール(PEG)も、エレクトロポレーションも、他のいずれの融合誘導手段も必要とせずに、(Bリンパ球の骨髄腫への)融合によって生産され得る。本発明のハイブリドーマは、本発明の少なくとも一つの癌細胞、より具体的には少なくとも一つの骨髄腫を用いることによって実際に生産され得る。

【0042】

本発明者らはさらに、本発明の突然変異タンパク質を発現する組換え幹細胞又は前駆細胞、及び、筋繊維の生産におけるそれらの適用を提案する。

【0043】

本発明の他の側面は、下記の「詳細な説明」の項において説明される。

【図面の簡単な説明】

【0044】

ファイルされた出願の図面セットは、カラーでファイルされた。これは、特許庁でファイルを閲覧することによりアクセスすることができる。

【図1A】PIV-5のFタンパク質の基準配列(配列番号31;WR単離体のFタンパク質の配列)及び対応するCDS配列(配列番号30;配列番号31のタンパク質をコードする核酸配列)。配列番号31の配列において、ボールドで下線付きの文字は、以下の位置のアミノ酸を示す: - 22 (L)、 - 49 (I)、 - 132 (E、この単離体に予め存在する突然変異)、 - 147 (T)、 - 158 (T)、 - 290 (A、この単離体に予め存在する突然変異)、 - 402 (V)、 - 443 (P、この単離体に理論的に予め存在する突然変異)、 - 447 (L)、 - 449 (I)、及び - 463 (A)。

【図1B】PIV-2のFタンパク質の基準配列(配列番号33;Greer単離体のFタンパク質の配列)及び対応するCDS配列(配列番号32;配列番号33のタンパク質をコードする核酸配列)。配列番号33の配列において、ボールドで下線付きの文字は、以下の位置のアミノ酸を示す: - 24 (I)、 - 53 (I)、 - 133 (K)、 - 151 (T)、 - 162 (S)、 - 294 (I)、 - 406 (A)、 - 428 (S)、 - 439 (S)、 - 445 (I)、 - 474 (S)。

【図2A】PIV-2のFタンパク質(配列番号33のアミノ酸8~533)に対するPIV-5のFタンパク質(配列番号31のアミノ酸4~529)のアラインメント:これら2つのタンパク質の間で、タンパク質同一性は47.7%である。このアラインメントから得られるコンセンサス配列は、配列番号34として参照される。

【図2B】PIV-5のFタンパク質のアミノ酸及び突然変異に対応する、PIV-2のFタンパク質のアミノ酸及び突然変異。

【図3】PIV-5のFタンパク質の天然の切断サイト(配列番号23)の、組織特異的切断サイト、この場合、転移性腫瘍組織により特異的に発現される酵素、すなわちマトリクス金

10

20

30

40

50

属プロテアーゼ9 (MMP-9) のサイトによる置換の図解。 MMP-9サイトのコンセンサスサイト：配列番号27の配列 (PXXhyS/Tサイト、ここで、X = 任意のアミノ酸、及びHy = 任意の疎水性アミノ酸、すなわちF、M、V、L、Iから選択される任意のアミノ酸)。 MMP-9サイトの例示的配列：配列番号28の配列、配列番号29の配列。

【図4】PIV-5のFタンパク質をコードする配列がクローニングされているプラスミドpcDNA3.1の構造。 Amp：アンピシリン耐性遺伝子 pCMV：サイトメガロウイルスプロモーター MCS：マルチプルクローニングサイト F PIV5：PIV-5のFタンパク質 BGHpolyA：ウシ成長ホルモンpolyA。

【図5A】PIV-5のFタンパク質において本発明者らにより作成された突然変異の視覚化。

【図5B】PIV-5のFタンパク質において本発明者らにより作成された突然変異の視覚化。

【図5C】PIV-5のFタンパク質において本発明者らにより作成された突然変異の視覚化。

【図5D】PIV-5のFタンパク質において本発明者らにより作成された突然変異の視覚化。

【図6A】半定量的融合テストの間に行われた顕微鏡観察の写真 (本発明者らにより作成された突然変異体の大きな一群)。

【図6B】半定量的融合テストの後に得られた融合スコアを示す図 (本発明者らにより作成された突然変異体の大きな一群)。

【図7A】半定量的融合テストの間に行われた顕微鏡観察の写真 (本発明者らにより作成された突然変異体の選択物)。

【図7B】半定量的融合テストの後に得られた融合スコアを示す図 (本発明者らにより作成された突然変異体の選択物)。

【図8A】定量的融合テストの結果(本発明者らにより作成された突然変異体の選択物)。

【図8B】定量的融合テストの結果(本発明者らにより作成された突然変異体の選択物)。

【図8C】定量的融合テストの結果(本発明者らにより作成された突然変異体の選択物)。

【図9】PIV-5 タンパク質の天然の切断サイト以外の切断サイトを有する、本発明の突然変異タンパク質について免疫蛍光法を用いて作製した共焦点顕微鏡観察の図 (本発明の突然変異タンパク質 Fus8M及びFus8.7M、これは、配列番号28の切断サイト MMP-9による、天然の切断サイトの置換によって、本発明の突然変異タンパク質 Fus8及びFus8.7と相違する)。

【詳細な説明】

【0045】

本願発明において、「タンパク質」という用語は、「糖タンパク質」という用語をその範囲に包含する。これは特に、実際に糖タンパク質であるFタンパク質及びHNタンパク質の場合である。

【0046】

PIV-5及びPIV-2のFタンパク質 (非突然変異タンパク質)：

PIV-5のFタンパク質の配列を図1Aに示す (配列番号31のタンパク質配列；配列番号30のコーディング核酸配列)。これは、サル単離体 (isolate) であるWR単離体の配列である。それらの配列は、ジーンバンクデータベースから受入れ番号AB021962により入手可能である。

【0047】

本発明者らがATCCから入手し、下記の実施例に記載した突然変異タンパク質の構築及び生産に用いたWR単離体のサンプルは、しかしながら、Fタンパク質の443位において、(ジーンバンクから入手可能な配列の点から見て予想されるものとは対照的に) アミノ酸Pを有しておらず、アミノ酸Sを有している。従って、このWR単離体のFタンパク質の代替配列は、443位のアミノ酸がSでありPではないことを除いて、配列番号31の配列と同一である。簡略のために、ここではこの代替配列を「443位にSを有する配列番号31」

10

20

30

40

50

と記載する。

【0048】

配列番号31の配列及び代替配列「443位にSを有する配列番号31」、好ましくは代替配列「443位にSを有する配列番号31」は、本特許出願の文脈においては、PIV-5のFタンパク質のための基準配列として作用する。

【0049】

しかしながら、WR単離体以外の単離体、特に、

- ・例えばW3A単離体などの他のサル単離体；
- ・他の非ヒト動物からの単離体、例えば、

○イヌ単離体、例えば、イヌ単離体CPI+、CPI-、H221、78524、
T1； 10

○ブタ単離体、例えば、ブタ単離体SER；

- ・ヒトから採取されたサンプルに由来するが、動物細胞で培養された（上記導入部分を参照）「ヒト」単離体と名付けられた単離体、例えば、MIL単離体、DEN単離体、LN単離体、MEL単離体、及びWO 02 077211において「クリプトウイルス」と記載されている単離体；

が明らかに存在する。

【0050】

それらの種々のPIV-5単離体のFタンパク質の配列における変異は極めてわずかである

。

20

【0051】

それらの変異の記述は、Chatziandreou et al, (2004)（その内容並びに特に表3及び該論文中でそれに付随しているコメントは、参照により本特許出願に援用される）によって与えられる。

【0052】

該論文の表3をここに再現する：

【表 A - 1】

表 1 (Chatziandreou et al,2004 による論文からの再現) :

株													aa
W3A (配列 番号 35)	WR (配列 番号 31)	MIL (配列 番号 36)	DEN (配列 番号 37)	LN (配列 番号 38)	MEL (配列 番号 39)	クリプトウ イルス (配列番号 40)	CPI+ (配列 番号 41)	CPI- (配列 番号 42)	H221 (配列 番号 43)	78524 (配列 番号 44)	T1 (配列 番号 45)	SER (配列 番号 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
S							P	P					71
V											M		76
N									Y	Y	Y		92

10

20

30

40

【表 A - 2】

表 1 (続き) :

株													aa
W3A (配列 番号 35)	WR (配列 番号 31)	MIL (配列 番号 36)	DEN (配列 番号 37)	LN (配列 番号 38)	MEL (配列 番号 39)	クリプトウ イルス (配列番号 40)	CPI+ (配列 番号 41)	CPI- (配列 番号 42)	H22I (配列 番号 43)	78524 (配列 番号 44)	T1 (配列 番号 45)	SER (配列 番号 46)	
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

10

20

30

40

【表 A - 3】

表 1 (続き) :

株												aa
W3A (配列 番号 35)	WR (配列 番号 31)	MIL (配列 番号 36)	DEN (配列 番号 37)	LN (配列 番号 38)	MEL (配列 番号 39)	クリプトウ イルス (配列番号 40)	CPI+ (配列 番号 41)	CPI- (配列 番号 42)	H221 (配列 番号 43)	78524 (配列 番号 44)	T1 (配列 番号 45)	SER (配列 番号 46)
V												M
Y									F	F		
M							I	I				
Y						H	H	H				
N						D						
F							L	L				
V											I	
S						T	T	T	T	T	T	T
S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
H							N	N				
I												M
L		F	F	F	F							
L							S	S				

10

20

30

40

【表 A - 4】

表 1 (続き) :

株													aa
W3A (配列 番号 35)	WR (配列 番号 31)	MIL (配列 番号 36)	DEN (配列 番号 37)	LN (配列 番号 38)	MEL (配列 番号 39)	クリプトウ イルス (配列番号 40)	CPI+ (配列 番号 41)	CPI- (配列 番号 42)	H221 (配列 番号 43)	78524 (配列 番号 44)	T1 (配列 番号 45)	SER (配列 番号 46)	
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
停止	停止	Q				S	S	S	S	S	S	S	530
		H					Y	Y					533
		S			停止	P							535
		Q				R	R	R	R	R	R	R	536

aa:アミノ酸の位置

上記の表 1 において、空欄は、関係する F タンパク質が左側のカラムに示されている W 3 A 株の F タンパク質と同じアミノ酸を有することを示す。その位置がこの表に明確に収載されていないアミノ酸ももちろん、W 3 A の F タンパク質の配列中におけるそれらに対応するものと同じである。それらのアミノ酸自体は、WR 単離体の F タンパク質についての配列中におけるそれらに対応するものと同じである（配列番号 31 の配列を参照）。

【 0 0 5 4 】

それ故、配列番号 35～46 の配列は、表 1 に示された配列番号 31 のアミノ酸の配列中の、それらの配列のそれぞれの置換（及び、適切であれば、示された配列番号 31 のアミノ酸の配列の C ー末端部分における付加）の結果の配列である。

【 0 0 5 5 】

W 3 A 単離体の F タンパク質、並びに、上記の他の単離体の F タンパク質は、

- ・ 147 位における、アミノ酸 T ；
- ・ 158 位における、アミノ酸 T ；
- ・ 447 位における、アミノ酸 L ；及び
- ・ 449 位における、アミノ酸 I

を有する。

【 0 0 5 6 】

このように、W 3 A 及び WR 単離体は、他の単離体において 5 2 9 位を超えて伸長する細胞質伸長（cytoplasmic extension）を有さない。関係する単離体に依存して、この細胞質伸長は、2 から 7 のアミノ酸を含有する。

【 0 0 5 7 】

また、それらの単離体の F タンパク質の配列は、WR 株の F タンパク質の配列と比較して 5 % 未満（特には、最大で 3 %）で変化していることが分かる（細胞質伸長を考慮にいない、即ち、この割合は WR の F タンパク質の長さから算出される）；Chatziandreu et al.（2004）による論文の第 85 頁の終わりを参照されたい。

【 0 0 5 8 】

PIV-5 の F タンパク質は、従って、

- ・ 配列番号 31 の配列、又は前記代替配列「443 位に S を有する配列番号 31」；又は
- ・ この配列番号 31 の配列又は前記代替配列「443 位に S を有する配列番号 31」の変異配列であって、

○配列番号 31 のものと同じサイズであるか、又は、配列番号 31 のものより最大で 7 アミノ酸だけ小さいサイズであるか、又は、配列番号 31 のものより最大で 7 アミノ酸だけ大きいサイズであり〔前記代替配列「443 位に S を有する配列番号 31」は、配列番号 31 の配列と同じサイズである〕、好ましくは配列番号 31 のものと同じサイズを有し、又は、配列番号 31 のものより最大で 7 アミノ酸だけ大きい；及び

○配列番号 31 の配列又は前記代替配列「443 位に S を有する配列番号 31」に対して、9 5 % を超える配列同一性、好ましくは少なくとも 9 6 %、より好ましくは少なくとも 9 7 % の配列同一性を有する（この同一性は、配列番号 31 の配列又は適切であれば前記代替配列「443 位に S を有する配列番号 31」の配列の長さを用いて算出される）、として定義され得る変異配列；

【 0 0 5 9 】

配列番号 31 の PIV-5 の F タンパク質についての変異配列は、特に、上記の単離体 W 3 A、M I L、D E N、L N、M E L、クリプトウイルス、C P I +、C P I −、H 2 2 1、7 8 5 2 4、T 1 及び S E R の F タンパク質についての配列を含む（上記表 1 及び Chatziandreu et al.（2004）の論文を参照されたい）。

【 0 0 6 0 】

同様に、本願において PIV-2 F タンパク質のための基準として作用する配列は、図 1 B に提示された Greer 株の配列である（配列番号 33 のタンパク質配列、配列番号 32 のコーディング核酸配列）。

10

20

30

40

50

【0061】

例えば、V98、V94 Toshiba 単離体などのGreer 単離体以外のPIV-2 単離体があることが明らかである。

【0062】

それらの他のPIV-2単離体のFタンパク質の配列は、Greer単離体のものと極めて近いが、単離体間の変異である幾つかの小さい変異を有する。

【0063】

それ故、PIV-2 Fタンパク質は、

- ・配列番号33の配列；又は
- ・配列番号33の配列の変異配列であって、

10

○配列番号33の配列と同じサイズであるか、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ小さいサイズであるか、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ大きいサイズであり、好ましくは配列番号33のものと同じサイズを有し、好ましくは配列番号33のものと同じサイズが同じである；及び

○配列番号33の配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有する（この同一性は、配列番号33の配列の長さを用いて算出される）

で定義される変異配列；

から成りうる。

【0064】

20

PIV-5(配列番号31)のFタンパク質の配列をPIV-2(配列番号33)のものにおいてアラインメントした結果のコンセンサス配列(配列番号34)は、以下の通りであり、図2Aに見出される。このコンセンサス配列は、以下のように書き換えられる。

【化1】

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

30

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-----

40

-ID---C---LD---F-IT---N-TY-----I---PLD-S---

---NKSL--A---A-S-----A-T---LS-1A-L-----L----L

L-----KL-----R-----H- (配列番号34)

【0065】

シンボル「-」は、PIV-5のFタンパク質とPIV-2のFタンパク質がその位置において異

50

なるアミノ酸を有することを示す。

【0066】

このコンセンサス配列は、以下のように形式化することもできる：

【化2】

```

IXXXVXXXXXXXXGXXXXXXXXLXXIGVIXXXRXLMYYTXXXXXFIVVKL
XPXXXXXXXXCNITSXXYNXTXXKLLXPXXENLXXIXXXXXXXXXXRRF
AGVVXGLAALGVATAAQXTAAVAXVKANXNAAIIXNLXXXIQXTNXAVXD
VXAXXXXXXTAVQAXQDXINXXXXXITXAXCXAXDAXIGSILNLYLTEL
TTIFHNQITNPALXPVXIQUALRILLGSTLPXVXEXXNTXXXXAEELLSSG
LLTGQIXXXXXXYMQMXIXIXPTXXXXQPXXXXIDLXXISAXXXXQEVXX
QXPXRXXXXXXXXXQXYPAXXCXXTPNXVXCRYNXXXXXXXXXXXXCLXGNL
XXCTFXPXXGXFLXRFXXXXGXXYANCXSXLCXCXXPXXVXXQXXXXXXXX
XIDXXXCXXXXLDXXFXITXXNXNTYXXXXXXXXXXXXIXXXXPLDXSXXX
XXXNKSLLXAXXXXAXSXXXXXXXXXXAXTXXXLSXIXLXXXXLXXXXL
LXXXXXKLXXXXXXXXRXXXXXXXXXHX (配列番号34)

```

ここで、x = 任意のアミノ酸である。

【0067】

PIV-5のWR単離体のFタンパク質の配列は、N-末端においてアミノ酸MGTにより先行される配列番号34の配列である（図1A及び2Aを参照）。

【0068】

PIV-2のGreer単離体のFタンパク質の配列は、N-末端においてアミノ酸MHHLHPM（配列番号86）により先行され、C-末端においてアミノ酸ENPAFFSKNNHGN IYGIS（配列番号87）が続く配列番号34の配列である（図1B及び2Aを参照）。

【0069】

PIV-5及びPIV-2のFタンパク質の配列は、配列番号34の配列を含む配列であり、好ましくは配列番号34の配列を含むPIVウイルスのFタンパク質の配列であると考えられ得る。より具体的には、PIV-5及びPIV-2のFタンパク質の配列は、以下のように考えられ得る：

a) 配列番号34の配列：

・ N-末端において3～7のアミノ酸によって先行され、特にはN-末端において3アミノ酸（例えばMGT）に先行され又は7アミノ酸（例えばMHHLHPM）に先行され；及び

・ 任意に、C-末端において18アミノ酸が続き、特にはC-末端においてアミノ酸ENPAFFSKNNHGN IYGISが続き；又は

b) 上記a) で記載された配列の変異配列であって、

・下記の何れか：

i. 配列番号31のものと同一サイズを有するか、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ小さいサイズであるか、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ大きいサイズであり；及び好ましくは配列番号31のものと同一サイズを有し、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ大きいサイズである；及び

ii. 配列番号31の配列又は前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有する（この同一性は、配列番号31の配列の長さ、又は、適切であれば前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の長さを用いて算出される）；

・又は：

i. 配列番号33のものと同一サイズを有するか、又は、配列番号33のものより最大で2アミノ酸だけ小さいサイズであるか、又は、配列番号33のものより最大で2アミノ酸だけ大きいサイズであるか、好ましくは配列番号33のものと同一サイズを有する；及び

ii. 配列番号33の配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有する（この同一性は、配列番号33の配列の長さを用いて算出される）；

である変異配列。

【0070】

本発明の突然変異タンパク質：

本願は、突然変異タンパク質であって、該アミノ酸配列が、

・置換：

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の22位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の24位のアミノ酸の、アミノ酸Pによる置換(PIV-5のFにおける突然変異22P；PIV-2のFにおける突然変異24P)；及び

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の132位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の133位のアミノ酸の、アミノ酸Eによる置換(PIV-5のFにおける突然変異132E；PIV-2のFにおける突然変異133E)；及び

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の290位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の294位のアミノ酸の、アミノ酸Aによる置換(PIV-5のFにおける突然変異290A；PIV-2のFにおける突然変異294A)；及び

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の449位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の439位のアミノ酸の、アミノ酸Pによる置換(PIV-5のFにおける突然変異449P；PIV-2のFにおける突然変異439P)；

・並びに、任意に：

○前記Fタンパク質の天然の（又は自然な）切断サイトの、他の酵素的切断サイトによる置換、及び／又は、前記Fタンパク質の天然の（又は自然な）切断サイト以外の酵素的切断サイトの、前記Fタンパク質への挿入；及び／又は

○前記Fタンパク質のC-末端部分であって、該タンパク質のC-末端にある最後のアミノ酸からN-末端方向に伸張するが、前記Fタンパク質のHR2ドメインを超えては伸張しないC-末端部分の欠失；

によって、PIV-5又はPIV-2ウイルスのFタンパク質の配列から導き出される（derivable）配列を含む突然変異タンパク質に関する。

【0071】

前記アミノ酸の位置は、前記Fタンパク質の前駆体形態（F0）の配列（即ち、切断前のFタンパク質の配列）に対して算出され、その位置はN-末端からC-末端へカウントされる。

【0072】

PIV-2 Fタンパク質において示された位置は、PIV-5のFタンパク質において示されたものと対応する位置である（位置の対応の表を示す図2Bを参照されたい）。

【0073】

10

20

30

40

50

PIV-5又はPIV-2ウイルスの前記Fタンパク質の配列は上記で定義されたとおりである。よって、それは特に配列番号34の配列（PIV-5及びPIV-2のFタンパク質のコンセンサス配列）を含むと定義され得る。

【0074】

PIV-5 Fタンパク質の突然変異タンパク質：

本発明の一つの側面に従って、本発明の突然変異タンパク質はPIV-5ウイルスのFタンパク質の配列から導き出される配列を含む。

【0075】

PIV-5の前記Fタンパク質の配列は上記で定義されたとおりである。それは特に、

・配列番号31の配列（図1Aに示されたPIV-5のWR単離体のFタンパク質の配列）、又は、前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の配列；又は

・この配列番号31の配列又は前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の変異配列であって、

○配列番号31のものと同一サイズであるか（即ち、529アミノ酸から成る）、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ大きいサイズであるか（即ち、530, 531, 532, 533, 534, 535又は536アミノ酸から成る）、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ小さいサイズであり（即ち、522, 523, 524, 525, 526, 527又は528アミノ酸から成る）；及び

○配列番号31の配列又は前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号31の配列の長さ、又は、（適切であれば）前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の長さを用いて算出される、変異配列；

から成り得る。

【0076】

好ましくは、PIV-5の前記Fタンパク質の配列は、以下から成る：

・配列番号31の配列（図1Aに示されたPIV-5のWR単離体のFタンパク質の配列）、又は、前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の配列；又は

・この配列番号31の配列又は前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の変異配列であって、

○配列番号31のものと同一サイズであるか（即ち、529アミノ酸から成る）、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ大きいサイズである（即ち、530, 531, 532, 533, 534, 535又は536アミノ酸から成る）；及び

○配列番号31の配列又は前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号31の配列の長さ、又は、適切であれば、前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の長さを用いて算出される、変異配列。

【0077】

そのような変異配列の具体的な例は、本願の表1に示されているW3A、MIL、DEN、LN、MEL、クリプトウイルス、CPI+、CPI-、H221、78524、T1及びSERの単離体の一つのFタンパク質（上記を参照）の配列、即ち、配列番号35～46の配列の一つを含む。

【0078】

好ましくは、PIV-5の前記Fタンパク質の配列は、配列番号31の配列（図1Aに示されたPIV-5のWR単離体のFタンパク質の配列）から成り、又は、前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」の配列から成り、極めて好ましくは、前記代替配列「443位にSを有する配列番号31」中の配列から成る。

【0079】

PIV-5のFタンパク質の配列から導き出される前記配列は、PIV-5の前記Fタンパク質配

列に対して、上記の突然変異 2 2 P、1 3 2 E、2 9 0 A、4 4 9 P 以外の突然変異を含まなくてもよい。これは特に、配列番号 6 5 (Fus8) の配列の場合である。

【 0 0 8 0 】

或いは、PIV-5 の F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、この F タンパク質配列から、上記の突然変異 2 2 P、1 3 2 E、2 9 0 A、4 4 9 P によって、及び、それらの上記突然変異 2 2 P、1 3 2 E、2 9 0 A、4 4 9 P 以外の少なくとも一つの突然変異によって、好ましくは、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - 49 位の アミノ酸の アミノ酸 A による置換；
 - 402 位の アミノ酸の アミノ酸 A による置換；
 - 443 位の アミノ酸の アミノ酸 P による置換；
 - 447 位の アミノ酸の アミノ酸 P による置換；

及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 147 位の アミノ酸の 疎水性 アミノ酸 による置換；
 - 158 位の アミノ酸の 疎水性 アミノ酸 による置換。

【 0 0 8 1 】

によって導き出され得る。

【 0 0 8 2 】

好ましくは、PIV-5 の前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異 22P、132E、290A、449P によって、及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - 49 位の アミノ酸の アミノ酸 A による置換；
 - 402 位の アミノ酸の アミノ酸 A による置換；

及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 147 位の アミノ酸の 疎水性 アミノ酸 による置換；
 - 158 位の アミノ酸の 疎水性 アミノ酸 による置換。

【 0 0 8 3 】

によって、この F タンパク質の配列から導き出される。

【 0 0 8 4 】

前記疎水性アミノ酸は、V、I、L から有利に選択され、好ましくは V である。

【 0 0 8 5 】

好ましくは、PIV-5 の前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異 22P、132E、290A、449P によって、及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 147 位の アミノ酸の 疎水性 アミノ酸 による置換；
 - 158 位の アミノ酸の 疎水性 アミノ酸 による置換；

及び、

・少なくとも一つの他の融合後突然変異、即ち、463 位の アミノ酸の 疎水性 アミノ酸 による置換、好ましくは V、I 又は L、より好ましくは V による置換；
によって、この F タンパク質の配列から導き出される。

【 0 0 8 6 】

前記 F タンパク質の配列から導き出されるそのような配列は、特に、配列番号 67～79（それぞれ、Fus10、Fus10.4、Fus10.5、Fus11、Fus8.1、Fus8.2、Fus8.4、Fus8.5、Fus8.6、Fus8.7、Fus10.1、Fus10.2、Fus10.3）の配列（下記表 4 を参照）から選択される配列であってよい。

【 0 0 8 7 】

好ましくは、PIV-5 の前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異 22P、132E、290A、449P によって、及び、以下から選択される少なくとも一つの融

10

20

30

40

50

合後突然変異：

○147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、この F タンパク質の配列から導き出される。

【0088】

前記 F タンパク質の配列から導き出されるそのような配列は、特に、配列番号 68～79（それぞれ、Fus10.4、Fus10.5、Fus11、Fus8.1、Fus8.2、Fus8.4、Fus8.5、Fus8.6、Fus8.7、Fus10.1、Fus10.2、Fus10.3）の配列（下記表 4 を参照）から選択される配列であってよい。

【0089】

好ましくは、PIV-5の前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異22P、132E、290A、449Pによって、及び、

・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

○49位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

○402位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

及び

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、この F タンパク質の配列から導き出される。

【0090】

前記 F タンパク質の配列から導き出されるそのような配列は、特に、配列番号68、69、70（それぞれ、Fus10.4、Fus10.5、Fus11）の配列（下記表 4 を参照）から選択される配列であってよい。

【0091】

好ましくは、PIV-5の前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異22P、132E、290A、449Pによって、及び、二つの融合後突然変異、即ち、

○147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、この F タンパク質の配列から導き出される。

【0092】

前記 F タンパク質の配列から導き出されるそのような配列は、特に、配列番号76、78（それぞれ、Fus8.7、Fus10.2）の配列（下記表 4 を参照）から選択される配列であってよい。

10

20

30

【表 B】

表 4：本発明の突然変異タンパク質の選択（PIV-5F タンパク質の突然変異タンパク質）

Fus no	融合スコア (図 6B 参照)	配列番号	自律性の 3 つの突然変異 (22P,132E,290A) 及び融合前突然変異 449P に加えたさらなる突然変異	
			融合前	融合後
8	約 7	65	-	-
10	約 6	67	49A	-
10.4	約 7	68	402A	147V,158V, 463V
10.5	約 7.5	69	49A,402A	147V,158V, 463V
11	約 7.5	70	402A	-
8.1	約 6.5	71	-	147V
8.2	約 6.5	72	-	158V
8.4	約 7.5	73		147V,158V
8.5	約 6.5	74		147V,463V
8.6	約 6	75		158V,463V
8.7	約 9	76		147V,158V, 463V
10.1	約 5	77		158V
10.2	約 7	78		147V,158V
10.3	約 6.5	79		147V,158V, 463V

【0093】

表 4 に示した突然変異は、任意の PIV-5 単離体、即ち、WR 単離体又は変異体の単離体の F タンパク質に導入され得る。

【0094】

より具体的には、それらは、図 1 A に示された配列番号 31 の F タンパク質（ジーンバンクデータベースから受入れ番号 AB021962 で入手可能な WR F タンパク質）の配列中に導入され得る。

【0095】

しかしながら、上記のように、本発明者らが ATCC から受領し、下記の実施形態に記載した突然変異タンパク質の構築及び生産に用いた WR 単離体のサンプルは、（ジーンバンクから入手可能な配列の点から見て予想されるものとは対照的に）F タンパク質の 443 位のアミノ酸 P を有しておらず、アミノ酸 S を有していた。表 4 に示した突然変異は、従って、前記代替配列「443 位に S を有する配列番号 31」（配列番号 65、67～79）中に導入され得る。

【0096】

PIV-2 F タンパク質の突然変異タンパク質：

本発明の他の側面に従って、本発明の突然変異タンパク質は、PIV-2 ウイルスの F タンパク質の配列から導き出される配列を含む。

【0097】

前記PIV-2 Fタンパク質の配列は、上記で定義されたとおりである。特にそれは、

- ・配列番号33の配列（図1Bに示したPIV-2のGreer単離体のFタンパク質の配列）；

又は

- ・配列番号33の配列の変異配列であって、

○配列番号33の配列と同じサイズであるか（即ち、551アミノ酸から成る）、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ大きいサイズであるか（即ち、552又は553アミノ酸から成る）、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ小さいサイズであり（即ち、549又は550アミノ酸から成る）；及び

○配列番号33の配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号33の配列の長さを用いて算出される、変異配列；
から成り得る。

【0098】

好ましくは、PIV-2の前記Fタンパク質の配列は、

- ・配列番号33の配列（図1Bに示したPIV-2のGreer単離体のFタンパク質の配列）；

又は

- ・配列番号33の配列の変異配列であって、

○配列番号33の配列と同じサイズであるか（即ち、551アミノ酸から成る）、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ大きいサイズであり（即ち、552又は553アミノ酸から成る）；及び

○配列番号33の配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号33の配列の長さを用いて算出される、変異配列；
からなる。

【0099】

さらに好ましくは、PIV-2の前記Fタンパク質の配列は、

- ・配列番号33の配列（図1Bに示したPIV-2のGreer単離体のFタンパク質の配列）；

又は

- ・配列番号33の配列の変異配列であって、

○配列番号33の配列と同じサイズであり（即ち、551アミノ酸から成る）；及び

○配列番号33の配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号33の配列の長さを用いて算出される、変異配列；
からなる。

【0100】

特に好ましくは、前記Fタンパク質の配列は、配列番号33の配列（図1Bに示したPIV-2のGreer単離体のFタンパク質の配列）からなる。

【0101】

PIV-2のFタンパク質の配列から導き出される前記配列は、PIV-2の前記Fタンパク質配列に対して、上記の突然変異24P、133E、294A、439P以外の突然変異を含まなくて良い。これは、例えば、配列番号90の配列を含むか又は該配列からなる突然変異タンパク質の場合である。

【0102】

或いは、PIV-2のFタンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異24P、133E、294A、439Pによって、及び、上記の突然変異24P、133E、294A、439P以外の少なくとも一つの突然変異によって、好ましくは、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

○53位アミノ酸のアミノ酸Aによる置換；

○406位のアミノ酸のアミノ酸Aによる置換；

○428位のアミノ酸のアミノ酸Pによる置換；

○445位のアミノ酸のアミノ酸 P による置換；
及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、この F タンパク質配列から導き出され得る。

【0103】

これは、例えば、配列番号91～103の配列の一つを含む（又は、前記配列の一つからなる）、突然変異タンパク質の場合である。

【0104】

好ましくは、前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異24 P、133E、294A、439Pによって、及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

○53位アミノ酸のアミノ酸 A による置換；

○406位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、この F タンパク質配列と相違する。

【0105】

これは、例えば、配列番号91～103の配列の一つを含む（又は、前記配列の一つからなる）、突然変異タンパク質の場合である。

【0106】

有利には、前記疎水性アミノ酸は、V、I、Lから選択され、好ましくはVである。

【0107】

好ましくは、前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異24 P、133E、294A、439Pによって、及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

及び、

・少なくとも一つの他の融合後突然変異、即ち、474位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換、好ましくは、V、I又はL、より好ましくはVによる置換；

によって、この F タンパク質の配列と相違する。

【0108】

これは、例えば、配列番号92、93、98、99、100、103の配列の一つを含む（又はそれらの配列の一つからなる）突然変異タンパク質の場合である。

【0109】

好ましくは、前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異24 P、133E、294A、439Pによって、及び、以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、この F タンパク質の配列と相違する。

【0110】

これは、例えば、配列番号92、93及び94～103の配列の一つを含む（又はそれらの配列の一つからなる）突然変異タンパク質の場合である。

【0111】

好ましくは、前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異24

10

20

30

40

50

P、133E、294A、439Pによって、及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - 53位アミノ酸のアミノ酸Aによる置換；
 - 406位のアミノ酸のアミノ酸Aによる置換；

及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、このFタンパク質の配列と相違する。

【0112】

10

これは、例えば、配列番号92、93の配列の一つを含む（又はそれらの配列の一つからなる）突然変異タンパク質の場合である。

【0113】

好ましくは、前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列は、上記の突然変異24 P、133E、294A、439Pによって、及び、二つの融合後突然変異、即ち、

- 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、このFタンパク質の配列と相違する。

【0114】

20

これは、例えば、配列番号92、93、97、100、102、103の配列の一つを含む（又はそれらの配列の一つからなる）突然変異タンパク質の場合である。

【0115】

本願は、より具体的には、図2Bに示されているわけではないが、PIV-5について上記表4に示されているものに対応するPIV-2 Fタンパク質の突然変異タンパク質を想定している：

- ・ F PIV-5の突然変異49Aは、F PIV-2の突然変異53Aに対応する；
- ・ F PIV-5の突然変異402Aは、F PIV-2の406Aに対応する；
- ・ F PIV-5の突然変異147Vは、F PIV-2の151Vに対応する；
- ・ F PIV-5の突然変異158Vは、F PIV-2の162Vに対応する；
- ・ F PIV-5の突然変異463Vは、F PIV-2の474Vに対応する。

30

【表 C】

表 5:本発明の突然変異タンパク質の選択 (PIV-2 の F タンパク質の突然変異タンパク質)

配列番号	自律性の 3 つの突然変異 (24P,133E,294A)及び融合前突然変異 439P に加えたさらなる突然変異	
	融合前	融合後
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

【0116】

表 5 に示した突然変異は、任意の PIV-2 単離体、即ち、Greer 単離体又は変異体の単離体の F タンパク質に導入され得る。従って、より具体的には、それらは、図 1 B に示した配列番号 33 の F タンパク質配列中に導入され得る (Greer の F タンパク質；配列番号 90～103)。

【0117】

切断サイト：

本発明に従って、本発明の突然変異タンパク質は、

・ 上述の突然変異；及び更に

・ 前記 F タンパク質の天然の切断サイトの、別の酵素的切断サイトによる置換、及び/または前記 F タンパク質の天然の切断サイト以外の酵素的切断サイトの前記 F タンパク質への挿入、好ましくは、前記 F タンパク質の天然の切断サイトの、別の酵素的切断サイトによる置換

によって、PIV-5 または PIV-2 ウイルスの F タンパク質の配列から導き出される配列を含み得る。

【0118】

PIV-5 または PIV-2 の F タンパク質の切断サイトは、この F タンパク質の 2 つのサブユニット (F1 及び F2) の切断サイトである。F タンパク質の図解のための図 9 を参照されたい。

【0119】

PIV-5及びPIV-2のFタンパク質の天然型において、この切断サイトは、フューリン (furines) により切断されるサイトである。

【0120】

PIV-5のFタンパク質の天然型において、この切断サイトは、配列RRRRR (配列番号23) からなる。これは、PIV-5のFタンパク質の天然型の98~102位にある (図1A、図9を参照)。PIV-5のFタンパク質の天然 (または自然) の切断サイトを含むPIV-5のFタンパク質配列の断片の例は、以下のとおりである：

IGENLETIRNQLIPTRRRRRFAGVVIGL (配列番号24)。

【0121】

PIV-2のFタンパク質の天然型において、切断サイトは、配列KTRQKR (配列番号25) からなる。これは、PIV-2のFタンパク質の天然型の101~106位にある (図1B参照)。PIV-2のFタンパク質の天然 (または自然) の切断サイトを含むPIV-2のFタンパク質配列の断片の例は、LTPLIENLSKISTVTDTKTRQKRFAGVVVGLAALGVA (配列番号26) である。

【0122】

好ましくは、天然の切断サイト以外の前記切断サイトは、組織特異的切断サイトである。

【0123】

好ましくは、天然の切断サイト以外の前記切断サイトは、一または複数の腫瘍組織によって特異的に発現される酵素の切断サイトであり、更に好ましくは、一または複数の転移性組織によって酵素特異的に発現される酵素の切断サイトである。

【0124】

一例として、天然の切断サイト以外の前記切断サイトは、金属プロテアーゼの切断サイト、たとえばマトリクス金属プロテアーゼ9 (MMP-9) の切断部位であり得る；下記の例2を参照。

【0125】

マトリクス金属プロテアーゼ9 (MMP-9) の切断サイトは、配列PXXHy S/T (配列番号27) {ここでX = 任意のアミノ酸、Hy = 任意の疎水性アミノ酸 (すなわち、F, M, V, L, Iから選択される任意のアミノ酸)} を含んでいてもよいし、この配列からなっているともよい。

【0126】

一例として、マトリクス金属プロテアーゼ9 (MMP-9) の切断サイトは、配列PRRIT (配列番号28) 及び/または配列

IGENLETIRNQLIPTPRRITFAGVVIGL (配列番号29)

を含んでいてもよいし、この配列からなっているともよい。

【0127】

そのような切断サイトを (天然の切断サイトの置換によって) 含む本発明の突然変異タンパク質の例は、Fタンパク質 (PIV-5の) に導き出される配列が配列番号88又は89の配列である、突然変異タンパク質 (それぞれ、Fus8M及びFus8.7M；下記の実施例2を参照) を含む。

【0128】

本発明の核酸：

また本出願は、本発明による突然変異タンパク質をコードする核酸、DNAまたはRNA (普遍的な遺伝暗号に従って、この遺伝暗号の縮重を許容する)、並びにかかる核酸の相補的核酸 (同じ長さの完全に相補的な核酸) に関する。

【0129】

かかる核酸は、配列番号30の配列 (天然のPIV-5 Fタンパク質をコードする配列)、または前記代替配列「443にSを有する配列番号31」をコードする代替配列、または変異Fタンパク質をコードする変異配列、あるいは、配列番号32の配列 (天然のPIV-2 Fタンパク質をコードする配列)、または変異Fタンパク質をコードする変異配列から導き出される。

。

10

20

30

40

50

【0130】

本発明のベクター：

また本出願は、本発明による少なくとも一つの核酸を含む核酸ベクター、より具体的には、トランスフェクション、形質導入または形質転換ベクターに関する。

【0131】

有利には、かかるベクターは、発現ベクターであり得る。

【0132】

好ましくは、これは、動物細胞（非ヒト動物細胞及び/またはヒト細胞）において、より好ましくは、

・ヒト細胞、有利には病的なヒト細胞、より具体的にはヒト腫瘍細胞、より好ましくは転移性黒色腫細胞において；または

・胎盤細胞において、

前記少なくとも一つの核酸の発現を許容するベクターである。

【0133】

かかる発現ベクターは、有利には、アデノウイルスベクターであり得る。

【0134】

前記アデノウイルスベクターは、前記核酸の発現を調節するためのエレメント、好ましくはプロモーターを含んでいてもよく、腫瘍細胞、好ましくは転移性細胞、より好ましくは転移性黒色腫細胞において前記核酸の発現を許容する。

【0135】

好ましくは、この発現は特異的である。有利には、この発現は、非腫瘍（または非転移性）細胞において有意な発現は存在しないが、前記腫瘍細胞または転移性細胞において前記核酸の発現を許容するように十分に特異的である。

【0136】

有利には、かかるアデノウイルスベクターは、腫瘍崩壊性アデノウイルスベクターである。

【0137】

有利には、本発明の発現ベクターは、前記核酸の発現を調節するためのエレメント、好ましくはプロモーターを含み、胎盤細胞、好ましくは不十分な膜融合性（fusogenicity）を有する病的な胎盤細胞において前記核酸の発現を許容する、アデノウイルスベクターであり得る。

【0138】

好ましくは、この発現は特異的である。有利には、この発現は、非胎盤細胞において有意な発現は存在しないが、前記胎盤細胞において前記核酸の発現を許容するように十分に特異的である。

【0139】

本発明のベクターは、択一的または補足的に、動物細胞（非ヒト動物細胞及び/またはヒト細胞）、より好ましくはヒト細胞、有利には病的なヒト細胞、より具体的にはヒト腫瘍細胞、好ましくは転移性ヒト細胞、より好ましくは転移性黒色腫細胞のゲノムへの、前記少なくとも一つの核酸の挿入を許容するベクターであり得る。かかるベクターは、より具体的には、腫瘍、具体的には転移性腫瘍、より具体的には転移性黒色腫の遺伝子治療のために向けられる。

【0140】

また本出願は、本発明の少なくとも一つの核酸を含み、動物細胞（非ヒト動物細胞及び/またはヒト細胞）、より好ましくはヒト細胞、有利には胎盤細胞、好ましくはヒトの胎盤細胞のゲノムへの、前記少なくとも一つの核酸の挿入を許容する、ベクターに関する。かかるベクターは、より具体的には、不完全な胎盤の発達を伴う疾病または状態の遺伝子治療のために向けられる。

【0141】

本発明の細胞：

また本出願は、本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び/または本発明による少なくとも一つの核酸、DNAまたはRNA、及び/または本発明による少なくとも一つのベクターを含む細胞に関する。

【0142】

かかる細胞は、ヒト細胞または非ヒト動物細胞であり得る。

【0143】

好ましくは、かかる細胞は、腫瘍細胞、好ましくは転移性細胞、より好ましくは転移性黒色腫細胞である。

【0144】

かかる細胞は、後述されるとおり、シンシチウムの形成を誘導することができる膜融合 (fusogenic) 能力を備えた細胞としての適用を見出す。

【0145】

あるいは、本発明の細胞は、ヒトまたは非ヒト動物の免疫系の非腫瘍細胞、好ましくは非腫瘍性のヒトまたは非ヒト動物の樹状細胞であってもよく、前記細胞は、本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現している。かかる細胞は、後述されるとおり、たとえば活性な免疫処置により、細胞融合阻害剤の産生を誘導することができる薬剤としての適用を見出す。

【0146】

医学的適用 (融合促進(pro-fusion)):

本発明の突然変異タンパク質、及び/または本発明の核酸、DNAまたはRNA、及び/または本発明のベクター、及び/または本発明の細胞は、病的な細胞及び/または生物の健康に好ましくない細胞の存在及び/または増殖を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和において、より具体的には、不十分な細胞の膜融合性 (cellular fusogenicity) を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和において、好ましくは疾病または腫瘍形成状態、たとえば腫瘍、転移性腫瘍、有利には転移性黒色腫の治療及び/または予防及び/または緩和において使用され得る。

【0147】

かかる疾病または状態は、これらの病的な細胞及び/または好ましくない細胞の低減または除去により、治療及び/または予防及び/または緩和され得る。

【0148】

かかる細胞の表面で発現される本発明の突然変異タンパク質は、これら細胞の融合を誘導し、その結果、シンシチウムの形成を誘導し、これら細胞の破壊 (または少なくとも数の減少) につながる。

【0149】

本発明の突然変異タンパク質、及び/または本発明の核酸、DNAまたはRNA、及び/または本発明のベクター、及び/または本発明の細胞は、胎盤の発達不全を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和において使用され得る。

【0150】

かかる疾病または状態は、胎盤細胞の融合の誘導または刺激により、治療及び/または予防及び/または緩和され得る。

【0151】

よって、本出願はまた、本発明の少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び/または本発明の少なくとも一つの核酸、DNAまたはRNA、及び/または本発明の少なくとも一つのベクター、及び/または本発明の細胞を含む、薬学的組成物または薬に関する。

【0152】

かかる薬学的組成物またはかかる薬は、上述のような病的な細胞及び/または生物の健康に好ましくない細胞の存在及び/または増殖を伴う疾病または状態 (例として、腫瘍、転移性腫瘍、転移性黒色腫) の治療及び/または予防及び/または緩和、あるいは不十分な細胞の膜融合性 (cellular fusogenicity) を伴う疾病または状態 (例として、胎盤の発達不全) の治療及び/または予防及び/または緩和に向けられてもよい。

10

20

30

40

50

【0153】

かかる薬学的組成物またはかかる薬は、少なくとも一つの薬学的及び/または生理学的に許容可能な賦形剤を更に含んでもよい。

【0154】

本発明の突然変異タンパク質（または本発明の核酸、DNA、RNA、または発現ベクター）は、ヒト細胞または非ヒト動物細胞により発現されるように、好ましくはかかる細胞の表面で発現されるように使用され得る。

【0155】

この細胞は、病的な細胞、好ましくは腫瘍細胞、より好ましくは転移性細胞、より好ましくは転移性黒色腫細胞であってもよいし、非腫瘍細胞、たとえば健康な細胞であってもよい。

10

【0156】

より具体的には、ヒト患者または病気の非ヒト動物被検体から取り出された病的な細胞を、本発明の少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び/または本発明の少なくとも一つの核酸、DNAまたはRNA、及び/または本発明の少なくとも一つの発現ベクターと、本発明の突然変異タンパク質を発現させるように接触させることにより、エキスビボで(ex vivo)(またはインビトロで) 処理してもよい。

【0157】

択一的または補足的に、患者または被検体の病的な細胞の近くに局在するが病的でない細胞を、当該処理を行うために取り出してもよい。

20

【0158】

このようにエキスビボで(またはインビトロで)処理された細胞は、その後、前記患者または被検体に再投与するように向けられてもよい。

【0159】

かかる細胞は、前記患者または被検体が冒されている病状、たとえば腫瘍、転移性腫瘍、転移性黒色腫の治療及び/または予防及び/または緩和のために有用である。

【0160】

あるいは、この細胞は、胎盤の細胞、より具体的には、不十分な膜融合性(fusogenicity)に罹患している胎盤の細胞であり得る。かかる細胞は、本発明の突然変異タンパク質をその表面で発現させることにより一旦処理されると、胎盤の発達不全の治療及び/または予防及び/または緩和に向けられてもよい。

30

【0161】

よって本出願は、より具体的には、疾病または腫瘍形成状態、好ましくは腫瘍、より好ましくは転移性腫瘍、更に好ましくは転移性黒色腫の治療及び/または予防及び/または緩和において使用するための、本発明による突然変異タンパク質、本発明による核酸、DNAまたはRNA、本発明によるベクター、本発明による細胞に関する。

【0162】

また本出願は、より具体的には、胎盤の発達不全の治療及び/または予防及び/または緩和において使用するための、本発明による突然変異タンパク質、本発明による核酸、DNAまたはRNA、本発明によるベクター、本発明による細胞に関する。

40

【0163】

本発明による融合阻害剤：

また本出願は、細胞融合を減少させるかまたは遮断する能力を有する生成物に関する。これら生成物は、本発明の一または複数の突然変異タンパク質の阻害剤である。

【0164】

かかる阻害剤は、過剰な細胞の膜融合性 (cellular fusogenicity) を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和において、好ましくはエンベロープに包まれたウイルスの感染（たとえばHIV、インフルエンザ、パラインフルエンザまたはラブドウイルスの感染）、アレルギー、自己免疫疾患または移植片拒絶の治療及び/または予防及び/または緩和において使用され得る。

50

【0165】

好ましくは、本発明による阻害剤は、以下のとおりである：

- ・本発明による突然変異タンパク質に対する抗体、またはかかる抗体のFabもしくはF(ab')₂断片；または
- ・本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質に、または本発明による核酸、DNA、RNAに、特異的に結合する核酸アプタマーまたはペプチドアプタマー；または
- ・本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現する、組換え免疫系細胞、好ましくは組換え樹状細胞；または
- ・本発明による核酸のアンチセンス核酸；または
- ・19～22のヌクレオチドを含有する二本鎖RNAを含み、かつ本発明による核酸に結合する（ハイブリダイズする）ことができる、低分子干渉（small interfering）RNA、siRNA。

10

【0166】

よって、本出願はまた、ヒトまたは非ヒト動物の免疫系の非腫瘍細胞、好ましくはヒトまたは非ヒト動物の樹状細胞であって、本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現する細胞に関するとともに、過剰な細胞の膜融合性（cellular fusogenicity）を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和における、好ましくはエンベロープに包まれたウイルスの感染（たとえばHIV、インフルエンザ、パラインフルエンザまたはラブドウイルスの感染）、アレルギー、自己免疫疾患または移植片拒絶の治療及び/または予防及び/または緩和における、この細胞の使用に関する。

20

【0167】

また本出願は、本発明による突然変異タンパク質または本発明の幾つかの突然変異タンパク質に対する抗体に関する。好ましくは、この抗体は、本発明の一つ又は複数の前記突然変異タンパク質に特異的な抗体である。有利には、この抗体はモノクローナル抗体である。本発明の阻害剤は、かかる抗体の保存された断片、たとえばFabまたはF(ab')₂断片であり得る。

【0168】

かかる抗体または抗体断片は、たとえば、それを必要とする患者または被検体に前記抗体または抗体断片を投与することにより、細胞融合メカニズムを遮断または阻害するように向けられてもよい。

30

【0169】

択一的または補足的に、本発明の突然変異タンパク質は、このタンパク質に対して活性な免疫化を誘導するために、すなわち、前記患者または被検体による抗-突然変異タンパク質抗体の産生を誘導するために、前記患者または被検体にそれ自体投与するように向けられてもよい。必要な場合または所望の場合、一または複数のワクチンアジュバントが、前記突然変異タンパク質の一または複数と一緒に、または異なる時間で投与されてもよい。

【0170】

よって、本出願はまた、免疫原性剤としての本発明の少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び有利には少なくとも一つの免疫化アジュバントを含む、治療用及び/または予防用及び/または緩和用ワクチンに関する。かかるワクチンは、過剰な細胞の膜融合性（cellular fusogenicity）を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和のため、好ましくは、エンベロープに包まれたウイルスの感染（たとえば、HIV、インフルエンザ、パラインフルエンザまたはラブドウイルスの感染）、アレルギー、自己免疫疾患または移植片拒絶の治療及び/または予防及び/または緩和のために向けられてもよい。

40

【0171】

また本出願は、以下のものに関する：

- ・本発明の少なくとも一つの突然変異タンパク質に、または本発明の核酸、DNA、RNAに、特異的に結合する核酸アプタマーまたはペプチドアプタマー；
- ・本発明の少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現する、組換え免疫系

50

細胞、好ましくは組換え樹状細胞；

- ・本発明の核酸のアンチセンス核酸；

- ・19～22のヌクレオチドを含有する二本鎖RNAを含み、かつ本発明の核酸に結合する（ハイブリダイズする）ことができ、有利には前記核酸の転写を遮断または阻害することができる、低分子干渉（small interfering）RNA、siRNA。

【0172】

また、かかる生成物は、本発明の阻害剤でもある。よって、これらは、上述のような過剰な細胞の膜融合性（cellular fusogenicity）を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和のために向けられてもよい。より具体的には、これらは、Fタンパク質の発現または過剰発現について少なくとも一つの遺伝子を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和のために向けられる。

10

【0173】

よって、本出願はまた、本発明の少なくとも一つの阻害剤を含む薬学的組成物または薬に関する。

【0174】

かかる薬学的組成物または薬は、とりわけ、上述のような過剰な細胞の膜融合性（cellular fusogenicity）を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和のために向けられてもよい。

【0175】

かかる薬学的組成物または薬は、少なくとも一つの薬学的及び/または生理学的に許容可能な賦形剤を更に含んでもよい。

20

【0176】

本出願は、より具体的には、過剰な細胞の膜融合性（cellular fusogenicity）を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和において使用するための本発明による阻害剤であって、前記疾病または状態が、エンベロープに包まれたウイルスの感染（好ましくは、HIV及び/またはインフルエンザ及び/またはパラインフルエンザ及び/またはラウドウイルスの感染）、アレルギー、自己免疫疾患または移植片拒絶である阻害剤に関する。

【0177】

本出願は、より具体的には、過剰な細胞の膜融合性（cellular fusogenicity）を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和において免疫原性剤として使用するための本発明による突然変異タンパク質であって、前記疾病または状態が、エンベロープに包まれたウイルスの感染（好ましくは、HIV及び/またはインフルエンザ及び/またはパラインフルエンザ及び/またはラウドウイルスの感染）、アレルギー、自己免疫疾患または移植片拒絶である突然変異タンパク質に関する。

30

【0178】

本出願は、より具体的には、ワクチンまたはワクチン組成物、より具体的には、過剰な細胞の膜融合性（cellular fusogenicity）を伴う疾病または状態の治療及び/または予防及び/または緩和のために向けられたワクチンまたはワクチン組成物であって、前記疾病または状態が、エンベロープに包まれたウイルスの感染（好ましくは、HIV及び/またはインフルエンザ及び/またはパラインフルエンザ及び/またはラウドウイルスの感染）、アレルギー、自己免疫疾患または移植片拒絶であるワクチンまたはワクチン組成物に関する。かかるワクチンまたはワクチン組成物は、少なくとも本発明による突然変異タンパク質を含み、少なくとも一つの生理学的に許容可能なアジュバントを任意に含む。

40

【0179】

診断及び予後の適用：

また本出願は、

- ・不十分なシンシチウムの形成、たとえば、腫瘍、転移性腫瘍、転移性黒色腫または胎盤の発達不全；あるいは対照的に

- ・過剰なシンシチウムの形成、たとえば、エンベロープに包まれたウイルスの感染（好

50

ましくは、HIV及び/またはインフルエンザ及び/またはパラインフルエンザ及び/またはラ
ブドウイルスの感染)、アレルギー、自己免疫疾患または移植片拒絶
を伴う疾病または状態の診断または予後のための方法、より具体的にはインビトロでの方
法に関する。

【0180】

本発明の診断または予後の方法は、たとえば、診断または予後を受ける患者または被検
体から採取された生物学的サンプルなどの生物学的サンプルにおいて、本発明による少な
くとも一つの突然変異タンパク質または本発明による少なくとも一つの核酸を検出するこ
とを含む。

【0181】

この検出は、たとえば、前記サンプル中に含有されるタンパク質または核酸の配列を決
定することにより行ってもよい。

【0182】

この検出は、たとえば、前記少なくとも一つの突然変異タンパク質に結合する抗体、ペ
プチドアダプターまたはオリゴヌクレオチドアダプターを用いて、より具体的には、本発
明の抗体、ペプチドアダプターまたはオリゴヌクレオチドアダプターを用いて、本発明の
前記少なくとも一つの突然変異タンパク質を検出することにより行ってもよい。

【0183】

この検出は、たとえば、前記少なくとも一つの核酸に結合する核酸、ペプチドアダプタ
ーまたはオリゴヌクレオチドアダプターを用いて、より具体的には、本発明の核酸に相補
的な核酸、本発明のペプチドアダプターまたはオリゴヌクレオチドアダプターを用いて、
本発明の前記少なくとも一つの核酸を検出することにより行ってもよい。

【0184】

また本出願は、不十分なシンシチウムの形成または対照的に過剰なシンシチウムの形成
の診断または予後のための方法で使用するための、前記抗体、ペプチドアダプター、オリ
ゴヌクレオチドアダプター、相補的な核酸に関する。

【0185】

生物工学的適用 (スクリーニング) :

また本出願は、シンシチウムの形成を減少させるかまたは遮断することができる化合物
をスクリーニングするための方法、より具体的にはインビトロでの方法に関する。本発明
の方法は、(たとえば、候補化合物の存在下で達成される融合度を、その非存在下で達成
される融合度と比較することにより) 候補化合物が前記細胞の融合を減少させるかまたは
遮断するかどうかを決定するために、候補化合物を、本発明の少なくとも一つの突然変異
タンパク質を発現する細胞と接触させることを含む。

【0186】

かかる化合物は、過剰な細胞の膜融合性 (cellular fusogenicity) を伴う疾病または
状態、たとえば、エンベロープに包まれたウイルスの感染、アレルギー、自己免疫疾患ま
たは移植片拒絶の治療及び/または予防及び/または緩和のための有効成分候補である。

【0187】

生物工学的適用 (骨髄腫、ハイブリドーマ) :

また本出願は、本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質を含む、好ましくは
少なくとも一つのかかる突然変異タンパク質をその表面に含む、及び/または本発明によ
る少なくとも一つの核酸を含む、及び/または本発明による少なくとも一つのベクター、
より具体的には本発明による発現ベクターを含む、腫瘍細胞、より具体的には骨髄腫に
関する。

【0188】

かかる腫瘍細胞、より具体的にはかかる骨髄腫は、とりわけ、(この腫瘍細胞とBリンパ
球との融合による) ハイブリドーマの産生、より具体的には抗体産生ハイブリドーマの産
生に使用され得る。

【0189】

また本出願は、本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び/または本発明による少なくとも一つの核酸、及び/または本発明による少なくとも一つのベクターを含む、ハイブリドーマ、より具体的には抗体産生ハイブリドーマに関する。かかるハイブリドーマは、とりわけ、本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質を含む、好ましくは少なくとも一つのかかる突然変異タンパク質をその表面に含む、及び/または本発明による少なくとも一つの核酸を含む、及び/または本発明による少なくとも一つのベクターを含む、少なくとも一つの腫瘍細胞、より具体的には骨髓腫と、少なくとも一つのBリンパ球を接触させることにより産生され得る。かかる腫瘍細胞は、固有の膜融合 (fusogenic) 能力を有する：よって、かかる腫瘍細胞は、従来技術においてハイブリドーマの産生を目的として腫瘍細胞とBリンパ球との融合を誘導するために慣用的に使用されるポリエチレングリコール(PEG)またはエレクトロポレーション法または任意の他の方法を使用することなく、前記少なくとも一つのBリンパ球と融合することができる。 10

【0190】

生物工学的適用 (幹細胞または前駆細胞)：

また本出願は、本発明による少なくとも一つの突然変異タンパク質を含む、好ましくは少なくとも一つのかかる突然変異タンパク質をその表面に含む、及び/または本発明による少なくとも一つの核酸を含む、及び/または本発明による少なくとも一つのベクター、より具体的には本発明による発現ベクターを含む、幹細胞または前駆細胞に関する。

【0191】

かかる幹細胞または前駆細胞は、固有の膜融合 (fusogenic) 能力を有する：よって、かかる幹細胞または前駆細胞は、融合によりシンシチウムを形成することができる。 20

【0192】

この幹細胞または前駆細胞が、筋細胞への分化能力を有している場合、(細胞の融合及びシンシチウムの形成により) 筋繊維を形成することができる。

【0193】

よって、本出願はまた、筋繊維の産生、たとえばインビトロでの産生において使用するための、かかる幹細胞または前駆細胞に関する。

【0194】

この産生は、たとえば、複数の前記幹細胞または前駆細胞を、互いに接触させて、幹細胞、または適切な場合には前駆細胞の増殖を許容する培地上または培地中に置くことにより行ってもよく、その結果、前記幹細胞または前駆細胞の膜融合(fusogenic)能力が発揮され、これによりシンシチウム、より具体的には筋繊維の形成を誘導することができる。幹細胞、または適切な場合には前駆細胞の増殖を許容し、かつ筋細胞、より具体的には筋繊維への可能な分化能力の発現に適している培地の例は、当業者に公知であり；一例は、MCDB培地である。 30

【0195】

幹細胞または前駆細胞の、筋細胞、より具体的には筋繊維への分化を観察することを許容する細胞マーカーの例は、当業者に公知であり、たとえばCD56である。

【0196】

本出願において、“含む(comprising)”の用語は、“包含する(including)”または“含有する(containing)”と同義であり、明示的に指摘されない一または複数の追加の要素、成分または工程の存在を除外しないオープンな用語であり、一方、“からなる(consisting)”または“構成される(constituted)”の用語は、明示的に開示されない任意の他の追加の要素、工程または成分の存在を除外するクローズした用語である。“から本質的になる(essentially consisting of)”または“により本質的に構成される(essentially constituted by)”の用語は、追加の要素、成分または工程が、発明に基づいて特徴に重大な影響を及ぼさない限り、一または複数の追加の要素、成分または工程の存在を除外しない部分的にオープンな用語である。 40

【0197】

その結果、“含む(comprising)” (または“comprise(s)”)の用語は、“からなる(cons 50

isting of) ”、“により構成される (constituted by) ”の用語、並びに“から本質的になる(essentially consisting of) ”及び“により本質的に構成される(essentially constituted by) ”の用語を包含する。

【0198】

本出願で引用される文献及び参照文献の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0199】

以下の実施例は、例示のために純粋に記載され、本発明を何ら限定するものではない。

【実施例】

【0200】

例1：突然変異体の構築及びそれらの膜融合性 (fusogenicity) の測定

10

材料及び方法及び：

細胞及びウイルス

細胞株LLC-MK2 (Macaca mulatta腎臓細胞株) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection (ATCC)) から受入れ番号CCL-7で入手可能である。

【0201】

細胞株A549 (ヒト肺癌細胞株) は、ATCCから受入れ番号CCL-185で入手可能である。

【0202】

組換え株HuH7-Tat (ヒト肝癌細胞株) は、HIV-1 TatによるHuH-7株の細胞の形質導入により入手可能である。

20

【0203】

HuH-7株は、ジャパニーズ・コレクション・オブ・リサーチ・バイオリソース (Japanese Collection of Research Bioresources) からリファレンス番号JCRB0403で入手可能である。

【0204】

HIV-TatによるHuH-7株の形質導入は、レトロウイルスベクターLXSN-tatを用いて行い、Tatプラスミドを形質導入した。

【0205】

細胞LLC-MK2、A549及びHuH7-Tatは、5%ウシ胎仔血清を含むEMEM (イーグル最小必須培地) またはDMEM (ダルベッコ/フォークト改変イーグル最小必須培地) で培養した。

30

【0206】

PIV-5 WR株は、ATCC (ATCC番号VR-288) から入手し、Terrier et al, 2008に記載されるとおりLLC-MK2細胞上で培養した。

【0207】

RNAの抽出、RT-PCR及びクローニング

ウイルスRNAは、PIV-5によるLLC-MK2細胞の感染から得られた上清から、Absolutely RN A(登録商標) Microprep Kit (Stratagene, USA) を用いて、供給業者により提供される説明書に従って抽出した。逆転写は、pd(N)6ランダムヘキサマー (Amersham Biosciences, GB) 及び鳥類骨髄芽球症ウイルスAMVの逆転写酵素 (Reverse Transcriptase; RT) (Promega から入手可能なAMV-RT逆転写酵素) を用いて行った。

40

【0208】

PIV-5 Fの全配列の増幅は、データベースから入手可能なPIV-5のヌクレオチド配列 (GenBank受入れ番号AB021962) から設計されたプライマー対を用いて行った。

【0209】

使用されたプライマー対は、以下のとおりであった：

センスプライマー (配列番号 1)：

5' TTGCGGCCGCATGGGTACTATAA 3'

アンチセンスプライマー (配列番号 2)：

5' CCGCTCGAGTTATGATAAACAATCTCTCC 3'。

【0210】

50

増幅は、以下のプロトコールに従って行った：95℃で2 min、その後39サイクル（95℃/30s、55℃/1 min、72℃/3 min）、及び72℃で10 minの最後の伸長。

【0211】

PIV-5 Fの相補的DNAは、マルチプルクローニングサイトにあるNotI及びXhoIサイトで、発現プラスミドpcDNA3.1(+) にクローニングした（図4参照）。

【0212】

PCR産物及びプラスミドは、それぞれ、Nucleospin(登録商標) ExtractIIキット及びNucleospin(登録商標) プラスミドキット（Macherey Nagel, Germany）を用いて、供給業者により提供される説明書に従って精製した。

【0213】

この研究における配列決定のシリーズは、MWG Biotech（Ebersberg, Germany）により実行した。

【0214】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いた指定突然変異誘発

PIV-5のFタンパク質の突然変異タンパク質は、PIV-5 F融合タンパク質をコードするプラスミドpcDNA3.1において、指定突然変異により産生した。突然変異は、供給業者により提供されるプロトコール（Stratageneから入手可能なQuickChange(登録商標) Site-Directed Mutagenesis System）に従って、相補的プライマーを用いたPCRにより作成した。使用されたプライマーのリストは、下記表2に示す。プラスミドのアセンブリは、配列決定により確認した。

10

20

【表 D - 1】

表 2 : プライマーのリスト

突然変異	PIV-5 中の 標的に された 領域	PCR による突然変異誘発のために用いられるプライマーの配列	配列 番号
L22P	F2	5'GGAGCAGCAGCCTTGATCCAGCTGCTCTCATGCAAAATCGG3'	3
		5'CCGATTTGCAATGAGAGCAGCTGGATCAAGGCTGCCTGCTCC3'	4
K132E	HR1	Pre-existing mutation	-
V290A	HR3	Pre-existing mutation	-
I49A	F2	5'GGCCTCATCAGCATTCCGCTGTTGTGAAGTTAAATGCC3'	5
		5'GGCATTAACCTCACAAACAGCCGAATGCTGATGAGGCC3'	6
V402A	HR3 と HR2 の間	5'CAGCCAAAGTTCATCTCTCTGCAACTGTCATTGACATGTAC3'	7
		5'GTACATGTCAATGACAGTTGCAGGAGAGTGAACTTGGCTG3'	8
S443P	HR2 の 上流	5'GCTTGAATCATCTCAGATCTTGTCCTCATTCGTTGGATATATCCC3'	9
		5'GGGATATATCCAACGGATCAATGGACAAGATCTGAGATGATTCAAGC3'	10
L447P	HR2 の 上流	5'CTCAGATCTTGTCCTCATTCGCGCGGATATATCCCAGAAATCTAGCTGCG3'	11
		5'CGCAGCTAGATTCTGGGATATATCCGGCGGATCAATGGACAAGATCTGAG3'	12

10

20

30

40

【表 D - 2】

表 2 (続き) :

突然変異	PIV-5 中の 標的に された 領域	PCR による突然変異誘発のために用いられるプライマーの配列	配列 番号
I449P	HR2 の 上流	センス 5'CTTGTCCATTGATCCGTTGGATCCATCCCAGAAATCTAGCTGCGGTG3'	13
		アンチセンス 5'CACCGCAGCTAGATTTCGTTGGATTCTCTCCAGAAATCTAGCTGCGG3'	14
I449F	HR2 の 上流	センス 5'GCCCCATTGATCCGTTGGATTCTCTCCAGAAATCTAGCTGCGG3,	15
		アンチセンス 5'CCGCAGCTAGATTCTGGGAGAAATCCAAACGGATCAAATGGGC3'	16
T147V	HR1	センス 5'CTCAAAAATGCAATCCAAAAAGTAAATGCAGCAGTTGCAGATG3'	17
		アンチセンス 5'CATCTGCAACTGCTGCATTACCTTTTGGATTGCATTTTGTGAG3'	18
T158V	HR1	センス 5'GCAGATGTGGTCCAGGCCGTACAATCACTAGGAACGGC3'	19
		アンチセンス 5'GCCGTTCCCTAGTGATTGTACGGCCCTGGACCACATCTGC3,	20
A463V	HR2	センス 5'GTGAATAAGAGTCTAAGTGATGTACTACAACACTTAGCACAAAAGTG3'	21
		アンチセンス 5'CACTTTGTGCTAAGTGTTGTAGTACATCACTTAGACTCTTATTCAC3'	22

突然変異443Pは、理論的には、WR単離体のFタンパク質に予め存在する。しかし、発明者らがATCCから受領したこの単離体のサンプルに、この突然変異は実際に存在しなかった。このため、発明者らはそれを導入しなければならなかった。

【0216】

細胞のトランスフェクション

試薬ExGen500 (Fermentas) を用いて、供給業者により提供される説明書に従って、細胞をプラスミドによりトランスフェクトした。1~3マイクログラムのプラスミドDNAを、48hの間、細胞 (70~80% コンフルエンス) に添加した。トランスフェクションの効率は、緑色蛍光タンパク質GFPをコードするプラスミドを用いて評価した。

【0217】

共焦点顕微鏡による免疫蛍光法

トランスフェクトされた細胞は、リン酸緩衝生理食塩水PBS中のパラホルムアルデヒド (1% v/v) を用いて固定し、その後、2回洗浄した。PBSで1/10に希釈された、PIV-5 Fタンパク質に対するモノクローナル抗体の存在下で、この場合、Randall et al, 1987に記載されるモノクローナル抗体Flaの存在下で、細胞マットを3hの間インキュベートした。モノクローナル抗体Flaは、PIV-5の単離体 (この場合、LN単離体) に対するマウスの免疫処置、ハイブリドーマの調製、及び特異的な抗F抗体の選択により得た。

【0218】

その後、細胞マットを洗浄し、PBSで1/200に希釈された抗マウスIgG-Alexa Fluor(登録商標) 633二次抗体 (Invitrogen) とともに30分間インキュベートした。細胞を、すすいだ後、1/1000のDapi (4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール) とともに、リン酸緩衝生理食塩水PBS中1/200の、Alexa Fluor(登録商標) 488に結合した小麦胚凝集素 (WGA) (Invitrogenから入手可能なWGA-Alexa Fluor(登録商標)) と混合するか、または混合せずに、10分間インキュベートした。TCS SP2共焦点顕微鏡 (Leica) を用いて、画像を取得した。

【0219】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、文献 (Horvat and Lamb 1992) に記載されるとおり行った。A549細胞を、種々のFusをコードするプラスミドによりトランスフェクトし、氷上に置いた。細胞マットを、1%のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水PBSですすいだ。その後、そのマットに、抗PIV-5 Fタンパク質モノクローナル抗体 (この場合、モノクローナル抗体Fla) を添加し (1% ウシ胎仔血清を含む1/500 PBSリン酸緩衝液)、4℃で30分間インキュベートした。その後、そのマットをすすぎ、1/1000のAlexa Fluor(登録商標) 488 に結合した抗マウス二次抗体 (Invitrogen) の存在下でインキュベートした。細胞を、すすいだ後、500 µLのPBSリン酸緩衝液、EDTA (エチレンジアミンジアミン四酢酸) 中0.5mMを用いて穏やかに引き離した。細胞を、500 µLの1%パラホルムアルデヒド溶液を含む専用のフローサイトメトリー管に移した。5000細胞の蛍光強度を、蛍光活性化細胞ソーティングFACSを用いて、この場合、Becton DickinsonからのFACSVantage™ SEフローを用いて測定した。

【0220】

半定量的融合テスト (シンシチウムのサイズ及び核の数の関数として確立した融合スコア)

種々のFus発現プラスミドによりトランスフェクトし、免疫蛍光法で観察したマットに、半定量的分析を行った。この分析は、以下の基準を用いて突然変異体の各々について融合スコアを決定することから構成される：

- ・融合または融合なし (単純な集合)、-/+で表示；
- ・シンシチウムのサイズ、1~5のスケールで表示；
- ・核の数、1~5のスケールで表示。

【0221】

これにより計算されるスコアを、2つの点数を足すことにより得た：このため、最大の

10

20

30

40

50

理論的点数は、10であり、最大数の核をもつ最大サイズのシンシチウムに相当する。

【0222】

定量的融合テスト（ルシフェラーゼ活性の測定）

細胞－細胞融合を定量するために、“ドナー”A549細胞（6ウェルプレートのウェルあたり2.5百万の細胞）を、種々のFus突然変異タンパク質をコードする2μgのプラスミドpcDNA3.1、並びに長い末端反復配列LTRに依存してルシフェラーゼを発現する50 ngのプラスミドで、同時トランスフェクトした（Lavillette et al, 2007）。

【0223】

ネガティブコントロールは、2μgの空のプラスミドpcDNA3.1で同時トランスフェクトした細胞により提供した。

10

【0224】

トランスフェクションから12時間後、“ドナー”細胞を、リン酸緩衝液（PBS）、EDTA中0.5 mMを用いて引き離し、カウントした後に、新たな6ウェルプレート（ 10^5 細胞/ウェル）に置き換えた。“インジケーター”HuH7-Tat細胞（ 4×10^5 細胞/ウェル）を、PBS-EDTA緩衝液を用いて引き離し、その後、すすいで“ドナー”細胞に添加した。

【0225】

ルシフェラーゼ活性は、共培養（co-culture）の72時間後に、ルシフェラーゼ活性測定キットを用いて、この場合、PromegaからのLuciferase Assay System（E1500）キットを用いて、供給業者により提供される指示書に従って測定した。

【0226】

20

結果：

本発明者らにより構築され産生された突然変異タンパク質は、上記表3に示される。

【0227】

この表3において、本発明者らは、種々の突然変異を、それらが属する機能に従ってまとめた。すなわち、

- ・HNに対する自律性の機能への関与：PIV-5のFタンパク質の22、132及び290位；
- ・融合前の機能への関与：PIV-5のFタンパク質の49、402、443、447及び449位；
- ・融合後の機能への関与：PIV-5のFタンパク質の147、158及び463位。

【0228】

図5A、5B、5C及び5Dは、表3の突然変異の位置を図示する。

30

【0229】

このように、本発明者らは、突然変異タンパク質を構築し、産生し、試験した。

【表 E - 1】

表 3：生産されたタンパク質のリスト

	自律性			融合前							融合後		
	L22P	K132E	V290A	I49A	V402A	S443P	L447P	I449P	I449F	T147V	T158V	A463V	
Fus1 (配列番号 47)		+	+										
Fus1.1 (配列番号 48)		+	+	+									
Fus1.2 (配列番号 49)		+	+		+								
Fus2 (配列番号 50)		+	+			+							
Fus3 (配列番号 51)	+	+	+										

10

20

30

40

【表 E - 2】

表 3 (続き) :

	自律性			融合前						融合後		
	L22P	K132E	V290A	I49A	V402A	S443P	L447P	I449P	I449F	T147V	T158V	A463V
Fus3.1 (配列番号 52)	+	+	+							+		
Fus3.2 (配列番号 53)	+	+	+							+	+	
Fus3.3 (配列番号 54)	+	+	+								+	
Fus4 (配列番号 55)	+	+	+	+								
Fus5 (配列番号 56)	+	+	+		+							

10

20

30

40

【表 E - 3】

表 3 (続き) :

	自律性			融合前							融合後		
	L22P	K132E	V290A	I49A	V402A	S443P	L447P	I449P	I449F	T147V	T158V	A463V	
Fus6 (配列番号 57)	+	+	+			+							
Fus6.1 (配列番号 58)	+	+	+			+				+			
Fus6.2 (配列番号 59)	+	+	+			+					+		
Fus6.3 (配列番号 60)	+	+	+			+				+	+		

10

20

30

40

【表 E - 4】

表 3 (続き) :

	自律性			融合前							融合後		
	L22P	K132E	V290A	I49A	V402A	S443P	L447P	I449P	I449F	T147V	T158V	A463V	
Fus7 (配列番号 61)	+	+	+				+						
Fus7.1 (配列番号 62)	+	+	+				+			+			
Fus7.2 (配列番号 63)	+	+	+				+				+		
Fus7.3 (配列番号 64)	+	+	+				+			+	+		
Fus8 (配列番号 65)	+	+	+					+					
Fus9 (配列番号 66)	+	+	+						+				

10

20

30

40

【表 E - 5】

表 3 (続き) :

	自律性			融合前						融合後		
	L22P	K132E	V290A	I49A	V402A	S443P	L447P	I449P	I449F	T147V	T158V	A463V
Fus10 (配列番号 67)	+	+	+	+				+				
Fus10.4 (配列番号 68)	+	+	+		+			+		+	+	+
Fus10.5 (配列番号 69)	+	+	+	+	+			+		+	+	+
Fus11 (配列番号 70)	+	+	+		+			+				
Fus8.1 (配列番号 71)	+	+	+					+		+		
Fu8.2 (配列番号 72)	+	+	+					+			+	

10

20

30

40

【表 E - 6】

表 3 (続き) :

	自律性			融合前							融合後		
	L22P	K132E	V290A	I49A	V402A	S443P	L447P	I449P	I449F	T147V	T158V	A463V	
Fus8.4 (配列番号 73)	+	+	+					+		+	+		
Fus8.5 (配列番号 74)	+	+	+					+		+		+	
Fus8.6 (配列番号 75)	+	+	+					+			+	+	
Fus8.7 (配列番号 76)	+	+	+					+		+	+	+	

10

20

30

40

【表 E - 7】

表 3 (続き) :

	自律性			融合前							融合後		
	L22P	K132E	V290A	I49A	V402A	S443P	L447P	I449P	I449F	T147V	T158V	A463V	
Fus10.1 (配列番号 77)	+	+	+	+				+			+		
Fus10.2 (配列番号 78)	+	+	+	+				+		+	+		
Fus10.3 (配列番号 79)	+	+	+	+				+		+	+	+	

10

20

30

40

これら突然変異タンパク質の構築及び産生の間に使用されたPIV-5のFタンパク質配列は、WR単離体の代替Fタンパク質配列であった。この代替配列は、443位のアミノ酸がPでなくSであることを除いて、配列番号31の配列（Genbank配列）と同じであった（代替配列「443にSを有する配列番号31」）。

【0231】

このため、配列番号47～79の配列は、前述の代替配列「443にSを有する配列番号31」内におけるアミノ酸の置換から得られる配列であり、このアミノ酸の置換は、上記表3に、これら配列の各々について示される。

【0232】

半定量的融合テストの間に顕微鏡下で行われた観察の写真を、図6Aに示す。

10

【0233】

半定量的融合テストの最後に得られたスコアを、図6Bに示す。

【0234】

突然変異タンパク質Fus6、Fus 6.1、Fus 6.2及びFus 6.3は、多くの細胞の凝集という結果につながったが、細胞融合という結果につながらなかった。

【0235】

突然変異タンパク質Fus 3.3、Fus 3.1、Fus2、Fus 1.1、Fus 1.2及びFus 1は、ゼロの融合スコアを得た。

【0236】

突然変異タンパク質Fus 9、Fus7、Fus 3、Fus 5及びFus 4は、低い融合スコアを得た。

20

【0237】

Fus 4の融合スコアを超えて、有意な融合スコアを有する一連の突然変異タンパク質が分離した。すなわち、

- ・自律性の3つの突然変異及び融合前の突然変異449Pを共通に含む突然変異タンパク質のグループ、たとえば、突然変異タンパク質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；及び
- ・自律性の3つの突然変異、融合前の突然変異447P、及び少なくとも一つの融合後の突然変異（147Vまたは158V）を共通に含む突然変異タンパク質のグループ、たとえば、Fus7.1、Fus7.2またはFus7.3。

【0238】

30

図7A及び7Bは、テストされた突然変異タンパク質の選択物について、顕微鏡観察の写真を示し、融合スコアを示す。すなわち、自律性の3つの突然変異と融合前の突然変異449Pを共通に含む突然変異タンパク質のグループ、例えば、突然変異タンパク質Fus7.1、Fus7Fus8、Fus10、Fus10.4、Fus10.5、Fus11、Fus8.1、Fus8.2及びFus7、Fus8.4、Fus8.5、Fus8.6、Fus8.7、Fus10.1、Fus10.2、Fus10.3。

【0239】

図8A、8B及び8Cは、「定量的」融合テスト（ルシフェラーゼによるテスト）を用いて得られた結果の図を示す。

【0240】

40

図8A及び8Cは、自律性の3つの突然変異と融合前の突然変異449Pを共通に含む突然変異タンパク質、例えば突然変異タンパク質Fus8が、タンパク質Fus3よりも、天然の状況の模倣として、糖タンパクHNを伴っている場合でさえ、高い膜融合能力を有することを示す（実際に、3倍以上高い）（図8A）。

【0241】

突然変異タンパク質Fus8.7は、突然変異タンパク質Fus8より高い膜融合能力を有し（ほぼ2倍高い）、それは、Fus3が天然の状況の模倣として糖タンパクHNを伴っている場合でさえ、タンパク質Fus3より高い（6倍以上高い）（図8C）。

【0242】

図8Bは、自律性の3つの突然変異と融合前の突然変異449Pを共通に含む突然変異タンパク質のグループの膜融合能力が、得られた表面発現の程度との単純な関連によるもので

50

はない事実を示している。実際に、Fus8の発現は、Fus3の発現の半分未満であった（図8B）。

【0243】

例2：転移性腫瘍組織により特異的に発現される酵素のサイトによる天然の切断サイトの置換

本発明の突然変異タンパク質、及びとりわけ上記表1に記載されるものは、天然のFタンパク質の天然の切断サイトの置換により、たとえば、それを組織特異的な切断サイトで置換することにより、予め改変された。

【0244】

例として、ここで提示される本発明の突然変異タンパク質は、天然の切断サイトが転移性腫瘍組織により特異的に発現される酵素、すなわちマトリクス金属プロテアーゼ9（MMP-9）のサイトにより置換されたものである。 10

【0245】

図9は、PIV-5 Fタンパク質の突然変異タンパク質について実行された置換を示す。

【0246】

PIV-5のFタンパク質の天然の切断サイトは、以下のとおりである：
RRRRR（配列番号23）。

【0247】

PIV-5のFタンパク質の天然の切断サイトを含むFタンパク質配列の断片の例は、以下のとおりである： 20
IGENLETIRNQLIPTRRRRRFAGVVIGL（配列番号24）。

【0248】

MMP-9切断サイトのコンセンサス配列は、以下のとおりである：
PXXHyS/T（配列番号27）

ここでX = 任意のアミノ酸、及び

ここでHy = 任意の疎水性アミノ酸（すなわち、F、M、V、L、Iから選択される任意のアミノ酸）。

【0249】

MMP-9切断サイトの例は、以下のとおりである：
PRRIT（配列番号28）。 30

【0250】

MMP-9切断サイトを含む本発明の突然変異Fタンパク質配列の断片の例は、以下のとおりである：
IGENLETIRNQLIPTPRRITFAGVVIGL（配列番号29）。

【0251】

材料及び方法：

PIV-5のFタンパク質の突然変異タンパク質は、上記例1に記載されるとおり産生した。

【0252】

選択された切断サイト、この場合、配列番号28のMMP-9切断サイトによる天然の切断サイトの置換は、以下のとおり行った： 40

切断サイトの置換は、融合タンパク質F PIV-5をコードするプラスミドpcDNA3.1において、3つの連続的な指定突然変異誘発により行った。突然変異は、供給業者により提供されるプロトコール（Stratageneから入手可能なQuickChange（登録商標）Site-Directed Mutagenesis System）に従って、相補的プライマーを用いたPCRにより作成した。プラスミドのアセンブリは、配列決定により確認した。

【0253】

1st 突然変異 R98P

センス 5' CCAGTTGATTCCAACTCCGAGGAGACGCCGGTTTGC 3'（配列番号80）

アンチセンス 5' GCAAACCGCGTCTCCTCGGAGTTGGAATCAACTGG 3'（配列番号81） 50

2nd 突然変異 R101I

センス 5' GATTCCAACTCCGAGGAGAATCCGGTTTGCAGGAGTGGTG 3' (配列番号82)

アンチセンス 5' CACCACTCCTGCAAACCGGATTCTCCTCGGAGTTGGAATC 3' (配列番号83)

3rd 突然変異 R102T

センス 5' GATTCCAACTCCGAGGAGAATCACGTTTGCAGGAGTGGTGATTGG 3' (配列番号84)

アンチセンス 5' CCAATCACCACTCCTGCAAACGTGATTCTCCTCGGAGTTGGAATC 3' (配列番号85)

。

【0254】

細胞のトランスフェクション

試薬ExGen500 (Fermentas) を用いて、供給業者により提供される説明書に従って、細胞をプラスミドによりトランスフェクトした。1~3マイクログラムのプラスミドDNAを、48hの間、細胞 (70~80% コンフルエンス) に添加した。トランスフェクションの効率は、緑色蛍光タンパク質GFPをコードするプラスミドを用いて評価した。 10

【0255】

共焦点顕微鏡による免疫蛍光法

トランスフェクトされた細胞は、リン酸緩衝生理食塩水PBS中のパラホルムアルデヒド (1% v/v) を用いて固定し、その後、2回洗浄した。PBSで1/10に希釈された、融合タンパク質PIV-5 Fに対するモノクローナル抗体の存在下で、この場合、Randall et al, 1987に記載されるモノクローナル抗体Flaの存在下で、細胞マットを3hの間インキュベートした。モノクローナル抗体Flaは、PIV-5の単離体 (この場合、LN単離体) に対するマウスの免疫処置、ハイブリドーマの調製、及び特異的な抗F抗体の選択により得た。 20

【0256】

その後、細胞マットを洗浄し、PBSで1/200に希釈された抗マウスIgG-Alexa Fluor(登録商標) 633二次抗体 (Invitrogen) とともに30分間インキュベートした。細胞を、すすいだ後、1/1000のDapi (4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール) とともに、リン酸緩衝生理食塩水PBS中1/200の、Alexa Fluor(登録商標) 488に結合した小麦胚凝集素 (WGA) (Invitrogenから入手可能なWGA-Alexa Fluor(登録商標)) と混合するか、または混合せずに、10分間インキュベートした。TCS SP2共焦点顕微鏡 (Leica) を用いて、画像を取得した。

。

【0257】

結果：

本発明者らはこのように、突然変異タンパク質、例えば、その天然の切断サイトが配列番号28のMMP-9サイトにより置換されることにより、突然変異タンパク質Fus8及びFus8.7と相違する、タンパク質Fus8M及びFus8.7M (それぞれ、配列番号88及び89) を得た。

【0258】

Fus8 (配列番号65):

30

【化 3】

MGTIIQFLVV	SCLLAGAGSL	D <u>P</u> AALMQIGV	IPTNVRQLMY	YTEASSAF <u>I</u> V	VKLMPIDSP
ISGCNITSIS	SYNATVTKLL	QPIGENLETI	RNQLIPTRRR	RRFAGVVIGL	AALGVATAAQ
VTAAVALVKA	N <u>E</u> NAAAILNL	KNAIQK <u>T</u> NAA	VADV <u>V</u> QATQS	LGTAVQAVQD	HINSVVSPAI
TAANCKAQD	AIIGSILNLYL	TELTTFHNQ	ITNPALSPIT	IQALRILLGS	TLPTVVEKSF
NTQISAAELL	SSGLLTGQIV	GLDLTYMQMV	IKIELPTLTV	QPATQIIDL <u>A</u>	TISAFINNQE
VMAQLPTRVM	VTGSLIQAYP	ASQCTITPNT	VYCRYNDAQV	LSDDTMACLQ	GNLTRCTFSP
VVGSFLTRFV	LFDGIVYANC	RSMLCKCMQP	AAVILQPSSS	P <u>V</u> TVIDMYKC	VSLQLDNLRF
TITQLANVTY	NSTIKLESSQ	IL <u>S</u> IDPL <u>D</u> PS	QNLA AVNKSL	SD <u>A</u> LQH LAQS	DTYLSAITS A
TTTSVLSIIA	ICLGS LGLIL	IILLSVVVWK	LLTIVAANRN	RMENFVYHK	

10

20

【0 2 5 9】

天然の切断サイトは、98位から102位(RRRRR)である。

【0 2 6 0】

Fus8M (配列番号88) :

【化 4】

MGTIIQFLVV	SCLLAGAGSL	D <u>P</u> AALMQIGV	IPTNVRQLMY	YTEASSAF <u>I</u> V	VKLMPIDSP
ISGCNITSIS	SYNATVTKLL	QPIGENLETI	RNQLIPTPRR	I TFAGVVIGL	AALGVATAAQ
VTAAVALVKA	N <u>E</u> NAAAILNL	KNAIQK <u>T</u> NAA	VADV <u>V</u> QATQS	LGTAVQAVQD	HINSVVSPAI
TAANCKAQD	AIIGSILNLYL	TELTTFHNQ	ITNPALSPIT	IQALRILLGS	TLPTVVEKSF
NTQISAAELL	SSGLLTGQIV	GLDLTYMQMV	IKIELPTLTV	QPATQIIDL <u>A</u>	TISAFINNQE
VMAQLPTRVM	VTGSLIQAYP	ASQCTITPNT	VYCRYNDAQV	LSDDTMACLQ	GNLTRCTFSP
VVGSFLTRFV	LFDGIVYANC	RSMLCKCMQP	AAVILQPSSS	P <u>V</u> TVIDMYKC	VSLQLDNLRF
TITQLANVTY	NSTIKLESSQ	IL <u>S</u> IDPL <u>D</u> PS	QNLA AVNKSL	SD <u>A</u> LQH LAQS	DTYLSAITS A
TTTSVLSIIA	ICLGS LGLIL	IILLSVVVWK	LLTIVAANRN	RMENFVYHK	

30

40

50

【0261】

天然の切断サイトRRRRRは、サイトPRRIT (MMP-9のサイト)によって置換された。

【0262】

Fus8.7 (配列番号76) :

【化5】

MGTIIQFLVV	SCLLAGAGSL	D <u>P</u> AALMQIGV	IPTNVRQLMY	YTEASSAF <u>I</u> V	VKLMPTIDSP
ISGCNITSIS	SYNATVTKLL	QPIGENLETI	RNQLIPT <u>RRR</u>	<u>RR</u> FAGVVIGL	AALGVATAAQ
VTAAVALVKA	<u>N</u> ENAAAILNL	KNAIQK <u>V</u> NAA	VADV <u>VQAV</u> QS	LGTAVQAVQD	HINSVVSPAI
TAANCKAQD	AIIGSILNLYL	TELTTFHNQ	ITNPALSPIT	IQALRILLGS	TLPTVVEKSF
NTQISAAELL	SSGLLTGQIV	GLDLTYMQMV	IKIELPTLTV	QPATQIID <u>L</u> A	TISAFINNQE
VMAQLPTRVM	VTGSLIQAYP	ASQCTITPNT	VYCRYNDAQV	LSDDTMACLQ	GNLTRCTFSP
VVGSFLTRFV	LFDGIVYANC	RSMCKCMQP	AAVILQPSSS	<u>P</u> VTVIDMYKC	VSLQLDNLRF
TITQLANVTY	NSTIKLESSQ	IL <u>S</u> IDPL <u>D</u> PS	QNLAAVNKSL	SD <u>V</u> LQHLAQS	DTYLSAITS
TTTSVLIIIA	ICLGSLGLIL	IILLSVVVWK	LLTIVAANRN	RMENFVYHK	

10

20

【0263】

天然の切断サイトは、98位から102位(RRRRR)である。

【0264】

Fus8.7M (配列番号89):

30

【化 6】

MGTIIQFLVV	SCLLAGAGSL	DPAALMQIGV	IPTNVRQLMY	YTEASSAFIV	VKLMPTIDSP
ISGCNITSIS	SYNATVTKLL	QPIGENLETI	RNQLIPTPRR	ITFAGVVIGL	AALGVATAAQ
VTAVALVKA	NENAAAILNL	KNAIQKYNAA	VADVQAVQS	LGTAVQAVQD	HINSVVSPAI
TAANCKAQD	AIIGSILNLYL	TELTTFHNQ	ITNPALSPIT	IQALRILLGS	TLPTVVEKSF
NTQISAAELL	SSGLLTGQIV	GLDLTYMQMV	IKIELPTLTV	QPATQIIDLA	TISAFINNQE
VMAQLPTRVM	VTGSLIQAYP	ASQCTITPNT	VYCRYNDAQV	LSDDTMACLQ	GNLTRCTFSP
VVGSFLTRFV	LFDGIVYANC	RSMLCKCMQP	AAVILQPSSS	PVTVIDMYKC	VSLQLDNLRF
TITQLANVTY	NSTIKLESSQ	ILSIDPLDPS	QNLA AVNKSL	SDVLQH LAQS	DTYLSAITS A
TTTSVLIIIA	ICLGSGLLIL	IILLSVVVWK	LLTIVAANRN	RMENFVYHK	

10

20

【0265】

天然の切断サイトRRRRRは、サイトPRRIT (MMP-9のサイト)によって置換された。

【0266】

得られた突然変異タンパク質は、それが由来する天然の切断サイトを有する突然変異タンパク質と同様に機能する(多数の核を含む大きいシンシチウム、表面発現及び高い膜融合性度の定量化の誘導)。

【0267】

その結果を図9に示す(実施例1に記載したような共焦点顕微鏡による免疫蛍光法)。

【0268】

切断サイトの修飾は、本発明の突然変異タンパク質の膜融合能力(極めて近い融合スコア)及び機能性を著しく改変しないように見える。

【0269】

PIV-2 Fタンパク質に由来する本発明の突然変異タンパク質に関して、同様の切断サイトの導入又は置換の操作が実行され得る。

【0270】

PIV-2のFタンパク質の天然の切断サイトは、KTRQKR(配列番号25)であり; PIV-2 Fタンパク質の天然の切断サイトを含むFタンパク質配列の断片の例は、LTPLIENLSKISTVTDTKTRQKR FAGVVVGLAALGVA(配列番号26)である。本発明の突然変異タンパク質において、この天然の切断サイト以外の切断サイトは、導入され得るか、又は、例えば組織特異的切断サイト、より具体的には転移性腫瘍組織によって特異的に発現される酵素、例えばマトリクス金属プロテアーゼ9(MMP-9; 例えば、配列番号27又は28のサイト)の切断サイトで置換され得る。

40

【0271】

参考文献

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

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

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

50

Ito et al 1997, J Virol. 71(12): 9855-9858.
Ito et al, 2000, J Gen Virol. 81(Pt 3):719-727.
Gardner and Dutch 2007, J. Virol. 81(15):8303-14.
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.
Randall et al, 1987, J. Gen. Virol. 68(Pt 11): 2769-2780
Russell et al, 2003, J. Cell Biol. 163(2):363-74.
Terrier et al, 2008, Journal of Clinical Virology, 2008, 43(1): 86-92.
West et al, 2005, J Virol. 79(3):1543-1551.

10

【図 1 A】

図 1A

```
>F PIV-5 WR strain (529aa) (GenBank AB021962)
MGTIIQFLVV SCLLAGAGSL DLALMQIGV IPTNVRQLMY YTEASSAFIV VKLMPTDISP 60
ISGCNITSIS SYNATVTKLL QPIGENLETI RNQLIPTRRR RRFAGVVIGL AALGVATAAQ 120
VTAVALVKKA NENAAAILNML KNAIQKTNAA VADVVAQTQS LGTAVQAVQD HINSVVSPA 180
TAANCKAQD AIIGSILNLXL TELTITFINQ IINPALSPIT IQALRILLGS TLEPTVVEKSF 240
NTQISAARELL SSGLLTQQIV GLDITVMQMV IKTELPTLTV QPATQIIDIA TISAFINNOE 300
VMAQLPTRVM VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACIQ GNLTRCTFSP 360
VVGSLTRFV LFDGIVYANC RSMCLKCMQP AAVILQPSSS FVTVIDMYK VSLQLDNLRF 420
TITQLANVTY NSTIKLESSQ ILIDPFLDIS QNLAAVNKSL SDALQLHLAQs DTYLSAITSa 480
TTSVLSIIIA ICLGSLGLIL IILSVVVMK LLTIVAANRN RMENFVYHK 529
```

配列番号31(PIV-5のFタンパク質の基準配列)

```
30 a tgggtactat tattcaattt ctgggtgtct
61 cctgtctatt ggcaggagca ggcagccttg atctagcagc cctcactgcaa atcggtgtca
121 ttccaaacaa tgcctcgcaa cttatgtatt atactgagge ctcatcgcca ttcattgttg
181 tgaagttaat gctcaacttt gactcgccga ttagtggatg taatataaca tcaatttcaa
241 gctataatgc acagtgcaca aaactctcac agcgtatcgg tgagaattgg gagaagatta
301 ggaaccagtt gattccaact cggagaagac gccggtttgc aggggtgttg attggattag
361 ctgcattagg agtagctatt gccgcacagg tcaactgcgc agtagcacta gttaaaggcaa
421 atgaaaatgc tgcgctata ctcaacttca aaatgcaat ccaaaaaaca aatgcagcag
481 ttgcagatgt ggtccagcgc acaacaatcac tagaaccgpc agttcaagca gtccaagatc
541 actaaacag tgggttaagt ccagcaetta cagcagccaa ttgtaaaggc caagatgcta
601 tcattggctc aatcctcaat ctctatttga ccgagttgac aaccatcttc cacaactcaa
661 ttacaaaccc tgcattgaat cccattacaa ttcaagcttt aaggatccta ctggggagta
721 ccttgccgac ttgtgtcgaa aaactcttca ataccagat aagtgcagct gagctctctt
781 catcagggtt attgacagc cagatgttgg gattagattt gacttatatg cagatgttca
841 taanaattga gctgcgaact ttaactgtgac aactcgcaac ccagatccta gatctggcca
901 ccattttctg attcattaac aatcaagaag tcatggccca attaccaaca cgtgttatgg
961 tgactggcag ctgtatccaa gctatctccg catcgcaatg caccattaca cccaactg
1021 tgcactgttag gtataattgat gcccaagtac tctcagatga tactatggct tgcctccaag
1081 gtaacttgcg aagatgcacc ttctctccag tggttgggag ctctctcaat cpatctgtgc
1141 tgttcgatgg aatagtttat gaaatttgcg gttcgatgtt gtccaagtgc atgcaactgt
1201 ctgctgtgat cctacacagc agttcatccc ctgtaactgt cattgacatg tacaattgtg
1261 tgagtgtgca gottgacaat ctccagatcca ccatcactca attggccaat gtaacctaca
1321 atagacacat caagcttgaa tcatctccaga tcttgccat tgaactgttg gatataccc
1381 agaactcagc tgcggtgaat aagatctcaa gtgagcaact acaacactta gcaacaagt
1441 acacatatct ttctgcaat acatcagcta cagactacaag tgtattatcc ataatgacaa
1501 tctgtctctg atctgttagt ttaattctaa taactctgct cagtgtagtt gtgtggaagt
1561 tattgacctt tgcgtcgtct aatcgaataa gaattggaga tttgtttat cataataa
```

// 配列番号30(CDS配列:配列番号31を基準としたPIV-5のFタンパク質をコードする
核酸配列)

Figure 1A

【図 1 B】

図 1B

```
>F hPIV-2 souche Greer (551 aa) (Genbank complete genome NC_003443)
MHHLHMIIVC IFVMYTGIVG SDAIAGDQLL NIGVIQSKIR SLMYITDGA SFIVVKLLPN 60
LPFNSGTCNI TSLDAYNVTI FKLLTPIEN LSKISTVTDT KTRQKRFAGV VVGLAALGA 120
TAAQITAAVA IVKANANAAA INNLAISIQS TKNVASDVID ASRTIATAVQ AIQDRINGAI 180
VINGITSASCR AHDALIGSIL NLVILTELTI FHNQITNEAL TPLSIQALRI LLGSTLPIVI 240
ESKLINTNFNT AELLSSGLLT QIIISISPMY MQMLIQINVP TFIMQPGAKV IDLIAISANH 300
KLQEVVVQVP NRILEYANEL QNVPANDCVV TPNSVFCRYN EGSPIPESQY QCLRGNLNSC 360
TPTPIIGNPL KRFAPANGVL YANCKSLLCR CADPPHVVSQ DDTQIGIID IKRCEMMLD 420
TFSFRITGTF NATYVTFDFM INANVHLSP LDLSNQINSI NKSLKSAEDW IADSNFFANQ 480
ARTAKTLYSL SAIALILSVI TLVVVGLLIA YIIKLVSQIH QFRSLAATM PHRENPAFFS 540
KNNHGNLYGI S 551
```

配列番号33(PIV-2のFタンパク質の基準配列)

```
4789 at gcatcaactg
4801 catcacaatga tagtatgcat ctttgttatg tacactggaa ttgtaggttc agatgccatt
4861 gctggagatc aactacttaa tatagggggtc attcaatcaa agataagatc actcatgtac
4921 tataactgat gtggtgctag ctttatttgt gtaaaattgc taccattatt tcccccaagc
4981 aatggaacat gcaacatcac cagttcatag gcaataatgt ttacctatt taagtacta
5041 acacccctga ttgagaacct gagtaaaatt tccactgtta cagatccaa aaccgcacca
5101 aaacgatttg caggagtagt tgttgaact gctgcattag gattgccc agccgcacaa
5161 ataactgcag ctgtagcaat agtgaagct aatgcgaatg ctgctgcgat aaacaattct
5221 catcttcaa ttcaatcac caacaagca gtatccgatg tgatcagatgc atcaagaaca
5281 attgcaaccc cagttcaagc aattcagat cgcattcaat gagctattgt taatggata
5341 acatctgcat catgcccgtg ccactgatga ctcatgtggt caattattaa tctttatctc
5401 actgagctta ccacaatatt tcaataatca ataaacaacc ctggcgtcag accactcttc
5461 atccaagctt taagaatcct cctcgttagc accttgcac ttgtcaattg tccaactc
5521 aacacaaact tcaacacagc agagctgctc agttccggac tttaactgg tcaataatt
5581 tccatttccc caatgtacat gcaaatgctc attcaaatca atgttccgac atttataatg
5641 caaccocgtg cgaaggtaat tgatctaatt gctatctccg caaacataa attgcaagaa
5701 gtggtgtgac aagttccgaa taggattcta gagtatgcaa atgaactaca aaattaccac
5761 gccaatgact gtgctgac accgaactct gtaatttga gatcaacaga ggttccccct
5821 atccctgaat caaatatca atgcttgagg ggaatctta attottgac tttaacctt
5881 attatcggga actttcttaa gcgatctga ttgtctaag gtgtgctcta tgcacactgc
5941 aaactcttgc tatgtagtg tgcgcacccc ccccatgttg tatcccaga tgataccaa
6001 ggcatcagca taattgatat taagagatgc tctgagatga tctctgacac tttttcatt
6061 aggatcacat ctacttcaa tgcctacatg gtgacagact tctcaatgat taatgcaat
6121 attgtacatc taagtccctc agattgtgca aatcaaatca attcaataa caaatctctt
6181 aaaagtgtg aggatggat tgcagatagc actctctttg ctaatcacac caggacagcc
6241 aagacacttt attcactaag tgcataagca ttaactactat cagtgattac ttgtgtgtc
6301 gtggtattgc tgattgcta catcatcaag ctggtttctc aaatccatca attcagatgc
6361 ctagtctgta caacaatgtt ccaagggaa aatcctgctc tctttccaa gaataacct
6421 ggaacatat atgggatatc ttaa
```

// 配列番号32(CDS配列:配列番号33を基準としたPIV-2のFタンパク質をコードする
核酸配列)

Figure 1B

図 2A



Figure 2B

图 3



图 4

Figure 4

图 5A

Figure 5A

【図 5 B】

図 5B

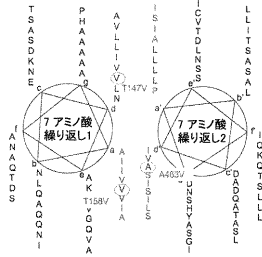


Figure 5B

【図 5 D】

図 5D

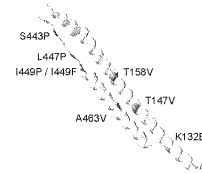


Figure 5D

【図 5 C】

図 5C

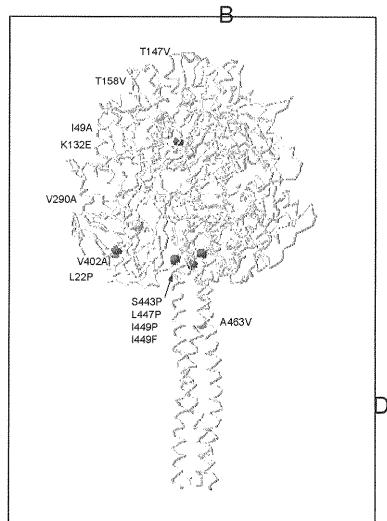


Figure 5C

【図 6 A】

図 6A

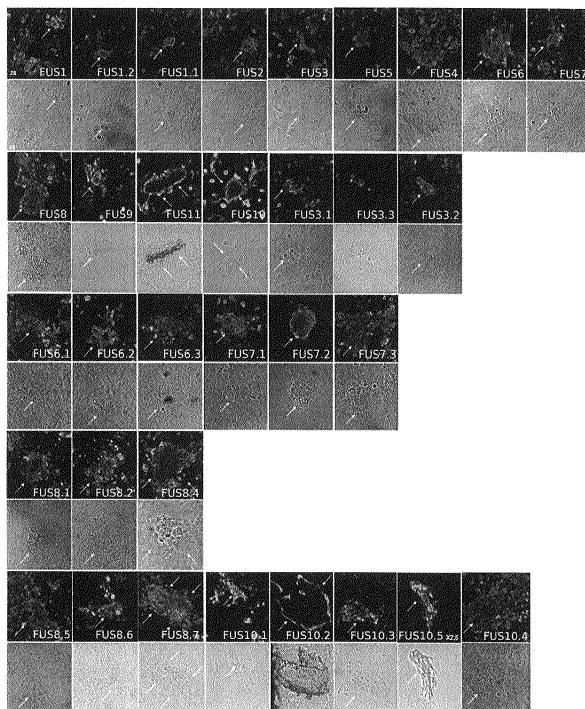


Figure 6A

【図 6 B】

図 6B

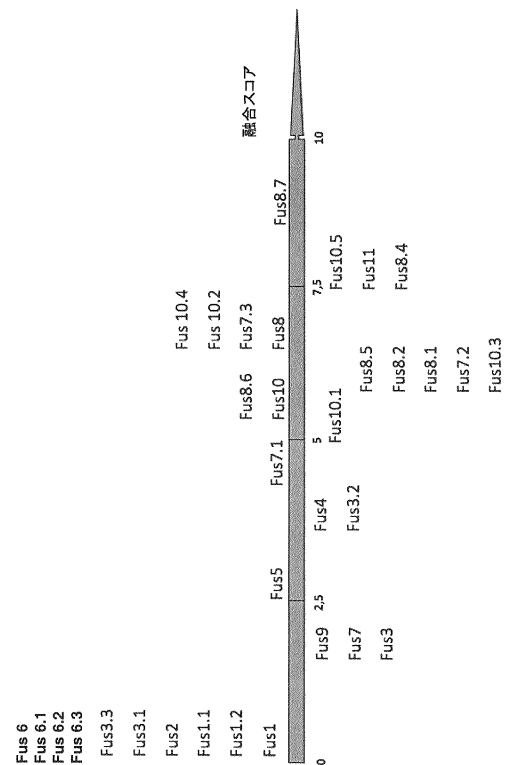


Figure 6B

【図 7 A】

図 7A

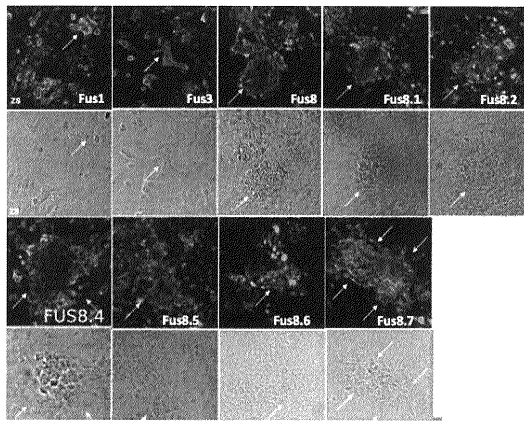


Figure 7A

【図 7 B】

図 7B

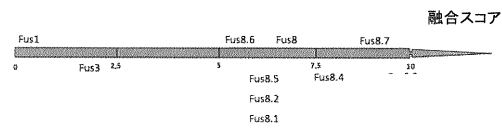


Figure 7B

【図 8 A】

図 8A

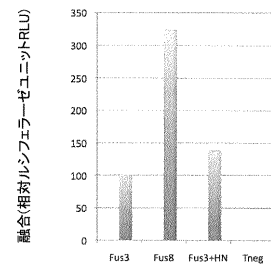


Figure 8A

【図 8 B】

図 8B

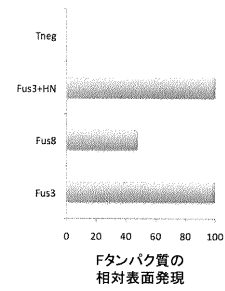


Figure 8B

【図 8 C】

図 8C

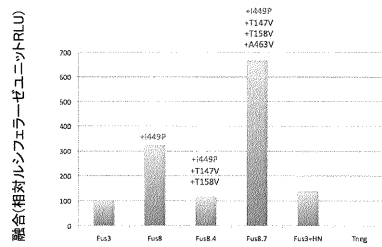


Figure 8C

【図 9】

図 9

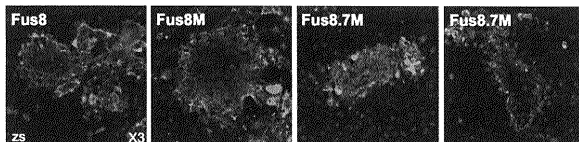


Figure 9

【配列表】

2012509077000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年10月17日(2011.10.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

突然変異タンパク質であって、該アミノ酸配列が、

・置換：

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の22位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の24位のアミノ酸の、アミノ酸 P による置換；及び

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の132位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の133位のアミノ酸の、アミノ酸 E による置換；及び

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の290位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の294位のアミノ酸の、アミノ酸 A による置換；及び

○PIV-5 Fタンパク質の配列中の449位のアミノ酸、又は、PIV-2 Fタンパク質の配列中の439位のアミノ酸の、アミノ酸 P による置換；

・並びに、任意に：

○前記 F タンパク質の天然の切断サイトの、他の酵素的切断サイトによる置換、及び／又は、前記 F タンパク質の天然の切断サイト以外の酵素的切断サイトの、前記 F タンパク質への挿入；及び／又は

○前記 F タンパク質の C－末端部分であって、該タンパク質の C－末端にある最後のアミノ酸から N－末端方向に伸張するが、前記 F タンパク質の HR2 ドメインを超えては伸張しない C－末端部分の欠失；

によって、PIV-5又はPIV-2ウイルスの F タンパク質の配列から導き出される（derivable）配列を含む突然変異タンパク質。

【請求項 2】

PIV-5又はPIV-2ウイルスの前記 F タンパク質の配列が、配列番号34の配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 3】

前記 F タンパク質の配列がPIV-5の F タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 4】

前記 F タンパク質の配列が、

・配列番号31の配列、又は、443位のアミノ酸が（配列番号31の P の代わりに） S であることを除いて配列番号31の配列と同じである代替配列；又は

・この配列番号31の配列又は前記代替配列の変異配列であって、

○配列番号31のものと同じサイズであるか、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ大きいサイズであるか、又は、配列番号31のものより最大で7アミノ酸だけ小さいサイズであり；及び

○配列番号31の配列又は前記代替配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号31の配列の長さ、又は、適切であれば前記代替配列の長さを用いて算出される、変異配列；

から成ることを特徴とする、請求項 3 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 5】

前記 F タンパク質は、配列番号35から46の配列の一つから成ることを特徴とする、請求項 4 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 6】

そのアミノ酸配列が前記 PIV-5 F タンパク質配列に対して他の突然変異を含まないことを特徴とする、請求項 3～5 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 7】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号65の配列であることを特徴とする、請求項 6 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 8】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

○49位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

○402位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

○443位のアミノ酸のアミノ酸 P による置換；

○447位のアミノ酸のアミノ酸 P による置換；

及び／又は

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 9】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号67～79の配列から選択される配列であることを特徴とする、請求項 3～5 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 10】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

○147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；及び

○158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8～9 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 11】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号78の配列から選択される配列である、請求項 10 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 12】

前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○147位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○158位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

及び

・○少なくとも一つの他の融合後突然変異、即ち、463位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換、好ましくは V、I 又は L、より好ましくは V による置換；

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項 3～5 及び 8～10 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 13】

前記 F タンパク質の配列が PIV-2 F タンパク質である、請求項 1 又は 2 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 14】

前記 F タンパク質の配列が、

・配列番号33の配列；又は

・配列番号33の配列の変異配列であって、

○配列番号33の配列と同じサイズであるか、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ大きいサイズであるか、又は、配列番号33の配列より最大で2アミノ酸だけ小さいサイズであり；及び

○配列番号33の配列に対して、95%を超える配列同一性、好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%の配列同一性を有し、この同一性は、配列番号33の配列の長さを用いて算出される、変異配列

から成ることを特徴とする、請求項13に記載の突然変異タンパク質。

【請求項15】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号90～103の配列から選択される配列である、請求項13又は14に記載の突然変異タンパク質。

【請求項16】

そのアミノ酸配列が、前記PIV-2 Fタンパク質配列に対して他の突然変異を含まないことを特徴とする、請求項13～15の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項17】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

- 53位アミノ酸のアミノ酸Aによる置換；
- 406位のアミノ酸のアミノ酸Aによる置換；
- 428位のアミノ酸のアミノ酸Pによる置換；
- 445位のアミノ酸のアミノ酸Pによる置換；

及び／又は

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

- 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項13～15の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項18】

前記Fタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

- 151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- 162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

及び

・少なくとも一つの他の融合後突然変異、即ち、474位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換、好ましくはV、I又はL、より好ましくはVによる置換；

によって、前記Fタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、請求項13～15及び17の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項19】

前記疎水性アミノ酸が、V、I、又はLであり、特にVである、請求項8、10、12、17、18の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項20】

前記Fタンパク質の天然の切断サイトの、他の酵素的切断サイトによる置換によって、及び／又は、前記Fタンパク質の天然の切断サイト以外の酵素的切断サイトの、前記Fタンパク質への挿入によって、PIV-5又はPIV-2ウイルスのFタンパク質の配列から導き出される配列を含むことを特徴とする、請求項1～19の何れか一項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項21】

天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、組織特異的切断サイトであることを特徴とする、請求項20に記載の突然変異タンパク質。

【請求項22】

請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質をコードする、核酸、DNA若しくはRNA、又はそのような核酸の相補的核酸。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の少なくとも一つの核酸を含む、トランスフェクション、形質導入又は形質転換ベクター。

【請求項 2 4】

腫瘍崩壊性のアデノウイルスベクターであることを特徴とする、請求項 2 3 に記載の発現ベクター。

【請求項 2 5】

請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び／又は、請求項 2 2 に記載の核酸、DNA又はRNAの少なくとも一つ、及び／又は、請求項 2 3 又は 2 4 に記載の少なくとも一つのベクターを含むことを特徴とする細胞。

【請求項 2 6】

疾病又は腫瘍形成状態、好ましくは転移性腫瘍、好ましくは転移性黒色腫の、治療及び／又は予防及び／又は緩和において使用するための、請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質、請求項 2 2 に記載の核酸、DNA又はRNA、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のベクター、請求項 2 5 に記載の細胞。

【請求項 2 7】

胎盤の発達不全の治療及び／又は予防及び／又は緩和において使用するための、請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質、請求項 2 2 に記載の核酸、DNA又はRNA、請求項 2 3 に記載のベクター、請求項 2 5 に記載の細胞。

【請求項 2 8】

細胞融合の阻害剤であって、

- ・請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質に対して作られた抗体、又は、該抗体のFab又はF(ab')₂断片；

- ・請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質に、又は請求項 2 2 に記載の核酸、DNA、RNAに、特異的に結合する核酸アプタマー又はペプチドアプタマー；

- ・請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現する、組換え免疫系細胞、好ましくは組換え樹状細胞；

- ・請求項 2 2 に記載の核酸のアンチセンス核酸；

- ・19～22のヌクレオチドを含む二重鎖RNAを含み、かつ請求項 2 2 に記載の核酸に結合できる、低分子干渉RNA、siRNA；

であることを特徴とする阻害剤。

【請求項 2 9】

請求項 2 5 の細胞であって、ヒト又は非ヒト動物の免疫系の細胞、好ましくはヒト又は非ヒト動物の樹状細胞であり、請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面で発現する細胞。

【請求項 3 0】

過剰な細胞の膜融合性 (cellular fusogenicity) を含む疾病又は状態の治療及び／又は予防及び／又は緩和において使用するための、請求項 2 8 の細胞融合阻害剤であって、前記疾病又は状態が、エンベロープに包まれたウイルスの感染 (好ましくはHIV及び／又はインフルエンザ及び／又はパラインフルエンザ及び／又はラブドウイルスの感染)、アレルギー、自己免疫疾患又は移植片拒絶である、細胞融合阻害剤。

【請求項 3 1】

過剰な細胞の膜融合性を含む疾病又は状態の、治療及び／又は予防及び／又は緩和において免疫原性剤として使用するための、請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質であって、前記疾病又は状態が、エンベロープに包まれたウイルスの感染 (好ましくはHIV及び／又はインフルエンザ及び／又はパラインフルエンザ及び／又はラブドウイルス感染)、アレルギー、自己免疫疾患又は移植片拒絶である、突然変異タンパク質。

【請求項 3 2】

過剰な細胞の膜融合性を含む疾病又は状態の治療及び／又は予防及び／又は緩和のためのワクチンであって、前記疾病又は状況がエンベロープに包まれたウイルスの感染（好ましくはHIV及び／又はインフルエンザ及び／又はパラインフルエンザ及び／又はラブドウイルス感染）、アレルギー、自己免疫疾患又は移植片拒絶であり、少なくとも請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の突然変異タンパク質を含むことを特徴とするワクチン。

【請求項 3 3】

不十分な又は対照的に過剰なシンシチウムの形成を伴う疾病の診断又は予後のためのインビトロでの方法であって、請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質又は請求項 2 2 に記載の少なくとも一つの核酸の、生物学的サンプル中における検出を含むことを特徴とするインビトロでの方法。

【請求項 3 4】

シンシチウムの形成を減少させるか又は遮断することのできる化合物をスクリーニングするためのインビトロでの方法であって、候補化合物を、該候補化合物が前記細胞の融合を減少させるか又は遮断するかどうかを決定するために、請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質に接触させることを含むことを特徴とするインビトロでの方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質を含み、好ましくは、該少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面上に含み、及び／又は、請求項 2 2 に記載の少なくとも一つの核酸を含み、及び／又は、請求項 2 3 に記載の少なくとも一つのベクターを含む、腫瘍細胞、特に骨髄腫。

【請求項 3 6】

ハイブリドーマの産生において使用するための、請求項 3 5 に記載の腫瘍細胞、特に骨髄腫。

【請求項 3 7】

請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質、及び／又は、請求項 2 2 に記載の少なくとも一つの核酸、及び／又は、請求項 2 3 に記載の少なくとも一つのベクターを含むことを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項 3 8】

筋細胞への分化能力を有する幹細胞又は前駆細胞であって、請求項 1 ～ 2 1 の何れか一項に記載の少なくとも一つの突然変異タンパク質を含み、好ましくは該少なくとも一つの突然変異タンパク質をその表面上に含み、及び／又は、請求項 2 2 に記載の少なくとも一つの核酸を含み、及び／又は、請求項 2 3 に記載の少なくとも一つのベクターを含むことを特徴とし、前記細胞はヒト胚細胞ではない、幹細胞又は前駆細胞。

【請求項 3 9】

筋繊維幹細胞又は前駆細胞としての使用のための、請求項 3 8 の幹細胞又は前駆細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 7 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 7 1】

参考文献

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

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

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

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

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

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

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.
Randall et al, 1987, J. Gen. Virol. 68(Pt 11): 2769-2780
Russell et al, 2003, J. Cell Biol. 163(2):363-74.
Terrier et al, 2008, Journal of Clinical Virology, 2008, 43(1): 86-92.
West et al, 2005, J Virol. 79(3):1543-1551.

以下に、本願出願の当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

〔１〕 前記Ｆタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - ４９位のアミノ酸のアミノ酸Ａによる置換；
 - ４０２位のアミノ酸のアミノ酸Ａによる置換；

及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - １４７位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - １５８位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記Ｆタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする突然変異タンパク質。

〔２〕 前記疎水性アミノ酸が、Ｖ、Ｉ、Ｌから選択され、好ましくはＶであることを特徴とする、〔１〕に記載の突然変異タンパク質。

〔３〕 前記Ｆタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- １４７位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
- １５８位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

から選択される少なくとも一つの融合後突然変異によって前記Ｆタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、〔１〕又は〔２〕に記載の突然変異タンパク質。

〔４〕 前記Ｆタンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号６８～７９の配列から選択される配列であることを特徴とする、〔３〕に記載の突然変異タンパク質。

〔５〕 前記Ｆタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - ４９位のアミノ酸のアミノ酸Ａによる置換；
 - ４０２位のアミノ酸のアミノ酸Ａによる置換；

及び、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - １４７位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - １５８位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記Ｆタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、〔１〕、又は〔２〕に記載の突然変異タンパク質。

〔６〕 前記Ｆタンパク質の配列から導き出される前記配列が、配列番号６８、６９、７０の配列から選択される配列である、〔５〕に記載の突然変異タンパク質。

〔７〕 前記Ｆタンパク質の配列から導き出される前記配列が、

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：
 - ５３位のアミノ酸のアミノ酸Ａによる置換；
 - ４０６位のアミノ酸のアミノ酸Ａによる置換；

及び／又は

- ・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：
 - １５１位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；
 - １６２位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記Ｆタンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、上記に記載の突然変異タンパク質。

〔８〕 前記疎水性アミノ酸が、Ｖ、Ｉ、Ｌから選択され、好ましくはＶである、〔７〕

」に記載の突然変異タンパク質。

〔 9 〕 前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

から選択される少なくとも一つの融合後突然変異によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、〔 7 〕又は〔 8 〕に記載の突然変異タンパク質。

〔 1 0 〕 前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

・以下から選択される少なくとも一つの融合前突然変異：

○53位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

○406位のアミノ酸のアミノ酸 A による置換；

及び、

・以下から選択される少なくとも一つの融合後突然変異：

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、〔 7 〕～〔 9 〕の何れかに記載の突然変異タンパク質。

〔 1 1 〕 前記 F タンパク質の配列から導き出される前記配列が、

○151位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換；

○162位のアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換

によって、前記 F タンパク質配列からさらに導き出されることを特徴とする、〔 7 〕～〔 1 0 〕の何れかに記載の突然変異タンパク質。

〔 1 2 〕 天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、一または複数の腫瘍組織によって酵素特異的に発現される切断サイトであることを特徴とする、上記の突然変異タンパク質。

〔 1 3 〕 天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、一または複数の転移性組織によって特異的に発現される酵素の切断サイトであることを特徴とする、〔 1 2 〕に記載の突然変異タンパク質。

〔 1 4 〕 天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、金属プロテアーゼの切断サイトであることを特徴とする、〔 1 2 〕又は〔 1 3 〕のいずれかに記載の突然変異タンパク質。

〔 1 5 〕 天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、マトリクス金属プロテアーゼ 9 (MMP-9) の切断サイトであることを特徴とする、〔 1 2 〕～〔 1 4 〕のいずれかに記載の突然変異タンパク質。

〔 1 6 〕 天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、配列PXXHyS/T (配列番号27) を含み、ここで、X = 任意のアミノ酸であり、Hy=F、M、V、L、Iから選択される任意のアミノ酸であることを特徴とする、〔 1 2 〕～〔 1 5 〕のいずれかに記載の突然変異タンパク質。

〔 1 7 〕 天然の切断サイト以外の前記切断サイトが、配列PRRIT (配列番号28) 及び／又は配列IGENLETIRNQLIPTPRRITFAGVVIGL (配列番号29) を含むことを特徴とする、〔 1 2 〕30～36のいずれかに記載の突然変異タンパク質。

〔 1 8 〕 配列番号88又は89の配列を含むことを特徴とする、〔 1 2 〕～〔 1 7 〕の何れかに記載の突然変異タンパク質。

〔 1 9 〕 発現ベクターであることを特徴とする、〔 1 8 〕に記載のベクター。

〔 2 0 〕 アデノウイルスベクターであることを特徴とする、〔 1 9 〕に記載の発現ベクター。

〔 2 1 〕 前記核酸の発現を制御するためのエレメントを含み、且つ、腫瘍細胞、好ましくは転移性細胞、より好ましくは転移性黒色腫細胞中の前記核酸の発現を可能にする、アデノウイルスベクターであることを特徴とする、〔 1 9 〕又は〔 2 0 〕に記載の発現ベクター。

〔 2 2 〕 動物細胞、好ましくはヒト細胞、特にヒト腫瘍細胞、好ましくは転移性ヒト

細胞のゲノムへの、より好ましくは転移性黒色腫細胞への、前記少なくとも一つの核酸の挿入を可能にするベクターであることを特徴とする、上記に記載のベクター。

〔23〕 ヒト細胞又は非ヒト動物細胞であることを特徴とする、上記に記載の細胞。

〔24〕 腫瘍細胞であり、好ましくは転移性細胞であり、より好ましくは転移性黒色腫細胞である、〔23〕に記載の細胞。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2012509077000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/001318

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/115 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	TERRIER O ET AL: "Engineering of a parainfluenza virus type 5 fusion protein (PIV-5 F): Development of an autonomous and hyperfusogenic protein by a combinational mutagenesis approach" VIRUS RESEARCH, vol. 146, no. 1-2, December 2009 (2009-12), pages 115-124, XP002573397, ISSN: 0168-1702 the whole document	
A	WO 02/077211 A (CRYPTIC AFFLICTIONS LLC [US]; ROBBINS STEVEN [US] CRYPTIC AFFLICTIONS) 3 October 2002 (2002-10-03) sequence 30 ----- -/-	1-62

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2010

Date of mailing of the international search report

31/03/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, Josée

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2009/001318

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RUSSELL CHARLES J ET AL: "A dual-functional paramyxovirus F protein regulatory switch segment: Activation and membrane fusion." JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 163, no. 2, 27 October 2003 (2003-10-27), pages 363-374, XP002533550 ISSN: 0021-9525 the whole document	1-62
A	KAWANO M ET AL: "Sequence of the fusion protein gene of human parainfluenza type 2 virus and its 3' intergenic region: Lack of small hydrophobic (SH) gene" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 178, no. 1, 1 September 1990 (1990-09-01), pages 289-292, XP023055964 ISSN: 0042-6822 [retrieved on 1990-09-01] the whole document	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/001318

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02077211 A	03-10-2002	AU 2002306472 B2	06-03-2008
		AU 2008202524 A1	26-06-2008
		CA 2436208 A1	03-10-2002
		EP 1373477 A2	02-01-2004
		JP 4324379 B2	02-09-2009
		JP 2005503766 T	10-02-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/001318

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 INV. C07K14/115 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 C07K C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	TERRIER O ET AL: "Engineering of a parainfluenza virus type 5 fusion protein (PIV-5 F): Development of an autonomous and hyperfusogenic protein by a combinational mutagenesis approach" VIRUS RESEARCH, vol. 146, no. 1-2, décembre 2009 (2009-12) , pages 115-124, XP002573397 ISSN: 0168-1702 le document en entier	
A	WO 02/077211 A (CRYPTIC AFFLICTIONS LLC [US]; ROBBINS STEVEN [US] CRYPTIC AFFLICTIONS) 3 octobre 2002 (2002-10-03) séquence 30	1-62
	----- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
 "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
 "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
 "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
 "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
 "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
 "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
 "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 mars 2010

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/03/2010

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, Josée

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°

PCT/FR2009/001318

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	RUSSELL CHARLES J ET AL: "A dual-functional paramyxovirus F protein regulatory switch segment: Activation and membrane fusion." JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 163, no. 2, 27 octobre 2003 (2003-10-27), pages 363-374, XP002533550 ISSN: 0021-9525 le document en entier	1-62
A	KAWANO M ET AL: "Sequence of the fusion protein gene of human parainfluenza type 2 virus and its 3' intergenic region: Lack of small hydrophobic (SH) gene" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 178, no. 1, 1 septembre 1990 (1990-09-01), pages 289-292, XP023055964 ISSN: 0042-6822 [extrait le 1990-09-01] le document en entier	1-62

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/001318

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02077211 A	03-10-2002	AU 2002306472 B2	06-03-2008
		AU 2008202524 A1	26-06-2008
		CA 2436208 A1	03-10-2002
		EP 1373477 A2	02-01-2004
		JP 4324379 B2	02-09-2009
		JP 2005503766 T	10-02-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02		4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12		
A 6 1 P 31/18 (2006.01)		A 6 1 P 31/18		
A 6 1 P 31/16 (2006.01)		A 6 1 P 31/16		
A 6 1 P 37/08 (2006.01)		A 6 1 P 37/08		
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	S	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088		
		A 6 1 K 48/00		
		A 6 1 K 35/12		
		A 6 1 K 31/7105		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 511123681

ユニベルジテ・クロード・ベルナール・ドゥ・リヨン 1

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD DE LYON 1

フランス国、6 9 6 2 2 ビイユールバンヌ・セデックス、ブールバール・デュ 1 1 ノベンプル 1 9 1 8 4 3

4 3, Bd du 11 Novembre 1918, 6 9 6 2 2 VILLEURBANNE CEDEX, France

(71)出願人 510017491

レ・オスプス・シビル・ドゥ・リヨン

LES HOSPICES CIVILS DE LYON

フランス国、6 9 4 2 4 リヨン・セデックス 0 3、アブニュ・ラカッサニュー・バティマン・エー 1 6 2

1 6 2, avenue Lacassagne-Batiment A, 6 9 4 2 4 LYON CEDEX 0 3, France

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100091351

弁理士 河野 哲

(74)代理人 100088683

弁理士 中村 誠

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克

(72)発明者 ロサ・カラトラバ、マニユエル・メルショワ・ジャンーピエール
フランス国、6 9 0 0 3 リヨン、リュ・モンブリヤン 9 ビス

(72)発明者 テリエ、オリビエ
フランス国、6 9 0 0 8 リヨン、アンパッス・ベルシェ 4

(72)発明者 デュルプ、フランソワ・エデュアル・ジュリアン
フランス国、6 9 0 0 3 リヨン、カイ・オーガニユール 2 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA32 CA07 DA02 EA04 GA11 HA01 HA14 HA17
4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55 QR72 QR77
QS34 QS38 QX01
4B065 AA93X AA97Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA45 CA46
4C084 AA13 MA55 NA14 ZB082 ZB132 ZB212 ZB332 ZC202 ZC552
4C085 AA03 AA13 AA14 BB31 BB41 BB43 CC22 CC23 DD62 EE01
GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB08 ZB13 ZB21
ZB33 ZC20 ZC55
4C087 AA01 AA02 BB65 CA04 CA12 MA67 NA10 NA14 ZB08 ZB13
ZB21 ZB33 ZC20 ZC55
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 DA86 EA31 EA51 FA74