

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 281

(P2003 - 281A)

(43)公開日 平成15年1月7日(2003.1.7)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/711	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/711		39/395	F 4 B 0 2 4
38/21		45/00	4 B 0 6 3
39/395		48/00	4 B 0 6 4
45/00		A 6 1 P 1/00	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 45 O L (全136数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002 - 53157(P2002 - 53157)

(22)出願日 平成14年2月28日(2002.2.28)

(31)優先権主張番号 0102843

(32)優先日 平成13年3月1日(2001.3.1)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 502073278

ジェンオディセ

フランス国,91974 クールタブーフ,レ ユ  
リ,ベ.ペ.810,バ アルファ,アブニュ デ  
ユ カナダ 3,パルク ダフェーレ テク  
ノポリ

(72)発明者 ジャン - ルイ エスカリ

フランス国,78150 ル シュスナイ,リュ  
モクスーリ 4

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I F Nアルファ-2 遺伝子の新規ポリヌクレオチド及びポリペプチド

(57)【要約】 (修正有)

【課題】天然野生型 I F N - 2 タンパク質と異なる機能を有し得る、新規ポリペプチド及び新規ポリヌクレオチドの提供。

【解決手段】本発明は I F N - 2 遺伝子のヌクレオチド配列に由来し、そして新規 S N P を含んで成る新規ポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、天然野生型タンパク質 I F N - 2 に由来し、そして本発明の S N P によって生じた変異を含んで成る新規ポリペプチドに関する。本発明は更に、当該新規ポリヌクレオチド及びポリペプチドの治療上例えばガン及び腫瘍，感染症，中枢神経系の疾患などでの使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 配列番号1の配列又はそのコード配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列であって、以下のコードSNP：c527a又はg1023aのうちの少なくとも1つを含むと理解されるヌクレオチド配列、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列又はそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが以下のコードSNP：c527a, g1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】 配列番号1の配列又はそのコード配列から成り、当該配列のうちのそれぞれ1つが、以下のコードSNP：c527a, g1023aのうちの少なくとも1つを含むと理解されることを特徴とする、請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 ヌクレオチド配列a)がc527a及びg1023aから成る群から選択される単一のコードSNPを含むことを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c1047tのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、の一部から成る単離されたポリヌクレオチドであって、少なくとも10個のヌクレオチドから構成される単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】 a) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24～188位に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列であって；a)及びb)におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ1つが、以下のコードSNP：A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、を含んで成る

ポリペプチドをコードすることを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項8】 A6D及びM171Iから成る群から選択される、単一のコードSNPを含むポリペプチドをコードすることを特徴とする、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列との80～100%の同一性を有するポリヌクレオチド、及び/又は

b) 請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの、全部又は一部の使用であって、

配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが、以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものと80～100%の同一性を有するポリヌクレオチドの全部又は一部を同定し、ハイブリダイズし、そして/あるいは増幅するための使用。

【請求項10】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列と80～100%の同一性を有するポリヌクレオチド、及び/又は

b) 請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの、全部又は一部の使用であって、

配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが、以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものと、80～100%の同一性を有するポリヌクレオチドの全部又は一部の遺伝子型判定(genotyping)のための使用。

【請求項11】 遺伝子型判定がミニ配列決定によって行われる、請求項10に記載の使用。

【請求項12】 請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター。

【請求項13】 請求項12に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞。

【請求項14】 請求項13に記載の宿主細胞が培養液中で培養され、そしてポリペプチドが当該培養液から単離されることを特徴とする、ポリペプチドの調製方法。

【請求項15】 a) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24～188位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a)及びb)におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ1つが、以下のSNP：A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものと、少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成る単離されたポリ

ペプチド。

【請求項16】 a) 配列番号2のアミノ酸配列、又は b) 配列番号2のアミノ酸配列の24～188位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって; a) 及び b) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ1つが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、を含んで成ることを特徴とする、請求項15に記載のポリペプチド。

【請求項17】 a) 配列番号2のアミノ酸配列、又は b) 配列番号2のアミノ酸配列の24～188位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a) 及び b) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ1つが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものから成ることを特徴とする、請求項15又は16に記載のポリペプチド。

【請求項18】 a) 及び b) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ1つが、A6D及びM171Iから成る群から選択される単一のコードSNPを含むことを特徴とする、請求項15～17のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項19】 免疫特異的抗体を得るための方法であって、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドを用いる、動物の免疫感作によって得られることを特徴とする方法。

【請求項20】 請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドのための免疫特異的抗体。

【請求項21】 請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドを活性化し、又は阻害する物質の同定のための方法であって:

- a) 請求項1～4, 6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、
  - b) a) に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、
  - c) b) に記載の宿主細胞と、試験され得る物質との接触、及び
  - d) 試験され得る物質によって生じる活性化又は阻害作用の決定、
- を含んで成る方法。

【請求項22】 請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドによって活性化され、又は阻害される物質の同定方法であって、

- a) 請求項1～4及び6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、
  - b) a) に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、
  - c) b) に記載の宿主細胞と、試験され得る物質との接触、及び
  - d) 前記ポリペプチドによって生じる、試験され得る物質に対する活性化又は阻害作用の決定、
- を含んで成る方法。

【請求項23】 対象者において、本発明に記載のポリヌクレオチド及び/又は本発明に記載のポリペプチドの生物学的特性を解析するための方法であって、以下の、

- a) 対象者のゲノムにおいて、請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの存在又は非存在を決定し、
  - b) 対象者において、請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを決定し、
  - c) 対象者において、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの存在又は非存在を決定し、
  - d) 対象者において、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの濃度を決定し、
  - e) 対象者において、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの機能性を決定すること、
- のうちの少なくとも1つを含んで成る方法。

【請求項24】 活性物質の目的で、請求項15～18のいずれか1項に記載の少なくとも1つのポリペプチドを含んで成る薬物。

【請求項25】 ガン及び腫瘍、心臓血管疾患、代謝病、感染症、中枢神経系の疾患、免疫学的及び自己免疫学的に関連している疾患、創傷治癒、化学療法処置と関連づけられる疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、胃腸疾患、性病から成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項26】 癌腫、例えば転移型腎癌、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、心臓血管疾患、肥満、ウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、創傷治癒、化学療法と関連している疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、クローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに生殖器のイボから成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項27】 活性物質の目的で、請求項1～4及び6～8のいずれか1項に記載の、少なくとも1つのポリヌクレオチド、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体を含んで成る薬物。

【請求項28】 ガン及び腫瘍、心臓血管疾患、代謝病、感染症、中枢神経系の疾患、免疫学的及び自己免疫学的に関連している疾患、創傷治癒、化学療法処置と関連づけられる疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆

症、胃腸疾患、性病から成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項1~4及び6~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体の使用。

【請求項29】 癌腫、例えば転移型腎癌、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、心臓血管疾患、肥満、ウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、創傷治癒、化学療法と関連している疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、クローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに生殖器のイボから成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項1~4及び6~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体の使用。

【請求項30】 活性物質の目的で、請求項15~18のいずれか1項に記載の少なくとも1つのポリペプチド、請求項1~4及び6~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの全部又は一部、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体、並びに医薬として許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項31】 活性物質の目的で、請求項15~18のいずれか1項に記載の少なくとも1つのポリペプチド、請求項1~4及び6~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの全部又は一部、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体を含む診断組成物。

【請求項32】 a) 治療上有効な量の、請求項15~18のいずれか1項に記載のポリペプチド、及び/又は b) 請求項1~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、及び/又は c) 処置され得る対象者に由来する、請求項13に記載の宿主細胞の使用であって；請求項15~18のいずれか1項に記載のポリペプチドの、対象者における発現又は活性を増大せしめることを意図する薬物を調製するための使用。

【請求項33】 a) 治療上有効な量の、請求項20に記載の抗体、及び/又は b) 請求項1~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現の阻害を可能にするポリヌクレオチド、の使

用であって、請求項15~18のいずれか1項に記載のポリペプチドの、対象者における発現又は活性を減少せしめることを意図する薬物を調製するための使用。

【請求項34】 患者のゲノムにおける、配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列であって、以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの1つを含んで成るヌクレオチド配列の存在と関連しているIFN-2変異体によって生じる疾患又は病気を有する前記患者の予防又は処置のための薬物の調製のための、IFN-2タンパク質の使用。

【請求項35】 IFN-2遺伝子のポリヌクレオチド内の、以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つと、病気又は病気に対する耐性ととの間の、統計学的に関連している関係を決定するための方法であって、

a) 個体群を遺伝子型判定し、  
b) 前記個体群内の前記病気又は病気に対する耐性の分布を決定し、  
c) 遺伝子型のデータと、前記病気又は病気に対する耐性の分布とを比較し、そして  
d) 統計的に関連している関係についての前記比較を解析すること、  
を含んで成る方法。

【請求項36】 病気又は病気に対する耐性のための診断/予後のキットを開発するための、IFN-2遺伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つの使用。

【請求項37】 M171I変異型IFN-2の遺伝子産物と比較して、実質的に類似又はそれ以下の生物活性を有する新規化合物。

【請求項38】 前記生物活性が、例えばDauid Burkitt細胞系上での細胞の抗増殖活性又はシグナル伝達能を測定することによって評価される、請求項37に記載の化合物。

【請求項39】 天然の野生型IFN-2よりも少なくとも15倍低い、Dauid Burkitt細胞系上での細胞の抗増殖活性を有する新規化合物。

【請求項40】 天然の野生型IFN-2よりも少なくとも10倍低い、MCF7細胞上でのシグナル伝達能を有する新規化合物。

【請求項41】 請求項37~40のいずれか1項に記

載の化合物の同定のための、M171IのSNPを含む、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項42】 以下の段階：

a) 生物活性、例えばDaudi Burkitt細胞系上での細胞の抗増殖活性又はシグナル伝達能を決定し、

b) 試験され得る化合物の、段階a)で決定した活性を、M171I変異型IFN $\gamma$ 2の遺伝子産物の活性と比較し、そして

c) 段階b)で実施した比較に基づき、試験され得る化合物が、M171I変異型IFN $\gamma$ 2の遺伝子産物と比較して実質的に類似又はそれより低い活性を有するか否かを決定すること、

を含んで成る、請求項37～40のいずれか1項に記載の化合物の同定方法。

【請求項43】 試験され得る化合物が、合成ペプチドコンビナトリアルライブラリー、高処理量スクリーニングからあらかじめ同定され、又はコンピューターを使ったドラッグデザインによって設計された結果、M171I IFN $\gamma$ 2遺伝子産物のポリペプチドと同一の三次元構造及び/又は化学作用を有することを特徴とする、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 ガン及び腫瘍、心臓血管疾患、代謝病、感染症、中枢神経系の疾患、免疫学的及び自己免疫学的に関連している疾患、創傷治癒、化学療法処置と関連づけられる疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、胃腸疾患、性病から成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項37～40のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【請求項45】 癌腫、例えば転移型腎癌、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、心臓血管疾患、肥満、ウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、創傷治癒、化学療法と関連している疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、クローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに生殖器のイボから成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項37～40のいずれか1項に記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明はIFN $\gamma$ 2遺伝子のヌクレオチド配列に由来し、そして新規SNPを含んで成る新規ポリヌクレオチド、天然IFN $\gamma$ 2タンパク質に由来

し、そしてこれらのSNPによって生じる突然変異を含んで成る新規ポリペプチド、及びそれらの治療上での使用に関する。

【0002】従来技術

インターフェロンアルファ $\gamma$ 2 (IFN $\gamma$ 2) 遺伝子は以下の刊行物に記載されている：

- Olopade OI., Bohlander Sk. "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia.

10 a." Genomics. 1992 Oct ; 14 (2) : 437-43 ;

- Ezekowitz Ra., Mulliken Jb., "Interferon alpha-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy" N. Engl. J. Med. 1992 May 28 ; 326 (22) : 1456-63.;

- Dithmar S., Rusciano D., "Neoadjuvant interferon alpha-2b treatment in a murine model for metastatic ocular melanoma : a preliminary study" Arch. Ophthalmol. 2000 Aug ; 118 (8) : 1085-9.

【0003】この遺伝子のヌクレオチド配列は、GenBankのデータベースにおいてアクセス番号J00207, V11834のもとアクセス可能である。

【0004】IFN $\gamma$ は、それらの細胞性抗増殖作用、並びに抗ウイルス性及び抗寄生虫性応答におけるそれらの関与について知られている。

【0005】IFN $\gamma$ はまた、造血幹細胞のレベルで複数の他のサイトカインの発現を阻害し、そしてある腫瘍の細胞増殖を阻害することも知られている。

【0006】IFN $\gamma$ はまた、腎ガンにおけるEGF受容体の発現を低下させ、あるミトコンドリア遺伝子の発現を阻害し、そして線維芽細胞、単球及びBリンパ球の増殖を、特に*in vitro*で阻害し、そしてBリンパ球による抗体の合成を阻止することも知られている。

【0007】IFN $\gamma$ はまた、腫瘍細胞の表面上での腫瘍特異的抗原の発現を誘導すること、そして更にはISRE型 (インターフェロン刺激応答因子) のプロモーター領域の支配下にある遺伝子を、これらのISREの特異的な転写因子に対して作用させることによって誘導することも知られている。

【0008】IFN $\gamma$ が異なる障害及び/又はヒトの疾患、例えば、限定しないが異なるガン、例えばガン腫、黒色腫、リンパ腫、白血病並びに肝臓、首、頭及び腎臓のガン、心臓血管疾患、代謝病、例えば免疫系等と関連していないもの、例えば肥満、感染症、例えばB型及びC型肝炎並びにAIDS、感染性肺炎、潰瘍性大腸炎、中枢神経系等の病気、例えばアルツハイマー病、精神分裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、創傷治癒、透析されている患者の貧血、アレルギー、喘息、多発性硬化症、骨粗鬆症、乾癬、リウマチ様関節炎、クローン病、自己免疫疾患及び障害、胃腸疾患、並びに化学療法処置と関連している障害、に關与することが知られてい

る。

【0009】IFN は、ある白血病、転移型腎ガン及び免疫欠損後に現れる腫瘍、例えばAIDSの場合にはカポジ肉腫に特に使用される。IFN は、他のタイプの腫瘍及びあるウイルス感染に対しても有効である。IFN はまた、生殖器のイボ又は性病の処置についてFDA（食品医薬品局）によって承認されている。

【0010】しかしながら、IFN、特にIFN-2は、それらを医薬組成物において使用する場合に多くの副作用があり、例えば急性過敏症（じん麻疹、気管支収縮、アナフィラキシーショック等）、心不整脈、低血圧、てんかん性発作、甲状腺機能についての問題、流感様症候群（発熱、発汗、筋肉痛）等である。

【0011】更に、IFN で処置された患者はこれらの分子に対する抗体を発生させることがあり、これはそれらの有効性を中和して、その結果低下させる。

【0012】本発明は、IFN-2遺伝子及びその対応するタンパク質に対する、天然野生型IFN-2タンパク質と異なる機能を有し得る、新規ポリペプチド及び新規ポリヌクレオチドについて記載する。特に、これらの新規ポリペプチド及び新規ポリヌクレオチドのいくつかは、天然野生型IFN-2との比較で有意に阻害される細胞抗増殖活性を有する。

【0013】これらの新規ポリペプチド及びポリヌクレオチドは、特に前述の障害又は疾患を処置又は予防し、そしてそれらに関連している欠点の全部又は一部を避けるために使用され得る。

【0014】本発明  
本発明は、参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列と異なる、1又は複数のSNP（一塩基多型）を含んで成る新規ポリヌクレオチドに関する。

【0015】ヒト参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1は1733ヌクレオチドから成り、そしてヌクレオチド511（開始コドン）からヌクレオチド1077（終止コドン）に及び567ヌクレオチドのコード配列を含んで成る。

【0016】本出願人は、参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列中で9個のSNPを同定した。

【0017】これらの9個のSNPは以下の通りである：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t。

【0018】当然のことながら、本発明の意味において、番号付けは、あらかじめ定義したSNPの位置に対応し、そして配列番号1に示したヌクレオチド配列と関連している。

【0019】文字a, t, c及びgは、それぞれ窒素性塩基のアデニン、チミン、シトシン及びグアニンに対応する。

【0020】最初の文字は野生型のヌクレオチドに対応し、一方、最後の文字は変異型ヌクレオチドに対応する。

【0021】この様に、例えばSNP c527aは、参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1の、527位のヌクレオチドであるシトシン(c)が、アデニン(a)に変異したことに対応し、そしてSNP 96-100del(aattt)は、参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1の96~100位までの5個のヌクレオチドaatttが欠失した変異に対応する。

【0022】これらのSNPは、引用によって本明細書に組み入れられる、2000年12月6日に提出された出願人の特許出願FR0022894及び2001年12月6日に提出されたUS10/010749に記載の決定方法を用いて本出願人によって同定された。

【0023】これらの特許出願に記載の方法は、無作為な個体群由来の少なくとも1つの個体において、1（又は複数）の既存のSNPの同定を可能にする。

【0024】本発明の範囲において、一方が完全なコード配列を含んで成る、IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列の2つのフラグメントが、無作為な方法で選択した個体群の異なる個体から単離された。

【0025】続いて、これらのフラグメントの配列決定が、DHPLC（「変性-高性能液体クロマトグラフィ」）による解析の後、ヘテロ二重鎖プロファイル（すなわち、参照野生型IFN-2遺伝子配列と異なるプロファイル）を有するこれらの試料のうちのいくつかについて行われた。

【0026】この方法で配列決定されたフラグメントを、次に参照野生型IFN-2遺伝子のフラグメントのヌクレオチド配列と比較し、そして本発明に基づくSNPが同定された。

【0027】この様にSNPは天然のものであり、そしてこれらの各々が世界の人口のある個体に存在している。

【0028】参照野生型IFN-2遺伝子は、最初の23アミノ酸を含むシグナルペプチドの開裂によって165アミノ酸の成熟タンパク質に変換され得る、アミノ酸配列である配列番号2に対応する、188アミノ酸の未成熟タンパク質をコードする。

【0029】本発明のコードSNPのいずれか、すなわちc527a及びg1023aは、アミノ酸配列のレベルで、IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の修飾をもたらす。

【0030】アミノ酸配列におけるこれらの修飾は以下の通りである：SNP c527aは、アミノ酸配列である配列番号2に対応する、IFN-2遺伝子によってコードされる未成熟タンパク質の6位のアミノ酸であるアラニン(A)をアスパラギン酸(D)に変異させ、

そしてこれはシグナル配列に属するので、成熟タンパク質には存在していない。本発明の説明において、このSNPによってコードされる突然変異は、A6Dと称されることもある。

【0031】SNP c527aは当該タンパク質のシグナル配列に位置するアミノ酸残基に影響を及ぼす。このシグナル配列は、成熟タンパク質の適切なターゲティングに必要な全ての情報を含む。従って、SNP c527aは成熟タンパク質の最終的な局在に影響を及ぼし得る。

【0032】SNP g1023aは、アミノ酸配列である配列番号2と対応する、IFN-2遺伝子によってコードされる未成熟タンパク質の171位のアミノ酸であるメチオニン(M)をイソロイシン(I)に変異させ、そしてこれは成熟タンパク質の148位に当する。本発明の説明において、用語M148I及びM171Iは、一方がそれぞれ成熟タンパク質又は未成熟タンパク質を言及するかどうかに従い、このSNPによってコードされる突然変異を言及するために使用され得る。

【0033】SNP g1023aは、参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと比較して、本発明に従うポリペプチドの空間的配座の修飾をもたらす。

【0034】空間的配座における修飾は、当業者に周知の方法に従い、例えばSEQFOLD/MSI)、ホモロジー(例えば、MODELER/MSI)、力場の最小化(例えば、DISCOVER, DELPHI/MSI)及び/又は分子動力学(CFF/MSI)を利用して、コンピューター分子モデリングによって観察され得る。

【0035】その様なモデリングの一例は、本明細書において実験の項目に示される。

【0036】コンピューター分子モデリングは、成熟変異型タンパク質上の突然変異M148Iが、IFN-2のヘリックスA及びE上の、突然変異の部分に近い側方の鎖における変化をもたらすという観察を可能にする。変異した側方の鎖のI148は、側方の鎖のE141と塩橋で会合しており、これは成熟変異型タンパク質の空間的配座におけるいくつかの変化をもたらす。一方、野生型IFN-2の三次元配座において、R144の側方鎖は当該分子の内部に向かって配置され、R144の側方鎖は成熟変異型タンパク質の外側に向かって配置される。同様に、成熟変異型タンパク質において、R22及びE141の側方鎖は置換される。この様に、変異型タンパク質は、天然野生型IFN-2タンパク質と異なる三次元配座を有する。

【0037】この様に、コンピューター分子モデリングは、148位のアミノ酸、メチオニンの存在が参照野生型IFN-2タンパク質の構造及び機能の重大な修飾に関与するという予想を可能にする。

【0038】本発明に従う他のSNP、すなわち96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c1047tは、アミノ酸配列である配列番号2のレベルで、IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の修飾に関与しない。

【0039】SNP c1047tはサイレントであり、そしてSNP 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427tは非コード領域である。

【0040】本発明に従うポリヌクレオチドの遺伝子型判定(genotyping)は、群におけるこれらのポリヌクレオチドの対立遺伝子頻度を決定する様な方法で実施され得る。遺伝子型判定の6個の例を、後文の実験の項目において提示する。

【0041】本発明のポリペプチドの機能性の決定も、それらの生物活性の試験によって実施され得る。

【0042】これについては、例えばDaudi Burkitt's細胞系に対する、本発明に従うポリペプチドの抗増殖作用を測定し、そして天然野生型IFN-2タンパク質と比較することが可能である。

【0043】機能性の決定の一例は、後文の実験の項目において提示する。

【0044】本発明はまた、本発明に従うポリヌクレオチド及びポリペプチド並びにこれらのポリヌクレオチド及びポリペプチドから出発して得られ、そして/あるいは同定される治療分子の使用であって、特にあるヒトの障害及び/又は疾患の予防及び処置のための使用に関する。

#### 【0045】本発明の詳細な説明 定義

「参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列」とは、ヒト遺伝子のヌクレオチド配列、配列番号1であると理解される。

【0046】この配列は、GenBankにおいて、アクセッション番号J00207, V11834のもとアクセス可能であり、そしてOlopade OI., Bohlander Sk. 「Mapping of the Shortest region of overlap of deletions of the Short arm of Chromosome 9 associated with human neoplasia», Genomics. 1992 Oct; 14(2): 437-43に記載されている。

【0047】「天然野生型IFN-2タンパク質」とは、参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされる成熟タンパク質であると理解される。天然野生型未成熟IFN-2タンパク質は、ペプチド配列である配列番号2に対応する。

【0048】「ポリヌクレオチド」とは、修飾型又は非修飾型DNA又はRNAであり得るポリリボヌクレオチ

ド又はポリデオキシリボヌクレオチドであると理解される。

【0049】用語ポリヌクレオチドは、例えば一本鎖又は二本鎖DNA、1又は複数の一本鎖領域及び1又は複数の二本鎖領域の混合物から成るDNA、一本鎖又は二本鎖RNA並びに1又は複数の一本鎖領域及び1又は複数の二本鎖領域の混合物から成るRNAを含む。用語ポリヌクレオチドは、更に1又は複数の三本鎖領域を含むRNA及び/又はDNAを含むこともある。ポリヌクレオチドとは、安定性の理由又は他の理由のために修飾された骨格を有する様な方法で修飾された1又は複数の塩基を含むDNA及びRNAであると等しく理解される。修飾された塩基とは、例えば異常な塩基、例えばイノシンであると理解される。

【0050】「ポリペプチド」とは、例えば同じペプチドの場合には通常の又は修飾されたペプチド結合によって、互いに連結した、少なくとも2つのアミノ酸を含んで成るペプチド、オリゴペプチド、オリゴマー又はタンパク質であると理解される。

【0051】本発明に従うポリペプチドは、遺伝コードによって定義される、20アミノ酸以外のアミノ酸から成ることがあり、そして当業者に周知の、天然の過程、例えば翻訳後成熟過程又は化学的過程によって修飾されたアミノ酸から成ることもある。その様な修飾は文献において完全に詳述されている。これらの修飾は、ポリペプチド、ペプチド骨格、アミノ酸鎖において、又は例えばカルボキシ末端若しくはアミノ末端であっても、いずれかに出現し得る。

【0052】ポリペプチドはユビキチン結合後に枝分かれするか、あるいは枝分かれしながら又は枝分かれせずに環状化することがある。このタイプの修飾は、当業者に周知の天然又は合成翻訳後過程の結果であり得る。

【0053】ポリペプチドの修飾は、例えばアセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘムの共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、共有又は非共有架橋、還元、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、システイン形成、ピログルタミン酸塩形成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解過程、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セネロイル化 (seneloylation)、硫酸化、アミノ酸付加、例えばアルギニル化又はユビキチン結合を含むことがある。その様な修飾は文献：PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2<sup>nd</sup> Ed., T.E. Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modificatio

ns and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182 : 626-646, and Rattan et al. "Protein Synthesis : Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663 : 48-62、において十分に詳述されている。

【0054】「単離されたポリヌクレオチド」又は「単離されたポリペプチド」とは、例えば既に定義されている様な、ヒトの身体から単離され、又はさもなければ技術的手法によって産生されるポリヌクレオチド又はポリペプチドであると理解される。

【0055】「同一性」とは、ヌクレオチド又はポリペプチド配列の同一性の測定値であると理解される。

【0056】同一性は当業者にとって周知の用語であり、そして文献に詳細に記載されている。COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998 ; BIOCOMPUTING INFORMATICS AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993 ; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M. and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994 ; and SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987を参照のこと。

【0057】2つの配列間の同一性及び類似性を決定するために一般的に利用される方法も、文献において詳細に記載されている。GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied Math (1988) 48 : 1073を参照のこと。

【0058】例えば、ヌクレオチド配列である配列番号1と少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドは、前記配列と比較して、100ヌクレオチドの範囲に多くても5個所の突然変異を含むポリヌクレオチドである。

【0059】これらの突然変異の個所は、1(又は複数)のヌクレオチドの1(又は複数)の置換、付加及び/又は欠失であってもよい。

【0060】同様に、例えば、アミノ酸配列である配列番号2と少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドは、前記配列と比較して、100ヌクレオチドの範囲に多くても5個所の突然変異を含むポリペプチドである。

【0061】これらの突然変異の個所は、1(又は複数)のアミノ酸の1(又は複数)の置換、付加及び/又は欠失であってもよい。

【0062】本発明のSNPのうち少なくとも1つを含む、ヌクレオチド配列である配列番号1又はアミノ酸配列である配列番号2とそれぞれ完全には同一ではない、本発明に従うポリヌクレオチド及びポリペプチドは、それらの配列の変異体とみなされる。

【0063】通常、本発明に従うポリペプチドは、本発

明のSNPのうち少なくとも1つを含んで成るヌクレオチド配列、配列番号1と、同一又は事実上同一の生物活性を有する。

【0064】同様に、本発明に従うポリペプチドは通常、本発明のコードSNPのうち少なくとも1つを含んで成るアミノ酸配列、配列番号2と同一又は事実上同一の生物活性を有する。

【0065】本発明に従う変異体は、例えば部位指定突然変異導入法又は直接合成によって得ることができる。

【0066】「SNP」とは、ヌクレオチド配列における塩基の何らかの天然の変異であると理解される。ヌクレオチド配列のSNPは、コード、サイレント又は非コードであってもよい。

【0067】コードSNPは、このヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列における1又は複数のアミノ酸の修飾に關与するコード配列における多型である。この場合、用語SNPは、拡大解釈すれば、アミノ酸配列中の突然変異にも適用される。

【0068】サイレントSNPは、このヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列におけるアミノ酸の修飾に全く關与しないヌクレオチド配列のコード配列における多型である。

【0069】非コードSNPは、ヌクレオチド配列の非コード配列における多型である。この多型は、特にイントロン、スプライシング領域、転写プロモーター又はエンハンサー部位の配列において見られる。

【0070】「機能的SNP」とは、既に定義した様な、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に含まれ、そしていくつかの機能を有するSNPであると理解される。

【0071】「機能性」とは、ポリペプチド又はポリヌクレオチドの生物活性であると理解される。

【0072】本発明に従うポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能性は、参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列又はこの後述するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの生物活性の保存、増大、減少又は抑制から成るといえる。

【0073】本発明に従うポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能性は、同様に参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列又はこの後述するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの生物活性の性質における変化から成るともいえる。

【0074】生物活性は、特に本発明に従うポリペプチドと受容体との親和性又は親和性の不在と関連していることがある。

【0075】ポリヌクレオチド

本発明は、

a) 配列番号1の配列又はそのコード配列(ヌクレオチド511~ヌクレオチド1077)との少なくとも80%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、更に好ましくは少なくとも95%の同一性、そしてより更

に好ましくは少なくとも99%の同一性を有するヌクレオチド配列であって、以下のコードSNP:c527a又はg1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0076】本発明は、同様に、

a) ヌクレオチド配列である配列番号1又はそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下のコードSNP:c527a又はg1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、あるいは、

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0077】好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1の配列又はそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下のコードSNP:c527a, g1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるものから成る。

【0078】本発明に従い、既に定義したポリヌクレオチドは、c527a及びg1023aから成る群から選択される単一のコードSNPを含んで成る。

【0079】既に定義した様なポリヌクレオチドは、更に以下の非コード及びサイレントSNP:96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c1047t、のうちの少なくとも1つを含むことがある。

【0080】本発明はまた、

a) ヌクレオチド配列である配列番号1又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下の非コード又はサイレントSNP:96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t又はc1047t、のうちの少なくとも1つを含んで成る様なもの;あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成り、又はそれらから成る単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0081】当然ながら、サイレントSNP c1047tのみがヌクレオチド配列である配列番号1のコード配列に位置する。

【0082】本発明はまた、

a) ヌクレオチド配列である配列番号1又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下のSNP:96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t、うちの少なくとも1

つを含む様なもの；あるいは

b) a) におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、の一部から成る単離されたポリヌクレオチドであって、少なくとも10個のヌクレオチドから構成されるものに関する。

【0083】好ましくは、上文で定義した様な単離されたポリヌクレオチドは10～40個のヌクレオチドから構成される。

【0084】本発明はまた、

a) アミノ酸配列である配列番号2、又は  
b) アミノ酸配列である配列番号2の24～188位に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列であって、a) 及び b) におけるアミノ酸配列のそれぞれが、以下のコード SNP: A6D, M171I、のうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、を含んで成るポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0085】当然のことながら、本発明の意味において、A6D, M171I の SNP の位置に対応する番号は、アミノ酸配列である配列番号2の番号に関連している。

【0086】本発明の好ましい態様において、既に定義されているポリペプチドは、上文で定義した様な単一のコード SNP を含んで成る。

【0087】好ましくは、本発明に従うポリヌクレオチドは、DNA 又は RNA 分子から構成される。

【0088】本発明に従うポリヌクレオチドは、標準的な DNA 又は RNA 合成法によって得ることができる。

【0089】本発明に従うポリヌクレオチドも、ヌクレオチド配列である配列番号1上の各 SNP のための変異型ヌクレオチドによって野生型ヌクレオチドを修飾することによって、IFN-2 遺伝子のヌクレオチド配列から出発する、部位指定突然変異導入法によって得ることができる。

【0090】例えば、SNP g1023a を含んで成る、本発明に従うポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列である配列番号1の1023位にあるグアノシン (g) をアデノシン (a) に変化させることによって、IFN-2 遺伝子のヌクレオチド配列から出発する、部位指定突然変異導入法によって得ることができる。

【0091】この様に実施され得る部位指定突然変異導入法の過程は当業者にとって周知であり、刊行物である TA Kunkel の、1985年の「Proc. Natl. Acad. Sci. US A」82: 488を参照のこと。

【0092】単離されたポリヌクレオチドも、例えば、ブレ、プロ又はブレ-プロタンパク質のアミノ酸配列又はマーカーアミノ酸配列、例えばヘキサヒスチジンペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むことがある。

【0093】本発明のポリヌクレオチドはまた、融合タンパク質又は他の精製産物を得るために、他のタンパク

質又はタンパク質フラグメントをコードするヌクレオチド配列を伴うこともある。

【0094】本発明に従うポリヌクレオチドはまた、ヌクレオチド配列、例えば5 及び/又は3 非コード配列、例えば転写又は非転写配列、翻訳又は非翻訳配列、スプライシングシグナル配列、ポリアデニル化配列、リボソーム結合配列あるいは mRNA を安定化する配列でさえも含むことがある。

【0095】前記ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列は、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件下で、このヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るものと定義される。

【0096】「ストリンジントなハイブリダイゼーション条件」とは、ヌクレオチド配列が少なくとも80%、好ましくは90%以上、より更に好ましくは95%以上、そして最も好ましくは97%以上の同一性を有する場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする化学条件であると広く理解されるが必ずしもそうではない。

【0097】ストリンジントな条件は、当業者にとって周知な方法に従い、例えば50%ホルムアミド、5×SSC (150mMのNaCl, 15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH=7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20µgの変性サケ精子DNAを含んで成る溶液中での、42 での前記ポリヌクレオチドのインキュベーション、続く0.1×SSC、65 でのフィルターの洗浄によって得ることができる。

【0098】本発明の範囲において、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件のみが、100%に等しい同一性を有するヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを可能にする場合、ヌクレオチド配列は、a) において記載した様なヌクレオチド配列と厳密に相補的であると考えられる。

【0099】当然のことながら、本発明の意味において、ヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチドは、本発明に従う少なくとも1つのアンチセンスSNPを含んで成る。

【0100】従って、例えば、前記ヌクレオチド配列がSNP g1023aを含んで成る場合、その相補ヌクレオチド配列は1023位と同等の位置に、チミン (t) を含んで成る。

【0101】SNPを含んで成るポリヌクレオチドの同定、ハイブリダイゼーション及び/又は増幅

本発明はまた、

a) ヌクレオチド配列である配列番号1と80～100%の同一性を有するポリヌクレオチド、及び/又は b) 少なくとも1つのSNPを含んで成る、本発明に従うポリヌクレオチド、の全部又は一部の使用であって、ヌクレオチド配列である配列番号1又は、必要によりそのコード配列 (ヌクレ

オチド511~ヌクレオチド1077)と80~100%の同一性を有するポリヌクレオチドの全部又は一部であって、これらの配列のそれぞれ1つが以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t、のうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、を同定し、ハイブリダイズし、そして/あるいは増幅するための使用に関する。

#### 【0102】遺伝子型判定及びSNPの頻度の決定

本発明はまた、

a)ヌクレオチド配列である配列番号1と80~100%の同一性(好ましくは少なくとも90%の同一性、更に好ましくは95%の同一性、そして特に100%の同一性)を有するポリヌクレオチド、及び/又はb)少なくとも1つのSNPを含んで成る、本発明に従うポリヌクレオチド、

の全部又は一部の使用であって、配列番号1又は、必要によりそのコード配列(ヌクレオチド511~ヌクレオチド1077)と80~100%の同一性(好ましくは少なくとも90%の同一性、更に好ましくは95%の同一性、そして特に100%の同一性)を有するポリヌクレオチドの全部又は一部であって、これらの配列のそれぞれ1つが、以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t、のうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるものの、遺伝子型判定のための使用という目的を有する。

【0103】本発明に従い、遺伝子型判定は個体又は個体群、最も好ましくは個体群で行われ得る。遺伝子型は、1又は複数の特異的な遺伝子座に存在する対立遺伝子の決定から成る。

【0104】本発明の意味において、遺伝子型判定は個体又は個体群の遺伝子型の決定のための方法として定義される。遺伝子型は、1又は複数の特異的な遺伝子座に存在する対立遺伝子から成る。

【0105】「個体群」とは、ランダムな方法又はランダムでない方法で選択された、決定される個体の一群であると理解される。これらの個体はヒト、動物、微生物又は植物であってもよい。通常、個体群は少なくとも10人、好ましくは100~300人含んで成る。

【0106】個体は、それらの民族性に従い、又はそれらの表現型に従い、特に以下の障害及び/又は疾患によって影響を受けるものが選択され得る:

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合

合カボジ肉腫、

- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、

創傷治癒、

化学療法と関連している疾患、

透析されている患者の貧血、

骨粗鬆症、

胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、

並びに

性病、例えば生殖器のイボ。

【0107】SNPを遺伝子型判定するために実施され得る多くの方法が存在している(例えば、Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches")。これらの技術は4つの以下の原理のうちの1つに基づいている: 対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、任意にデオキシヌクレオチドの存在下でのジデオキシヌクレオチドによるオリゴヌクレオチドの伸長、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのライゲーション又は対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの開裂。これらの技術のいずれか一つが、検出系、例えば直接的な又は偏光した蛍光の測定、あるいは質量分析と組み合わせられ得る。

【0108】遺伝子型判定は、特に偏光型蛍光スキャナーと一緒に、放射性ddNTP(異なるフルオロフォアによって標識された2つの異なるddNTP)及び非放射性ddNTP(2つの異なる非標識型ddNTP)を用いたミニ配列決定によって実施され得る。偏光型蛍光の読み込みによるミニ配列決定のプロトコール(FP-TDI技術又は蛍光偏光鋳型直接ダイターミネーター取り込み(FluorescencePolarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation))は当業者にとって周知である。

【0109】FP-TDIは、各個体のDNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅後に得られる産物で実施され得る。このPCR産物は、研究されたSNPを含むポリヌクレオチドの遺伝子領域を網羅するために選択される。PCRサーモサイクラーにおける最後の段階の後、続いて、フルオロフォア特異的励起及び放射フィルターを用いることによる標識された塩基の読み込みのために、偏光型蛍光スキャナー上にプレートが据えられる。標識された塩基の強度の値はグラフ上に記される。

【0110】PCR増幅に関して、本発明のSNPの場合

合、センス及びアンチセンスプライマーはそれぞれ、1又は複数のSNPを含む注目の領域を増幅するために、本発明のSNPの位置に従い、当業者によって容易に選択され得る。

【0111】例えば、PCR増幅のためのセンス及びアンチセンスヌクレオチドの最初の組み合わせは、  
センスプライマー：GCCTCTTATGTACCCACAAA  
アンチセンスプライマー：CACCAGTAAAGCAAAGGTCA  
であってもよい。

【0112】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1においてヌクレオチド3からヌクレオチド537に及び、535ヌクレオチドの長さを有するフラグメントの増幅を可能にする。

【0113】例えば、PCR増幅のためのセンス及びアンチセンスヌクレオチド配列の第2の組み合わせは、  
センスプライマー：CACCCATTTCAACCAAGTCTA  
アンチセンスプライマー：AGCTGGCATAATCAAT  
であってもよい。

【0114】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1においてヌクレオチド470～ヌクレオチド1124に及び、655ヌクレオチドの長さを有するフラグメントの増幅を可能にする。

【0115】個体群におけるSNPを含んで成る遺伝子によってコードされる各対立遺伝子の頻度(対立遺伝子頻度)の統計解析が続いて行われ、これはこの個体群を構成する多様な民族性を含む異なる亜集団におけるそれらの影響及びそれらの分布の重要性の決定を可能にする。

【0116】遺伝子型判定のデータは、研究された群において観察された異なる対立遺伝子の分布頻度を推定するために解析される。対立遺伝子頻度の計算は、ソフトウェア、例えばSAS-suite(商標)(SAS)又はSPPLUS(商標)(MathSoft)を用いて実施され得る。個体群における異なる民族性の集団に及び本発明のSNPの対立遺伝子分布の比較は、ソフトウェア、例えばARLEQUIN(商標)及びSAS-suite(商標)によって実施され得る。

【0117】遺伝子マーカーとしての本発明のSNP 遺伝子の機能配列(例えばプロモーター、スプライシング部位、コード領域)を修飾するSNPは病気の感受性又は耐性と直接関連すると思われるが、全てのSNP(機能的又は非機能的)がこれらの病気の状態に関与する1又は複数の遺伝子の同定にとって価値のあるマーカーを提供することが可能であり、そしてこの結果、これらの病気の状態と間接的に関連するであろう(Cargill et al. (1999). Nature Genetics 22 : 231-238 ; Riley et al. (2000). Pharmacogenomics 1 : 39-47 ; Roberts L. (2000). Science 287 : 1898-1899を参照のこと)。

【0118】この様に、本発明はまた、IFN-2遺

伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t、うちの少なくとも1つを含んで成るデータバンクに関する。

【0119】更に当然のことながら、前記SNPはヌクレオチド配列である配列番号1に従い番号が付けられている。

【0120】このデータバンクは、IFN-2遺伝子のポリヌクレオチド内の、以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つと、病気又は病気に対する耐性との間の、統計学的に関連している関係を決定するために、  
a) 個体群を遺伝子型判定し、  
b) 前記個体群内の前記病気又は病気に対する耐性の分布を決定し、  
c) 遺伝子型のデータと、前記病気又は病気に対する耐性とを比較し、そして  
d) 統計的に関連している関係についての前記比較を解析すること、  
によって解析され得る。

【0121】本発明はまた、病気又は病気に対する耐性のための診断/予後のキットを開発するための、IFN-2遺伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つの使用に関する。

【0122】本発明のSNP、例えば上述したものは、病気又は病気に対する耐性と直接又は間接的に関連することがある。

【0123】好ましくは、これらの病気は上文で言及した様に定義されるものであってもよい。

【0124】発現ベクター及び宿主細胞

本発明はまた、本発明に従う少なくとも1つのポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターに関する。

【0125】多くの発現系、例えば染色体、エピソーム、誘導型ウイルスが使用され得る。更に具体的には、使用される組換えベクターは細菌性プラスミド、トランスポゾン、酵母のエピソーム、挿入因子、酵母染色体因子、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パピローマウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、キツネポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルスから誘導されることもある。

【0126】これらの組換えベクターはまた、コスミド又はファージミド誘導体であってもよい。ヌクレオチド配列は、当業者にとって周知な方法、例えばMOLECULAR

CLONING, A LABORATORY MANUAL (上記) Sambrook et al. に記載のものによって、組換え発現ベクター内に挿入され得る。

【0127】前記組換えベクターは、ポリヌクレオチド発現の制御を調節するヌクレオチド配列並びに本発明のポリヌクレオチドの発現及び転写並びに本発明のポリペプチドの翻訳を可能にするヌクレオチド配列を含むことがあり、これらの配列は使用される宿主細胞に従い選択される。

【0128】従って、例えば適切な分泌シグナルが前記組換えベクターに組み込まれることがあり、その結果、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、小胞体の内腔に向かって、細胞膜周辺腔に向かって、膜上に、又は細胞外環境に向かって、方向づけられるであろう。

【0129】本発明はまた、本発明に従う組換えベクターを含んで成る宿主細胞に関する。

【0130】宿主細胞内への組換えベクターの導入は、当業者にとって周知な方法、例えばBASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 1986及びMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989 に記載のもの、例えばリン酸カルシウムによるトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン性脂質によるトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入又は感染、に従い実施され得る。

【0131】前記宿主細胞は、細菌細胞、例えばストレプトコッカス(Streptococci)、スタフィロコッカス(Staphylococci)、E. コリ(Coli)又はバチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)の細胞、真菌の細胞、例えば酵母細胞及びアスペルギルス(Aspergillus)、ストレプトマイセス(Streptomycetes)の細胞、昆虫細胞、例えばショウジョウバエS2及びスポドプテラ(Spodoptera) Sf9の細胞、動物細胞、例えばCHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293細胞及び処置すべき対象のヒト細胞であっても、又は植物細胞でもよい。

【0132】前記宿主細胞は、例えば後文で明らかとなる様に、本発明のポリペプチドを発現させるために、又は医薬組成物中の活性産物として使用され得る。

#### 【0133】ポリペプチド

本発明はまた、a) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24~188位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列であって、a) 及びb) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものと、少なくとも

80%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、更に好ましくは少なくとも95%の同一性、そしてより更に好ましくは少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成る単離されたポリペプチドに関する。

【0134】本発明のポリペプチドはまた、a) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24~188位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a) 及びb) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、を含んで成ることがある。

【0135】本発明のポリペプチドは、更に具体的にはa) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24~188位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a) 及びb) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものから成ることもある。

【0136】好ましくは、本発明に従うポリペプチドは、A6D及びM171Iから成る群から選択される単一のコードSNPを含む。

【0137】本発明はまた、その目的のために上述のポリペプチドの調製方法を有し、ここで、既に定義した宿主細胞が培養液中で培養され、そして前記ポリペプチドが当該培養液から単離される。

【0138】前記ポリペプチドは、当業者にとって周知な方法、例えばカオトロピック剤、例えば塩、特に硫酸アンモニウム、エタノール、アセトン又はトリクロロ酢酸による沈澱、酸抽出；イオン交換クロマトグラフィー；ホスホセルロースクロマトグラフィー；疎水性相互作用クロマトグラフィー；親和性クロマトグラフィー；ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー又は排除クロマトグラフィーに従い、宿主細胞の培養液から出発して精製され得る。

【0139】「培養液」とは、本発明のポリペプチドが単離され、又は精製される培地であると理解される。この培地は細胞外培地及び/又は細胞溶解物から構成され得る。当業者にとって周知な技術も、前記ポリペプチドの高次構造が単離又は精製の間に変化する場合に、後者のものが前記ポリペプチドの活性高次構造を生むことを可能にする。

#### 【0140】抗体

本発明はまた、免疫特異的抗体を得るための方法に関する。

【0141】「抗体」とは、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、一本鎖及び/又はヒト化抗体並びにFabフラグメント、例えばFab又は免疫グロブリン発現ライブラリー産物であると理解される。

【0142】免疫特異的抗体は、本発明に従うポリペ

チドによる動物の免疫化によって得ることができる。

【0143】本発明はまた、本発明に従うポリペプチド、例えば上文で定義したもののための免疫特異的抗体に関する。

【0144】本発明に従うポリペプチド、そのフラグメントの1つ、類似体、その変異体の1つ又はこのポリペプチドを発現している細胞も、免疫特異的抗体を産生するために使用され得る。

【0145】用語「免疫特異的」とは、抗体が、当業界で知られている他のポリペプチドよりも本発明のポリペプチドに対してより良い親和性を有することを意味する。

【0146】免疫特異的抗体は、本発明のポリペプチド、そのフラグメントの1つ、類似体又はエピトープフラグメント又はこのポリペプチドを発現している細胞を、哺乳類、好ましくはヒト以外に、当業者にとって周知な方法に従い投与することによって得ることができる。

【0147】モノクローナル抗体の調製に関して、抗体産生のための典型的な方法、例えばハイブリドーマ技術 (Kohler et al., Nature (1975) 256 : 495-497)、トリオーマ技術、ヒトのB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4 : 72) 及びE B Vハイブリドーマ技術 (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, 1985) が、細胞系から出発して使用され得る。

【0148】単鎖抗体の産生の技術、例えば米国特許第4,946,778号に記載のものも使用され得る。

【0149】トランスジェニック動物、例えばマウスも、ヒト化抗体を産生するのに使用され得る。

【0150】本発明のポリペプチドと相互作用する物質  
本発明はまた、その目的のために、本発明に従うポリペプチドを活性化し、又は阻害する物質の同定のための方法であって、

a) 少なくとも1つのコードSNPを含む、本発明に従うポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、

b) a) に従う組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、

c) b) に従う宿主細胞と試験され得る物質との接触、及び

d) 試験され得る物質によって生成する活性又は阻害作用の決定、

を含んで成る方法を有する。

【0151】本発明に従うポリペプチドはまた、それと相互作用する化合物をスクリーニングするために適用され得る。

【0152】これらの化合物は、本発明に従うポリペプチドの固有の活性を活性化する(アゴニスト)又は阻害する(アンタゴニスト)物質であってもよい。これらの

化合物はまた、本発明のポリペプチドのリガンド又は基質であってもよい。Coliganet al., Current Protocols in Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991) を参照のこと。

【0153】通常、その様な方法を実行するために、最初に本発明に従うポリペプチドを発現する適切な宿主細胞を生成することが望ましい。その様な細胞は、例えば哺乳類、酵母、昆虫、例えばショウジョウバエ又は細菌、例えばE. コリの細胞であってもよい。

【0154】これらの細胞又はこれらの細胞の膜抽出物が、続いて試験され得る化合物の存在下に据えられる。

【0155】本発明のポリペプチドとの、試験され得る化合物の結合能、並びに機能的応答の阻害又は活性化が続いて観察され得る。

【0156】上述の方法の段階d) は、直接又は間接的に標識される、試験され得る物質を用いることによって実行され得る。それはまた、標識又は非標識物質及び標識競合物質を用いることによる競合試験を含むことがある。

【0157】試験され得る化合物が、検出され得るシグナルに従い適切に選択された検出手段を用いることによって、本発明のポリペプチドを発現する細胞上で活性又は阻害シグナルを生じるか否かも決定され得る。

【0158】その様な活性又は阻害物質はポリヌクレオチドであってもよく、そしてある場合にはオリゴヌクレオチド又はポリペプチド、例えばタンパク質又は抗体であってもよい。

【0159】本発明はまた、本発明に従うポリペプチドによって活性化され又は阻害される物質の同定方法であって、

a) 少なくとも1つのコードSNPを含む、本発明に従うポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、

b) a) に従う組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、

c) 試験され得る物質の存在下に、b) に従う宿主細胞を据えること、

d) 試験され得る物質に対する、前記ポリペプチドによって生じる活性又は阻害作用の決定、

を含んで成る方法に関する。

【0160】本発明のポリペプチドによって活性化され、又は阻害される物質は、それぞれ、このポリペプチドの存在下での活性化又は阻害によって応答する物質である。本発明のポリペプチドによって直接又は間接的に活性化され又は阻害される物質は、例えば膜結合型又は核受容体、キナーゼ及び更に好ましくはチロシンキナーゼ、転写因子又はポリヌクレオチドから成ることもある。

【0161】病気の検出

本発明はまた、目的のために、対象者において、本発明

に記載のポリヌクレオチド及び/又は本発明に記載のポリペプチドの生物学的特性を解析するための方法であって、以下の、

a) 対象者のゲノムにおいて、本発明に従うポリヌクレオチドの存在又は非存在を決定し、

b) 対象者において、本発明に従うポリヌクレオチドの発現レベルを決定し、

c) 対象者において、本発明に従うポリペプチドの存在又は非存在を決定し、

d) 対象者において、本発明に従うポリペプチドの濃度 10

を決定し、

e) 対象者において、本発明に従うポリペプチドの機能性を決定すること、

のうちの少なくとも1つを含んで成る方法を有する。

【0162】これらの生物学的特性は、対象者において、又は対象者由来の試料において解析され得る。

【0163】これらの生物学的特性は、遺伝子診断を実施し、そして対象者が本発明に従うポリヌクレオチド及び/又は本発明に従うポリペプチドの存在と関連している病気、軽い病気又は障害の発生に対して影響を受けて 20

いるか、又は影響を受ける危険性があるか、又は反対に、それに対する部分的な耐性があるか否かを決定することを可能にし得る。

【0164】これらの病気は障害及び/又はヒトの病気、例えば：

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合 30

- 合カボジ肉腫、
- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、

- 創傷治癒、
- 化学療法と関連している疾患、
- 透析されている患者の貧血、
- 骨粗鬆症、
- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに

- 性病、例えば生殖器のイボ、であってもよい。

【0165】この方法はまた、対象者において、本発明に従うSNPによってコードされる変異対立遺伝子の存在と関連している病気又は病気に対する耐性の遺伝子診 50

断を可能にする。

【0166】好ましくは、段階a)において、既に定義した様な、少なくとも1つのコードSNPを含むポリヌクレオチドの存在又は不在が検出され得る。

【0167】ポリヌクレオチドの検出は、研究され得る対象者由来の生物学的試料、例えば細胞、血液、尿、唾液から出発して、あるいは研究され得る対象者の生検又は部検から出発して実施され得る。ゲノムDNAは、例えば直接的に又はPCR増幅後に使用され得る。RNA又はcDNAも同様に使用され得る。

【0168】この結果、本発明に従うポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、対象者のゲノムにおいて検出されるヌクレオチド配列と比較することが可能となる。

【0169】ヌクレオチド配列の比較は、配列決定によって、DNAハイブリダイゼーション法によって、変性剤を用いる、又は用いない、電気泳動ゲノム上でのDNAフラグメントの移動度の差異によって、あるいは融解温度の差異によって実施され得る。Myers et al., Science (1985) 230 : 1242 を参照のこと。ヌクレオチド配列の構造における正確な位置でのその様な修飾も、ヌクレアーゼ保護試験によって、例えばRNアーゼ及びS1ヌクレアーゼによって、又は更に化学開裂剤によって解明されることがある。Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85 : 4397-4401 を参照のこと。本発明のポリヌクレオチドフラグメントを含んで成るオリゴヌクレオチドプローブはまた、スクリーニングを行うのにも使用され得る。

【0170】当業者にとって周知の多くの方法が、本発明のポリヌクレオチドの発現を決定し、そしてこのポリヌクレオチドの遺伝的変異性を同定するために使用され得る (Chee et al., Science (1996), vol.274, pp610-613 を参照のこと。)

【0171】段階b)において、ポリヌクレオチドの発現レベルは、当業者にとって周知な方法に従い、このポリヌクレオチドによってコードされる(そしてポリペプチドをコードする)RNAのレベルを定量することによって、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンブロット、及び他のハイブリダイゼーション法によって、測定され得る。

【0172】段階c)及びd)において、対象者又は対象者由来の試料における、本発明に従うポリペプチドの存在又は不在及び濃度が、周知の方法、例えば免疫放射アッセイ、競合的結合試験、ウェスタンブロット及びELISA試験によって実施され得る。

【0173】段階d)に続いて、本発明に従うポリペプチドの決定された濃度は、対象者において通常見出される天然野生型タンパク質の濃度と比較され得る。

【0174】当業者は、上文の様に起こる病気、軽い病気又は障害に対する感受性又は、反対に耐性が現れる、しきい値の上限又は下限を、従来技術の刊行物又は常用

の試験若しくはアッセイ、例えば既に言及されているものの助けを借りて同定することができる。

【0175】段階e)において、本発明に従うポリペプチドの機能の決定は、当業者にとって周知な方法によって、例えば *in vitro* での試験、例えば上文で言及したものによって、又は前記ポリペプチドを発現する宿主細胞の使用によって実施され得る。

#### 【0176】薬物及び病気の処置

本発明のポリペプチドは非常に興味深い薬理学的特性を有している。特に、それらはヒトIFN-2受容体と結合し得る。これらの特性は、ヒトの身体の治療的処置のための、すなわち薬物又は治療組成物としての本発明のポリペプチドの使用に従う。

【0177】この様に、本発明はまた、活性物質の目的で本発明に従うポリペプチドを含む薬物に関する。

【0178】本発明はまた、異なるヒトの障害及び/又は病気、例えば：

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、
- 創傷治癒、
- 化学療法と関連している疾患、
- 透析されている患者の貧血、
- 骨粗鬆症、
- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに

性病、例えば生殖器のイボ、の予防又は処置を意図する薬物の製造のための、本発明に従うポリペプチドの使用に関する。

【0179】本発明に従うポリペプチドを得ることを可能にする化合物及びこのポリペプチドによって得られ、又はこれから同定される化合物のいくつかは、同様にヒトの身体の治療的処置のために、すなわち薬物として使用され得る。

【0180】このことが、本発明が更に活性物質の目的で、少なくとも1つの既に定義されているコードSNP、既に定義されている組換えベクター、既に定義されている宿主細胞、及び/又は既に定義されている抗体を

含む、本発明に従うポリヌクレオチドを含む薬物を目的とする理由である。

【0181】本発明はまた、異なるヒトの障害及び/又は病気、例えば：

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、並びに

性病、例えば生殖器のイボ、の予防又は処置を意図する薬物の製造のための、少なくとも1つの既に定義されているコードSNP、既に定義されている組換えベクター、既に定義されている宿主細胞、及び/又は既に定義されている抗体を含む、本発明に従うポリヌクレオチドの使用に関する。

【0182】活性物質として有用な、本発明のポリペプチド及び他の化合物の用量は、化合物の選択、治療の兆候、投与形態、製剤の性質、対象者の性質及び医師の判断に依存する。

【0183】それを活性物質として使用する場合、本発明に従うポリペプチドは、通常1~100µg/対象者のkgに及ぶ用量で投与される。

【0184】本発明はまた、活性物質として、少なくとも1つの上記化合物、例えば本発明に従うポリペプチド、少なくとも1つの既に定義されているSNPを含む本発明に従うポリヌクレオチド、既に定量されている組換えベクター、既に定義されている宿主細胞、及び/又は既に定義されている抗体、並びに医薬として許容される賦形剤を含む医薬組成物を目的として有する。

【0185】これらの医薬組成物において、前記活性物質は生理学的に有効な量で有利に存在する。

【0186】これらの医薬組成物は、例えば固体又は液体であってもよく、そしてヒトの薬物において現在使用されている医薬形態で、例えば単純な又はコートされた

錠剤、ゲルキャップ、顆粒、キャラメル、座剤並びに好ましくは注射用調製物及び注射用調製物のための粉末で存在していてもよい。これらの医薬の形態は有用な方法に従い調製され得る。

【0187】前記活性物質は、医薬組成物において通常適用される賦形剤、例えばタルク、アラビアゴム、ラクトース、デンプン、デキストロース、グリセロール、エタノール、ステアリン酸マグネシウム、カカオバター、水性又は非水性担体、動物又は植物起源の脂肪物質、パラフィン誘導体、グリコール、種々の湿潤剤、分散剤又は乳化剤、防腐剤に組み込まれることもある。

【0188】本発明に従う活性物質は、単独で、又は他の化合物、例えば治療化合物、例えば他のインターフェロン - 若しくは他のサイトカイン、例えばインターロイキンと組み合わせて適用され得る。

【0189】前記医薬組成物の異なる製剤は、投与の形態に従い適合される。

【0190】前記医薬組成物は、当業者にとって既知の異なる投与経路によって投与され得る。

【0191】本発明はまた、活性物質として少なくとも 1 つの上記化合物、例えば本発明に従うポリペプチド、本発明に従うポリヌクレオチドの全部又は一部、既に定義した組換えベクター、既に定義した宿主細胞、及び/又は既に定義した抗体、並びに医薬として許容される賦形剤を含む診断組成物を目的のために有する。

【0192】この診断組成物は、例えば適当な賦形剤、例えば診断組成物において一般に使用されているもの、例えば緩衝液及び防腐剤を含むことがある。

【0193】本発明はまた、

a) 治療として有効な量の本発明に従うポリペプチド、  
b) 本発明に従うポリヌクレオチド、及び/又は  
c) 既に定義されている、処置され得る対象者由来の宿主細胞の、

対象者における、本発明に従うポリペプチドの発現又は活性を増大せしめることを意図する薬物の調製のための使用を目的として有する。

【0194】この様に、本発明のポリペプチドの発現又は活性の増大を必要とする対象者を処置するために、複数の方法が可能である。

【0195】前記対象者に、治療として有効な量の本発明に従うポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤と一緒に投与することは可能である。

【0196】同様に、前記対象者に対する、本発明に従うポリヌクレオチドの投与によって、本発明のポリペプチドの内因性の産生を増大せしめることが可能である。例えば、そのポリヌクレオチドはレトロウイルス発現ベクター内に挿入され得る。その様なベクターは、本発明のポリペプチドをコードする RNA を含むレトロウイルスプラスミドベクターに感染した細胞から出発して、形質導入された細胞が注目の遺伝子を含む感染性ウイルス

粒子を産生する様な方法で単離され得る。GeneTherapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) を参照のこと。

【0197】本発明に従い、少なくとも 1 つのコード SNP、例えば既に定義されているものを含むポリヌクレオチドが好ましくは使用される。

【0198】更に、対象者に対して、本人に属する宿主細胞であって、既に記載した様に本発明のポリペプチドを発現する様にあらかじめ採取され、そして修飾された宿主細胞を投与することが可能である。

【0199】本発明はまた、

a) 治療として有効な量の、既に定義されている免疫特異的抗体、及び/又は

b) 本発明に従うポリヌクレオチドの発現の阻害を可能にするポリヌクレオチドの、対象者における、本発明に従うポリペプチドの発現又は活性を低下せしめることを意図する薬物の調製のための使用に関する。

【0200】この様に、前記対象者に対して、治療として有効な量の阻害剤及び/又は抗体、例えば既に定義されているものを、好ましくは医薬として許容される賦形剤と組み合わせて投与することが可能である。

【0201】また、前記対象者に対して、本発明のポリヌクレオチドの発現の阻害を可能にする、本発明に従う相補的なポリヌクレオチドの投与によって、本発明のポリペプチドの内因性の産生を減少させることも可能である。

【0202】好ましくは、少なくとも 1 つのコード SNP、例えば既に定義されているものを含む相補ポリヌクレオチドが使用され得る。

【0203】本発明はまた、以下の SNP : 96 - 100 del ( a a t t t ) , t 110 c , 139 - 144 del ( a c t t t a ) , t 338 a , t 363 c , c 427 t , c 527 a , g 1023 a , c 1047 t のうちの 1 つを含んで成るヌクレオチド配列、配列番号 1 と、少なくとも 95 % の同一性 ( 好ましくは 97 % の同一性、更に好ましくは 99 % の同一性及び特に 100 % の同一性 ) を有する、患者のゲノムにおけるヌクレオチド配列の存在と関連している IFN - 2 変異体によって生じる障害又は病気を有する前記患者の予防又は処置のための薬物の調製のための IFN - 2 タンパク質の使用に関する。

【0204】好ましくは、前記薬物は、

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場

合カボジ肉腫、

- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎並びに HIV / エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、
- 創傷治癒、
- 化学療法と関連している疾患、
- 透析されている患者の貧血、
- 骨粗鬆症、
- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、

並びに

- 性病、例えば生殖器のイボ、
- から成る群から選択される病気の中の 1 つの予防又は処置に使用される。

【0205】 SNP M171I を含んで成る IFN - 2 ポリペプチドの模倣化合物

本発明はまた、M171I IFN - 2 遺伝子産物のものと比較して実質的に類似又はそれ以下の生物活性を有する新規化合物に関する。

【0206】 M171I 変異型 IFN - 2 遺伝子産物は、

- a) アミノ酸配列である配列番号 2、又は
  - b) アミノ酸配列である配列番号 2 の 24 ~ 188 位に含まれるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列であって、
- a) 及び b) における前記アミノ酸配列が M171I SNP を含んで成るもの、
- のポリペプチドに対応する。

【0207】前記生物活性は、下文の実験の項目に記載のルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて、Daudi Burkitt 細胞系上での細胞性抗増殖活性の測定又は MCF7 細胞上でのシグナル伝達アッセイによって評価され得る。

【0208】実験の項目で述べる様に、M171I 変異型 IFN - 2 は、Daudi Burkitt 細胞系上上で、天然野生型 IFN - 2 のものより低い細胞抗増殖活性を有する。

【0209】実験の項目で述べる様に、M171I 変異型 IFN - 2 の存在下で測定される乳ガン細胞系 MCF - 7 におけるシグナル伝達の活性化は、天然野生型 IFN - 2 で測定されるものより低い。

【0210】本発明の新規化合物、例えば既に定義されているものは、M171I 変異型 IFN - 2 のものと実質的に類似の、すなわち天然野生型 IFN - 2 のものより低い生物活性を有することがある。

【0211】前記化合物はまた、M171I 変異型 IFN - 2 のものより更に低い生物活性を有することもある。

【0212】前記化合物は、生化学化合物、例えばポリペプチド又はペプチド、あるいは有機化学化合物、例えば合成ペプチド模倣物であってもよい。

【0213】本発明はまた、Daudi Burkitt 細胞系上で、天然野生型 IFN - 2 のものより少なくとも 15 倍低い細胞抗増殖活性を有する新規化合物を提供する。

【0214】本発明はまた、MCF7 細胞上で、天然野生型 IFN - 2 のものより少なくとも 10 倍低いシグナル伝達能を有する新規化合物を提供する。

【0215】本発明はまた、上文で定義した様な化合物の同定のための、M171I SNP を含む本発明のポリペプチドの使用に関する。

【0216】本発明は、以下の段階：

a) 生物活性、例えば Daudi Burkitt 細胞系上での細胞の抗増殖活性又はシグナル伝達能を決定し、

b) 試験され得る化合物の、段階 a) で決定した活性を、M171I 変異型 IFN - 2 の遺伝子産物の活性と比較し、そして

c) 段階 b) で実施した比較に基づき、試験され得る化合物が、M171I 変異型 IFN - 2 の遺伝子産物のものと比較して実質的に類似又はそれより低い活性を有するか否かを決定すること、

を含んで成る、本発明の化合物の同定方法に関する。

【0217】好ましくは、試験され得る化合物は、合成ペプチドコンビナトリアルライブラリー、高処理量スクリーニングから既に同定され、又はコンピューターを使ったドラッグデザインによって設計された結果、M171I 変異型 IFN - 2 遺伝子産物のものと同一の三次元構造及び / 又は化学作用を有することがある。化合物を同定し、そして設計するための方法は、当業者に周知である。

【0218】これらの方法を引用している刊行物は、例えば：

- Silverman R.B. (1992). "Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action". Academic Press, 1st edition (January 15, 1992).
- Anderson S and Chiplotin J. (2002). "Structural genomics ; shaping the future of drug design? Drug Discov. Today. 7 (2) : 105-107.
- Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH. (2002). "The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery". Drug Discov. Today. 7 (2) : 109-116.
- Burbidge R, Trotter M, Buxton B, Holden S. (2001). "Drug design by machine learning : support vect

or machines for pharmaceutical data analysis". Comput. Chem. 26 (1) : 5-14.

- Kauvar L.M. (1996). "Peptide mimetic drugs : a comment on progress and prospects" 14 (6) : 709、  
であってもよい。

【0219】本発明の化合物は、

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、

- 心臓血管疾患、

- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、

- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、

- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、

- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、

- 創傷治療、

- 化学療法と関連している疾患、

- 透析されている患者の貧血、

- 骨粗鬆症、

- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに

- 性病、例えば生殖器のイボ、  
から成る群から選択される病気の一つの予防又は処置を意図する薬物の調製のために使用され得る。

【0220】実験の項目

例1 : g1023aのSNPを含むヌクレオチド配列のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質及び参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のモデリング

最初の段階において、IFN-2の三次元構造は、ソフトウェアModeler (MSI, San Diego, CA)を用いてPDBデータベース(コード1ITF)において利用可能な構造を有するヒトIFN-2のものから出発して構築した。

【0221】続いて成熟したポリペプチドフラグメントが、突然変異M148Iを再生成する様な方法で修飾される。

【0222】1000回の分子最小化段階が、プログラムAMBER及びDISCOVER (MSI : Molecular Simulations Inc. )を用いることによってこの変異型フラグメント上で行われた。

【0223】次に、2回の分子力学計算の実行が同じプログラム及び同じ力場で行われた。

【0224】それぞれの場合において、50,000回

の段階が300°Kで計算され、300回の平衡段階によって終了した。

【0225】このモデリングの結果を図1及び2に表す。

【0226】例2 : c527a SNPを含むヌクレオチド配列のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質及び参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のアドレッシングの予測

c527aの多型性は未成熟IFN-2タンパク質のレベルでA6Dの多型性に関与する。この位置は、未成熟タンパク質の最初の23アミノ酸を含んで成るシグナルペプチド上に位置している。当該シグナルペプチドは、タンパク質のアドレッシング及び成熟タンパク質が発現する細胞内又は細胞外区画を制御する。

【0227】PSORTは、未成熟タンパク質のアミノ酸配列を解析し、そして成熟タンパク質が局在するであろう区画を予測するパブリックドメインソフトウェアである(Nakai K and Kanehisa M (1992). A Knowledge base for predicting protein localization sites in eu karyotic cells. Genomics 14, 897-911)。

【0228】PSORTは、A6Dの多型が細胞レベルでのIFN-2の局在を変化させることを予測している。事実、それは野生型成熟IFN-2タンパク質が分泌され、細胞外に局在化され、一方、D6変異型IFN-2は核及び/又はミトコンドリア画分内に存在し得ることを予測している。

【0229】IFN-2のA6D変異体が、野生型タンパク質と比較してその構造及び機能において恐らく影響を受けないとしても、その活性は通常見出されるほどではないであろう。

【0230】例3 : ポリヌクレオチド配列である配列番号1における欠失、139-144del (acctta)によって生じるIFN-2発現の変化の予測

推定される結合部位に対する139-144del (acctta)の効果は、Match(Transfer)の実施後に評価された。この欠失は全てのインターフェロンに共通の制御領域内に位置していないが、それは転写因子のための3つの推定される結合部位を削除する :

- Msx-1についての推定される結合部位は、野生型の参照配列番号である配列番号1上のヌクレオチド134~142を包含する。この結合部位に対するこの欠失の効果は、この転写因子がよく理解されておらず、そしてその機能が手足の形成に関連していることが提案されているが、はっきりと同定されていないため、相応に推定され得る(Hwang et al. (1998). Am. J. Med. Genet. 75 :419-423)。

- Oct-1についての推定される結合部位は、野生型参照配列番号である、配列番号1上のヌクレオチド141~163を包含する。この結合部位は転写開始部位

の約400ヌクレオチド上流に位置するが、その欠失は、この部位を認識する転写因子がT及びBリンパ球における転写開始の異なる機構に關与するので、重要な効果を有すると思われる(Ullman et al. (1991). Science. 254 : 558-562 ; Kemler et al. (1989). EMBO J. 8 : 2001-2008 ; Kamps et al. (1990). Mol Cell Biol. 10 : 5464-5472)。

- Hox a 3 についての推定される結合部位は、野生型の参照配列番号である、配列番号1上のヌクレオチド143~151を包含する。Hox a 3 は、胸腺の形成を促進する、胎児の胸腺上皮細胞の制御に關与する転写因子である(Suet al. (2001). Dev. Biol. 236 : 316-329)。

【0231】この結果、139-144 del (acttta) SNPはIFN - 2の発現の正常な制御に影響を及ぼし得る。

【0232】例4：個体群におけるSNP t110c, t338a, t363c, c427t, c527a 及び g1023a の遺伝子型判定

SNPの遺伝子型判定は、生成物が偏光した蛍光を読み込むことによって検出される、ミニ配列決定の原理に基づいている。当該技術は蛍光ミニ配列決定(FP-TDI技術又はFluorescence Polarization Template-directed Dye-Terminator Incorporation)から成る。

【0233】ミニ配列決定は、前記群の各個体のゲノムDNAからPCRによって増幅された生成物で行われる。PCR生成物は、それが遺伝子型判定され得るSNPを含む遺伝子領域を覆う様な方法で選択される。使用されなかったPCRプライマー及び組み込まれなかったdNTPの排除後、ミニ配列決定は行われる。

【0234】ミニ配列決定は、ポリメラーゼ酵素及び蛍光標識したジデオキシヌクレオチドを用いることによって、SNPの部位のすぐ上流に配置されたポリヌクレオチドプライマーを伸長することから成る。この伸長過程から生じた生成物は、偏光した蛍光を読み込むことによって直接解析される。

【0235】全てのこれらの段階、及び読み込みが同一のPCRプレートにおいて行われる。

【0236】この様に、遺伝子型判定は5つの段階：

- 1) PCRによる増幅
- 2) 酵素消化によるPCR生成物の精製
- 3) オリゴヌクレオチドプライマーの伸長
- 4) 偏光した蛍光の読み込み
- 5) 読み込みの解釈

を必要とする。

【0237】遺伝子型判定の段階1及び2は、一方ではSNP t110c, t338a, t363c及びc427tのそれぞれ、そして他方ではSNP c527a、及びg1023aのそれぞれについて、同一の条件で行われる。

【0238】段階3, 4及び5は、これらの多型のそれぞれ1つに特異的である。

【0239】1) IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列のPCR増幅は、民族的に異なる起源の268人の個体に由来するゲノムDNAから出発して行われる。

【0240】これらのゲノムDNAは、米国のCoriell Instituteによって提供された。

【0241】268人の個体は以下の様に分布される：

【表1】

20			
系統群	特異的民族群	合計	%
アフリカ系アメリカ人	アフリカ系アメリカ人	50	100.0
	小計	50	18.7
アメリカインディアン	南アメリカアンデス	10	66.7
	南西アメリカインディアン	5	33.3
	小計	15	5.6
カリブ人	カリブ人	10	100.0
	小計	10	3.7
ヨーロッパ系コーカソイド	北アメリカカフカス人	79	79.8
	イベリア人	10	10.1
	イタリア人	10	10.1
	小計	99	36.9
メキシコ人	メキシコ人	10	100.0
	小計	10	3.7
北東アジア人	中国人	10	50.0
	日本人	10	50.0
	小計	20	7.5
非ヨーロッパ系コーカソイド	ギリシア人	8	21.6
	インドーパキスタン人	9	24.3
	中東の人	20	54.1
	小計	37	13.8
東南アジア人	太平洋諸島の人	7	41.2
	南アジア人	10	58.8
	小計	17	6.3
南アメリカ人	南アメリカ人	10	100.0
	小計	10	3.7
合計		268	100

【0242】これらの個体のそれぞれ1つに由来するゲノムDNAが試料を構成する。

【0243】SNP t110c, t338a, t363c及びc427tの場合、PCR増幅は、以下のプライマーから出発して行われる。

センスプライマー：GCCTCTATGTACCCACAAA

アンチセンスプライマー：CACCAGTAAAGCAAAGGTCA

【0244】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1の、ヌクレオチド3～ヌクレオチド537の、535ヌクレオチドの長さのフラグメントの増幅を可能にする。

【0245】SNP c527a、及びg1023aの場合、PCR増幅は、以下のプライマーから出発して行われる。

センスプライマー：CACCCATTTCAACCAGTCTA

アンチセンスプライマー：AGCTGGCATACGAATCAAT

【0246】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1の、ヌクレオチド470～ヌクレオチド1124の、655ヌクレオチドの長さのフラグメントの増幅を可能にする。

【0247】それぞれのSNPの場合、PCR生成物はミニ配列決定のための鋳型を務めるであろう。

【0248】当該PCR反応の合計の反応液量は各試料当たり5μlである。

【0249】この反応液量は、以下の表に示す試薬から構成される：

【表2】

業者	参考	反応剤	初濃度	管当たりの体積 ( $\mu$ l)	終濃度
Life Technology	Taqによって配達	緩衝液(X)	10	0.5	1
Life Technology	Taqによって配達	MgSO <sub>4</sub> (mM)	50	0.2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0.1	0.2
	請求次第	センスプライマー ( $\mu$ M)	10	0.1	0.2
	請求次第	アンチセンスプライマー ( $\mu$ M)	10	0.1	0.2
Life Technology	11304-029	Taq白金	5U/ $\mu$ l	0.02	0.1U/反応
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	1.98	
		DNA (試料)	2.5ng/ $\mu$ l	2	5ng/反応
		合計量		5 $\mu$ l	

【0250】これらの試薬は、AB Geneによって供給される、384個のウェルを有するブラックPCRプレート(参照:TF-0384-K)に配分される。当該プレートはシーリングされ、遠心され、続いて384ウェルプレート用のサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)内に据えられ、そして以下のインキュベーションを受ける:PCRサイクル:94で1分、これに3段階(94で15秒、56で30秒、68で1分)から成る36サイクルが続く。

【0251】2)PCR増幅生成物は、続いて2つの酵素:シュリンブアルカリホスファターゼ(SAP)及び\*

\*エキソヌクレアーゼI(ExoI)を用いて精製される。これらの最初の酵素は、PCR増幅の間に組み込まれなかったdNTPの脱リン酸化を可能にし、一方、2番目のものは一本鎖DNA残基、特にPCRの間に使用されなかったプライマーを除去する。

【0252】この消化は、PCRプレートの各ウェルにおける、試料当たり5 $\mu$ lの反応混合物の添加によって行われる。

【0253】この反応混合物は以下の試薬から構成される:

【表3】

業者	参考	反応剤	初濃度	管当たりの体積 ( $\mu$ l)	終濃度
AP Biotech	E70092X	SAP	1U/ $\mu$ l	0.5	0.5/反応
AP Biotech	070073Z	ExoI	10U/ $\mu$ l	0.1	1/反応
AP Biotech	SAPによって供給される	緩衝液SAP (X)	10	0.5	1
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	3.9	
		PCR 生成物		5 $\mu$ l	
		合計量		10 $\mu$ l	

【0254】充填したら、プレートをシーリングし、遠心し、続いて384ウェルプレート用のサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)内に据え、そして以下のインキュベーションを受ける:SAP-EXO消化:37で45分、80で15分。

【0255】続いて、伸長又はミニ配列決定段階が、調製した試料当たり5 $\mu$ lの反応混合物の添加によって消化されたPCR生成物で行われる。

【0256】ミニ配列決定3)及び読み込み段階4)及び読み込みの解釈5)は、それぞれのSNP t110

c, t338a, t363c, c427t, c527a、及びg1023aに特異的である。

【0257】全てのこれらの段階は、これらの多型のうちのそれぞれ1つに使用される具体的な条件をまとめて後文に記載する。

【0258】3) ミニ配列決定

遺伝子型判定に必要な2つのミニ配列決定プライマーの配列は、本発明に従うSNPの部位の上流に位置するヌクレオチドの配列に対応する方法で判定した。SNPを\*

\*含むPCR生成物が二本鎖DNA生成物であるので、遺伝子型判定はセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかで行われ得る。選択したプライマーはLifeTechnologies Inc.によって製造される。

【0259】次の表は、各SNPについての、試験したミニ配列決定プライマーの配列及び遺伝子型判定のために保持される最適条件を示す。

【表4】

SNP	試験したプライマー	遺伝子型判定のために保持される最適条件
t110c	センス <sup>o</sup> プライマー: taatttaatttttaattgtt アンチセンス <sup>o</sup> プライマー: tctttttgctttctttatac	アンチセンス <sup>o</sup> プライマー+ ddATP-R110+ddGTP-Tamra
t338a	センス <sup>o</sup> プライマー: ctgaaaacccatgtaaagag アンチセンス <sup>o</sup> プライマー: tctttttgctttctttatac	センス <sup>o</sup> プライマー+ dTTP-R110+ddATP-Tamra
t363c	センス <sup>o</sup> プライマー: aaagaaagcaaaaagagaag アンチセンス <sup>o</sup> プライマー: atgccctgtgttactttct	センス <sup>o</sup> プライマー+ ddTTP-R110+ddCTP-Tamra
c427t	センス <sup>o</sup> プライマー: tccctatttaaggctaggca アンチセンス <sup>o</sup> プライマー: ttctctgaagaccttgcttt	センス <sup>o</sup> プライマー+ ddTTP-R110+ddCTP-Tamra
c527a	センス <sup>o</sup> プライマー: tacaatggccttgacctttg アンチセンス <sup>o</sup> プライマー: ccaggaggccaccagtaaa	アンチセンス <sup>o</sup> プライマー+ ddGTP-R110+ddTTP-Tamra
g1023a	センス <sup>o</sup> プライマー: gttgtcagagcagaaatcat アンチセンス <sup>o</sup> プライマー: gttgacaaagaaaagatct	センス <sup>o</sup> プライマー+ ddATP-R110+ddGTP-Tamra

【0260】SNPのミニ配列決定は、最初に16個の試料に及んで確認され、続いて268人の個体及び10人のコントロールから構成される個体群の集合に及んで遺伝子型判定された。

【0261】次に、伸長又はミニ配列決定段階が次の表に示す様に行われる。

【表5】

業者	参考	反応剤	初濃度	管当たり の体積 ( $\mu$ l)	終濃度
自己調製		伸長緩衝液 <sup>1</sup> (X)	5	1	1
Life Technologi es	請求次第	Miniseq Primer ( $\mu$ M) A又はB	10	0.5	1
AP Biotech	27-2051 (61, 71, 81)-01	ddNTPs <sup>2</sup> ( $\mu$ M) 2つは標識 されない	それぞれ 2.5	0.25	それぞれ 0.125
NEN	NeI 472/5 及び NeI 492/5	ddNTPs <sup>2</sup> ( $\mu$ M) 2つがTamra 及びR110で 標識される	それぞれ 2.5	0.25	それぞれ 0.125
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequen ase	3.2U/ $\mu$ l	0.125	0.4U/反応
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	3.125	
		消化したPCR 生成物		10	
		合計量		15	

<sup>1</sup> 5×伸長緩衝液は、250mM Tris-HCl pH 9, 250mM KCl, 25mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> 及び40%グリセロールから構成される。

<sup>2</sup> ddNTP: ddNTPに関して、4塩基の混合物が研究される多型に従い実施される。SNPを構成する注目の2塩基(野生型ヌクレオチド/変異型ヌクレオチド)のみが、例えばTamra又はR110のいずれかで標識される。

<sup>3</sup> SNP c527aの場合、ddNTPの混合物は:

- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddATP、
- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddCTP、
- 2.5 $\mu$ MのddTTP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddTTP及び0.625 $\mu$ MのTamra標識型ddTTP)、
- 2.5 $\mu$ MのddGTP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddGTP及び0.625 $\mu$ MのR110標識ddGTP)、

SNP g1023aの場合、ddNTPの混合物は:

- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddCTP、
- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddTTP、
- 2.5 $\mu$ MのddGTP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddGTP及び0.625 $\mu$ MのTamra標識型ddGTP)、
- 2.5 $\mu$ MのddATP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddATP及び0.625 $\mu$ MのR110標識型ddATP)、

から構成される。

【0262】充填したら、プレートはシーリングされ、遠心され、続いて384ウェルプレート用のサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)に据えられ、そして次のインキュベーションを受ける:伸長サイクル:93で1分、これに2段階(93で10秒、55で30秒)から構成される35サイクルを続ける。

【0263】サーモサイクラーにおける最後の段階の後、LJL Biosystems Inc. のAralyt(商標)型の、偏光型蛍光リーダー上にプレートを直接据える。プレートは、2つの方法を用いるCriterion Host(商標)のソフトウェアを使用して読み込む。最初のもは、このフルオロフォアに特異的な発光及び励起フィルターを用いることによって、Tamra標識型塩基の読み込みを可能にし(発光550~10nm、励起580~10nm)、そして2番目のものは、このフルオロフォアに特異的な発光及び励起フィルターを用いることによって、R110標識型塩基の読み込みを可能にする(発光490~10nm、励起520~10nm)。両者の場合において、二色性二重ミラー(dichroic double mirror)(R110/Tamra)が使用され、そして他の読み込みパラメーターは: Zの高さ:1.5mm  
アテニューエーター:アウト  
インテグレーションタイム:100,000マイクロ秒

生データユニット：カウント/秒  
 スイッチ偏光：ウェルごと  
 プレート設定時間：0ミリ秒  
 PMT設定：Smart Read (+)、感度2  
 動的偏光子：発光  
 静的偏光子：S  
 である。

【0264】ファイルの結果は、この様にTamraフィルターの場合のmP（ミリ偏光）の計算値及びR110フィルターの場合のものを含めて得られる。これらのmP値は、以下の式に従い、平行な面（//）及び垂直な面（⊥）に対して得られる強度から出発して計算される：

$$MP = 1000 (// - g \perp) / (// + g \perp)$$

【0265】この計算において、値  $g$  は係数  $g$  によって加重される。それは実験的にあらかじめ決定されなければならない機械的な係数である。

【0266】4) 及び5) 読み込みの解釈及び遺伝子型の決定

mP値は、Microsoft Inc.のExcel、及び/又はLJL Biosystems Inc.によって開発されたAllele Caller（商標）を用いてグラフ上に記された。

【0267】横軸上にはTamra標識型塩基のmP値を示し、縦軸上にはR110標識型塩基のmP値を示す。強力なmP値は、このフルオロフォアで標識した塩基が組み込まれたことを示し、そして反対に弱いmP値は、この塩基の不在を明らかにしている。

【0268】異なる遺伝子型を有するヌクレオチド配列の、最大3つの同種の群が得られる。

【0269】Allele Caller（商標）のソフトウェアの使用は、一度異なる群の同定が行われると、表の書式において各個体について定義されている遺伝子型の直接的な抽出を可能にする。

【0270】SNP t110c, t338a, t363c, c427t, c527a、及びg1023aに関するミニ配列決定の結果

遺伝子型判定の過程の完了後、本明細書で研究したSN

Pについての、個体群のうちの個体の遺伝子型の決定は、上述したグラフを用いて行われる。

【0271】SNP t110cの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体TT、又はヘテロ接合体TC、又はホモ接合体CCのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型CCは個体群において検出されていない。

【0272】SNP t338aの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体においてホモ接合体TT、又はヘテロ接合体TA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型AAは個体群において検出されていない。

【0273】SNP t363cの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体TT、又はヘテロ接合体TC、又はホモ接合体CCのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型CCは個体群において検出されていない。

【0274】SNP c427tの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体CC、又はヘテロ接合体CT、又はホモ接合体TTのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型TTは個体群において検出されていない。

【0275】SNP c527aの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体においてホモ接合体CC、又はヘテロ接合体CA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型AAは個体群において検出されていない。

【0276】SNP g1023aの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体GG、又はヘテロ接合体GA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型AAは個体群において検出されていない。

【0277】個体群において決定された遺伝子型の分布及び研究した6個のSNPに関する異なる対立遺伝子頻度の計算の結果を次の表に提示する：

【表6】

系統群	合計	t110c								
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC	%	合計
アフリカ系アメリカ人	50	8.0	(2.7, 13.3)	42	84.0	8	16.0			50
アメリカン・インディアン	15			15	100					15
カリブ人	10			10	100					10
ヨーロッパ系コカイト	99	1.0	(0, 2.4)	97	98.0	2	2.0			99
メキシコ人	10			10	100					10
非ヨーロッパ系コカイト	37			37	100					37
北東アジア人	20			20	100					20
南アメリカ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0			10
東南アジア人	17			17	100					17
合計	268	2.1	(0.9, 3.3)	257	95.9	11	4.1			268

系統群	合計	t338a								
		f	(95% CI)	TT	%	TA	%	AA	%	合計
アフリカ系アメリカ人	50	17.0	(9.4, 24.6)	31	66.0	16	34.0			47
アメリカン・インディアン	15			15	100					15
カリブ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0			10
ヨーロッパ系コカイト	99	0.5	(0, 1.5)	98	99.0	1	1.0			99
メキシコ人	10			10	100					10
非ヨーロッパ系コカイト	37	1.4	(0, 4.0)	36	97.3	1	2.7			37
北東アジア人	20			20	100					20
南アメリカ人	10			10	100					10
東南アジア人	17			17	100					17
合計	268	3.6	(2.0, 5.2)	246	92.8	19	7.2			265

系統群	合計	t363c								
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC	%	合計
アフリカ系アメリカ人	50			48	100					48
アメリカン・インディアン	15			15	100					15
カリブ人	10			10	100					10
ヨーロッパ系コカイト	99	0.5	(0, 1.5)	97	99.0	1	1.0			98
メキシコ人	10			10	100					10
非ヨーロッパ系コカイト	37			36	100					36
北東アジア人	20			20	100					20
南アメリカ人	10			10	100					10
東南アジア人	17			17	100					17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	263	99.6	1	0.4			264

【表7】

50

系統群	合計	c427t							合計
		f	(95% CI)	CC	%	CT	%	TT	
アフリカ系アメリカ人	50			50	100				50
アメリカン・インディアン	15			15	100				15
カリブ人	10			10	100				10
ヨーロッパ系コーカソイド	99			99	100				99
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系コーカソイド	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0		10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	267	99.6	1	0.4		268

系統群	合計	c527a (A6D)							合計
		f	(95% CI)	CC	%	CA	%	AA	
アフリカ系アメリカ人	50			50	100				50
アメリカン・インディアン	15			15	100				15
カリブ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0		10
ヨーロッパ系コーカソイド	99			95	100				95
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系コーカソイド	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	263	99.6	1	0.4		264

系統群	合計	g1023a (M1711)							合計
		f	(95% CI)	GG	%	GA	%	AA	
アフリカ系アメリカ人	50			50	100				50
アメリカン・インディアン	15			14	100				14
カリブ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0		10
ヨーロッパ系コーカソイド	99			97	100				97
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系コーカソイド	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	264	99.6	1	0.4		265

【0278】上記の表において、

- Nは個体数を表し、
- %は特異的な亜集団における個体のパーセンテージを表し、
- 対立遺伝子頻度は、特異的な亜集団における変異した対立遺伝子のパーセンテージを表し、
- 95%のICは、信頼性の最小値と最大値の間隔が95%であることを表す。

【0279】例えば、アンチセンスにおいて遺伝子型判定されたc527aのSNPの場合、アンチセンスで読み込まれたgは、センスで読み込まれた対立遺伝子c、及び未成熟IFN-2タンパク質のアミノ酸配列の6位のアラニンの存在に対応し、そしてその結果、アンチセンスで読み込まれた対立遺伝子tは、対応するタンパク質の配列において、この位置のアスパラギン酸に対応する、センスで読み込まれた対立遺伝子aに対応するこ

とを明確にしておくことは必要である。

【0280】系統群、及びSNPによるこれらの結果を調べることによって、次のことが観察される：

- SNP t110cの場合、11人のヘテロ接合体の個体(TC)が、個体群において、系統群アフリカ系アメリカ人、ヨーロッパ系コーカソイド、及び南アメリカ人から生じている。
- SNP t338aの場合、19人のヘテロ接合体の個体(TA)が見られ、彼等は個体群において系統群アフリカ系アメリカ人、カリブ人、ヨーロッパ系コーカソイド、非ヨーロッパ系コーカソイドに由来している。
- SNP t363cの場合、唯一のヘテロ接合体の個体(TC)が、個体群において系統群ヨーロッパ系コーカソイド人から生じている。
- SNP c427tの場合、唯一のヘテロ接合体の個体(CT)が、個体群において系統群南アメリカ人か

ら生じている。

- SNP c 5 2 7 a の場合、唯一のヘテロ接合体の個体 ( C A ) が、個体群において系統群カリブ人から生じている。

- SNP g 1 0 2 3 a の場合、唯一のヘテロ接合体の個体 ( G A ) が、個体群において系統群カリブ人から生じている。

【0281】例5：天然野生型 I F N - 2 のものと比較される、変異型 M 1 4 8 I I F N - 2 の生物学的機能の研究

a) 原核生物の発現ベクター p T r c / H i s - t o p o における天然野生型 I F N - 2 及び変異型 ( M 1 4 8 I ) I F N - 2 のクローニング

天然野生型及び変異型 I F N - 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列は P C R によって増幅される。

【0282】その様な増幅を可能にする P C R プライマーは：

センスプライマー：CACCCATTTCAACCCAGTCTA

アンチセンスプライマー：AGCTGGC ATACGAATCAAT

である。

【0283】当該 P C R 生成物は、T O P O ( 商標 ) - クローニング ( Invitrogen Corp. ) によって、I P T G ( イソ - プロピル - チオ - ガラクトシド ) により誘導可能な T r c ハイブリッドプロモーターの制御下にある原核生物発現ベクター p T r c / H i s - T o p o 内に挿入される。

【0284】このベクターは、ミニ - シストロンユニットの存在に起因する、細菌における真核生物タンパク質の異種発現を可能にする。

【0285】野生型タンパク質及び変異型タンパク質は、6 ヒスチジン末端から構成される N 末端伸長及び特異的抗体のためのエピトープを有する融合タンパク質の形態で生成される。

【0286】エンテロキナーゼエンドプロテアーゼを用いることによって、この追加の領域を開裂することが可能である。

【0287】組換えタンパク質をコードするベクターの領域のヌクレオチド配列を調べた後、E . コリの菌株、T o p 1 0 ( Invitrogen ) がこれらの組換え発現ベクターで形質転換される。

【0288】b) 天然野生型 I F N - 2 及び変異型 M 1 4 8 I 変異型ポリヒスチジン I F N - 2 の E . コリにおける異種発現及び精製

アメアット、野生型 I F N - 2 をコードするクローン又は M 1 4 8 I I F N - 2 をコードするものを含む、100 mL の L B A 培地 ( L u r i a B e r t o n i + 100 µ g / mL アンピシリン ) の 2 つの飽和プレ培養が、200 回転 / 分 ( rpm ) の振盪で、30 で 24 時間行われた。24 時間の増殖の後、培養物は、900 mL の L B A 培地 ( あらかじめ 37 で一晩インキュベー

トされたもの) で 1 / 10 にして接種するのに使用された。

【0289】2 番目の培養の組み合わせが、600 nm の波長で測定される 0 . 8 の光学密度に相当する細胞密度に達した場合、続いてポリヒスチジンタンパク質の発現が 1 mM の終濃度で I P T G を添加することによって誘導され、そして培養が、200 rpm の振盪で、30 で 5 時間維持される。

【0290】4 で 30 分の、4000 × g での遠心後に得られた細菌のペレットは、25 mL の緩衝液 A ( T r i s 50 mM , pH 8 , N a C l 50 mM , イミダゾール 10 mM , P M S F 0 . 1 mM pH 8 ) 中で再懸濁される。

【0291】0 . 5 mg / mL のリソザイム及び 20 ユニットの DNアーゼ I の存在下での、氷冷下での 30 分のブレインキュベーションは、試料の温度を調節しながらの 3 つの段階で行われる超音波処理 ( 10 秒間の停止を含む、10 秒間の衝撃当たり 240 ワット供給される 1 分間の段階 ) の前に行う。次に、細胞懸濁液を、4 で 30 0 分の、15 , 000 × g での遠心によって清澄にする。

【0292】次に、遠心の上清を 0 . 22 マイクロメートルのフィルター上で濾過する。

【0293】存在しているポリヒスチジンタンパク質は、続いてあらかじめ 50 mM T r i s , 300 mM N a C l pH 8 . 0 ( 緩衝液 B ) 中で平衡化した H i T r a p ( 商標 ) ニッケルアフィニティー樹脂 ( A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h ) 上での H P L C によって精製される。

【0294】回収した画分におけるポリヒスチジンタンパク質の存在は、一方で SDS P A G E 電気泳動によって、他方で融合タンパク質の N 末端に対する特異的抗体を用いる免疫検出によって証明される。

【0295】この段階で、注目のタンパク質は最大 80 % 純粋である。

【0296】精製の最終段階は、イオン交換クロマトグラフィーカラム上でのタンパク質の分離から成る。

【0297】融合タンパク質を含む画分は、50 mM T r i s pH 8 の緩衝液中であらかじめ平衡化した陰イオン交換カラム ( M i n i Q P E 4 . 6 / 50 , P h a r m a c i a ) に注入される。タンパク質の溶出は、50 mM T r i s pH 8 . 0 の緩衝液中の、0 ~ 500 mM に及び N a C l グラジエントの通過によって行われる。

【0298】注目のタンパク質の純度は SDS / P A G E 上で推定され、そしてタンパク質濃度は B C A アッセイ ( ビンコニン酸及び硫酸銅、S i g m a ) によって測定された。

【0299】N 末端ポリヒスチジン末端を含む精製野生型及び変異型 I F N - 2 タンパク質が、D a u d i 細

胞系の細胞増殖に対するIFN-2のこれらの2つの形態の抗増殖活性の測定から成る機能的試験の間使用される。

【0300】c) Daudi Burkitt細胞系のヒトリンパ芽球の抗増殖を誘導する天然野生型及び変異型M148I IFN-2の能力の評価

これらの試験は、2つの異なるIFN-2の型、すなわち天然野生型IFN-2及びM148I IFN-2で行われる。前もってRPMI1640培地(10%ウシ胎児血清及び2mMのL-グルタミンを添加した)の中で培養された細胞(ヒトDaudi Burkittリンパ腫細胞系、以後「Daudi細胞」と称する)は、 $4 \times 10^4$ 細胞/穴の細胞密度で96穴プレート中に接種される。

【0301】各穴において、Daudi細胞は、天然野生型又は変異型IFN-2のいずれかの濃度の増大させつつ据えられる。野生型及び変異型IFN-2のいずれかの場合に、0.003pM~600nMの終濃度が試験される。

【0302】8個の異なる培養、及びそれによる異なる測定が、両タンパク質及び各濃度について平行して行われる。

【0303】Daudi細胞は、続いて5%CO<sub>2</sub>のもと、37°Cで66時間培養される。

【0304】66時間の増殖後、各IFN-2の抗増殖効果が、なおもミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性を示す生細胞の数によって決定される。これらのデヒドロゲナーゼ活性は、テトラゾリウム塩であるMTTの開裂に由来するホルマザン結晶の形成に対応する550nmでの光学密度をモニタリングすることによって、12mM MTTの存在下(37°Cで4時間インキュベート)で検出され得る。

【0305】野生型IFN-2又はM148I変異型IFN-2の抗増殖活性は、細胞増殖を50%阻害するIFN-2の濃度に相当するIC50の測定に基づいている。

【0306】得られた結果は図3に例示する。

【0307】野生型及び変異型(M148I)タンパク質の各濃度について、グラフ上に表された点は、タンパク質及び濃度のそれぞれについて平行して作製された4つの培養物上で行われた4つの測定値の平均である。

【0308】野生型IFN-2について測定される平均IC50値は0.3であり、一方、変異型M148I IFN-2について測定される平均IC50値は5.0である。従って、天然野生型タンパク質の値に対する変異型タンパク質のIC50値に対応する比は15.3に達する。

【0309】この試験は、細胞の抗増殖活性が、M148I変異型IFN-2の場合、野生型IFN-2と比較して大きく低下することを示している。

【0310】d) 乳ガン細胞系MCF-7におけるシグナル伝達を活性化する天然野生型及び変異型M148I IFN-2の能力の評価

インターフェロンは、JAK(Janusキナーゼ)及びSTAT(シグナルトランスデューサー及び転写のアクチベーター)タンパク質が関与するシグナル伝達経路を介して作用することが知られている。インターフェロンの、その受容体への結合は、リン酸化によってSTATタンパク質を次々に活性化するJAKタンパク質のリン酸化を誘導する。活性化されたSTATタンパク質は、それらが、各遺伝子の転写を刺激する、遺伝子プロモーター上のインターフェロン応答因子と結合する核に転移する。インターフェロンによって開始されるシグナル伝達経路を研究するために、レポーター遺伝子技術を使用した。方法は後述する。

【0311】乳ガン細胞MCF-7(ECACC)は、24時間、10%ウシ胎児血清を添加したRPMI中の、96穴プレートの $1 \times 10^4$ 細胞/穴の密度で播種された。続いて、細胞は、取扱説明書に従い、Superfect(Qiagen)を用いてインターフェロン刺激型応答因子(Clontech)の制御下で配置されたホタルルシフェラーゼをコードするレポーター遺伝子コンストラクト(pISRE-Luc)で6時間トランスフェクションされた。次に、培養液を交換し、そして細胞を種々の用量の野生型又は変異型IFN-2タンパク質を用いて、37°Cで6時間刺激した後に、CO<sub>2</sub>インキュベーター内でそれらを一晚インキュベートした。刺激の後、培養液を捨て、そして100μl/穴のリン酸緩衝液(PBS)/1mM MgCl<sub>2</sub>と交換した。ルシフェラーゼ活性は、100μl/穴の基質であるLucLite-Plus(Packard)の添加後に、Micro Betaカウンター(Perkin-Elmer)において測定した。

【0312】結果はルシフェラーゼ活性の最大刺激のパーセンテージとして表される。測定は3回行い、そして本明細書で示した値は3回1組の決定の平均を表す。

【0313】シグナル伝達カスケードの引き金を引く野生型IFN-2又は変異型M148I IFN-2の能力は、ルシフェラーゼ活性を50%刺激するそれらの各濃度に対応するそれらの50%有効量(EC50)の測定に基づいている(最大刺激が100%の活性であるとみなされる)。

【0314】野生型IFN-2について測定される平均EC50値は12.33pMである。

【0315】変異型M148I IFN-2について測定される平均EC50値は12.2pMである。

【0316】従って、野生型タンパク質についてのEC50値に対する、変異型タンパク質についてのEC50値に対応する比は9.91に達する(標準偏差3.4)。

【0317】従って、この試験は変異型M148I I

FN - 2の生物活性が、インターフェロンのシグナル伝達経路を活性化するその能力に基づいて、野生型IFN - 2のものより10倍低いことを示している。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、SNP M148Iを含んで成る本発明に従いコードされたタンパク質及び天然野生型IFN - 2タンパク質のモデルを表す。図1の濃いリボンが天然野生型IFN - 2タンパク質の構造を表す。図1の薄いリボンがM148I変異型IFN - 2タンパク質の構造を表す。

【図2】図2は、図1で表したタンパク質の一方の右側\*

\*の近寄ったモデルを表す。

【図3】図3は、Daudi Burkitt細胞系に対する、本発明のポリペプチド及びヒトIFN - 2の参照野生型遺伝子によってコードされるポリペプチドの抗増殖効果を測定する試験の結果を表す。この図において、横軸はピコモル(pM)のタンパク質濃度の対数に対応し、そして縦軸は細胞増殖のパーセンテージに対応する。野生型IFN - 2の抗増殖効果は三角によって表され、そして変異型IFN - 2の抗増殖効果は丸によって表される。

【図1】

【図2】

図1

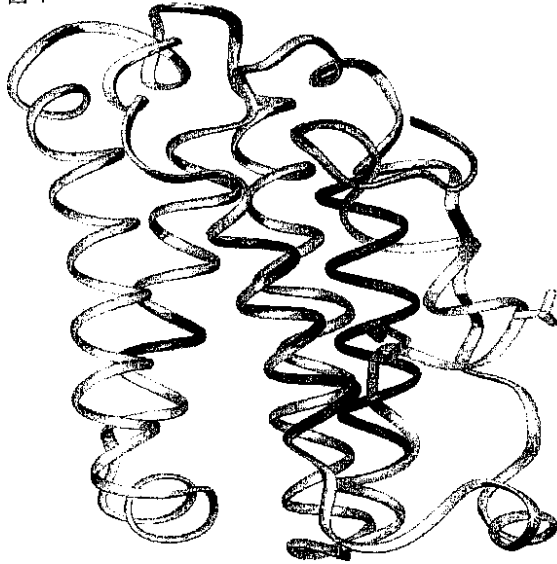
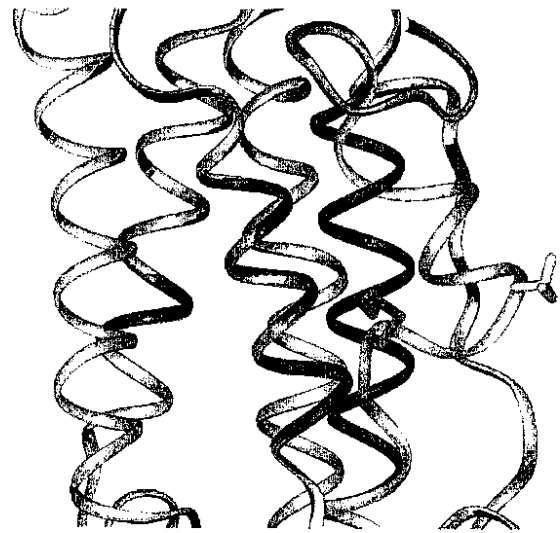


図2



【図3】

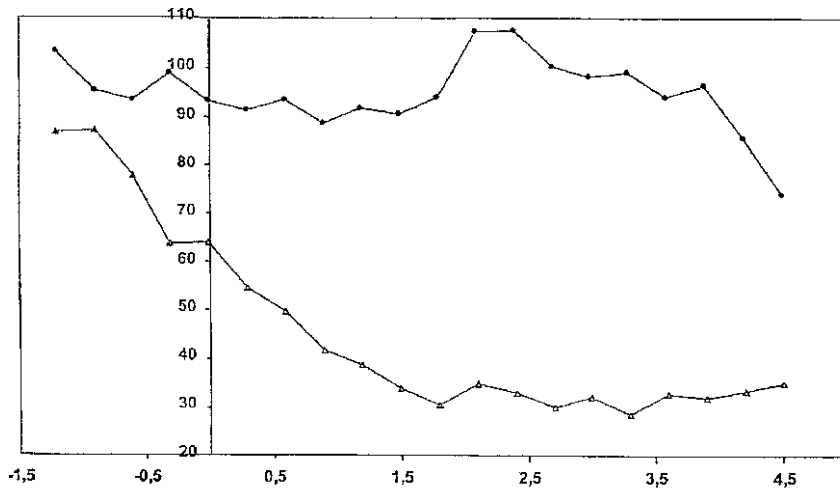


図3

## 【手続補正書】

【提出日】平成14年5月22日(2002.5.22)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】IFNアルファ-2遺伝子の新規ポリヌクレオチド及びポリペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 配列番号1の配列又はそのコード配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列であって、以下のコードSNP: c527a又はg1023aのうちの少なくとも1つを含むと理解されるヌクレオチド配列、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列又はそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが以下のコードSNP: c527a, g1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】 配列番号1の配列又はそのコード配列から成り、当該配列のうちのそれぞれ1つが、以下のコードSNP: c527a, g1023aのうちの少なくとも1つを含むと理解されることを特徴とする、請求項1又は2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 ヌクレオチド配列a)がc527a及びg1023aから成る群から選択される単一のコードSNPを含むことを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c1047tのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうち

の少なくとも1つを含むと理解されるもの、あるいはb) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、の一部から成る単離されたポリヌクレオチドであって、少なくとも10個のヌクレオチドから構成される単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】 a) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24~188位に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列であって; a)及びb)におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ1つが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、を含んで成るポリペプチドをコードすることを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項8】 A6D及びM171Iから成る群から選択される、単一のコードSNPを含むポリペプチドをコードすることを特徴とする、請求項7に記載のポリヌクレオチド。

【請求項9】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列との80~100%の同一性を有するポリヌクレオチド、及び/又は

b) 請求項1~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの、全部又は一部の使用であって、配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが、以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものと80~100%の同一性を有するポリヌクレオチドの全部又は一部を同定し、ハイブリダイズし、そして/あるいは増幅するための使用。

【請求項10】 a) 配列番号1のヌクレオチド配列と80~100%の同一性を有するポリヌクレオチド、及び/又は

b) 請求項1~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの、全部又は一部の使用であって、配列番号1のヌクレオチド配列又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のうちのそれぞれ1つが、以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものと、80~100%の同一性を有するポリヌクレオチドの全部又は一部の遺伝子型判定(genotyping)のための使用。

【請求項11】 遺伝子型判定がミニ配列決定によって行われる、請求項10に記載の使用。

【請求項12】 請求項1~8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター。

【請求項 13】 請求項 12 に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞。

【請求項 14】 請求項 13 に記載の宿主細胞が培養液中で培養され、そしてポリペプチドが当該培養液から単離されることを特徴とする、ポリペプチドの調製方法。

【請求項 15】 a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、又は b) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 24 ~ 188 位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a) 及び b) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ 1 つが、以下の SNP : A6D, M171I のうちの少なくとも 1 つを含むと理解されるものと、少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項 16】 a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、又は b) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 24 ~ 188 位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a) 及び b) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ 1 つが、以下のコード SNP : A6D, M171I のうちの少なくとも 1 つを含むと理解されるもの、を含んで成ることを特徴とする、請求項 15 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】 a) 配列番号 2 のアミノ酸配列、又は b) 配列番号 2 のアミノ酸配列の 24 ~ 188 位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a) 及び b) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ 1 つが、以下のコード SNP : A6D, M171I のうちの少なくとも 1 つを含むと理解されるものから成ることを特徴とする、請求項 15 又は 16 に記載のポリペプチド。

【請求項 18】 a) 及び b) におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれ 1 つが、A6D 及び M171I から成る群から選択される単一のコード SNP を含むことを特徴とする、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 19】 免疫特異的抗体を得るための方法であって、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを用いる、動物の免疫感作によって得られることを特徴とする方法。

【請求項 20】 請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドのための免疫特異的抗体。

【請求項 21】 請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを活性化し、又は阻害する物質の同定のための方法であって：

- a) 請求項 1 ~ 4, 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、
- b) a) に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、
- c) b) に記載の宿主細胞と、試験され得る物質との接触、及び
- d) 試験され得る物質によって生じる活性化又は阻害作用の決定、  
を含んで成る方法。

【請求項 22】 請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドによって活性化され、又は阻害される物質の同定方法であって、

- a) 請求項 1 ~ 4 及び 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、
- b) a) に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、
- c) b) に記載の宿主細胞と、試験され得る物質との接触、及び
- d) 前記ポリペプチドによって生じる、試験され得る物質に対しての活性化又は阻害作用の決定、  
を含んで成る方法。

【請求項 23】 対象者において、本発明に記載のポリヌクレオチド及び/又は本発明に記載のポリペプチドの生物学的特性を解析するための方法であって、以下の、

- a) 対象者のゲノムにおいて、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの存在又は非存在を決定し、
- b) 対象者において、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを決定し、
- c) 対象者において、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの存在又は非存在を決定し、
- d) 対象者において、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの濃度を決定し、
- e) 対象者において、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの機能性を決定すること、  
のうちの少なくとも 1 つを含んで成る方法。

【請求項 24】 活性物質の目的で、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのポリペプチドを含んで成る薬物。

【請求項 25】 ガン及び腫瘍、心臓血管疾患、代謝病、感染症、中枢神経系の疾患、免疫学的及び自己免疫学的に関連している疾患、創傷治癒、化学療法処置と関連づけられる疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、胃腸疾患、性病から成る群から選択される疾患のうちの 1 つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 26】 癌腫、例えば転移型腎癌、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、心臓血管疾患、肥満、ウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎並びに HIV / エイズ、及び感染性肺炎、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、創傷治癒、化学療法と関連している疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、クローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに生殖器

のイボから成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項27】 活性物質の目的で、請求項1～4及び6～8のいずれか1項に記載の、少なくとも1つのポリヌクレオチド、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体を含んで成る薬物。

【請求項28】 ガン及び腫瘍、心臓血管疾患、代謝病、感染症、中枢神経系の疾患、免疫学的及び自己免疫学的に関連している疾患、創傷治癒、化学療法処置と関連づけられる疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、胃腸疾患、性病から成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項1～4及び6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体の使用。

【請求項29】 癌腫、例えば転移型腎癌、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、心臓血管疾患、肥満、ウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、創傷治癒、化学療法と関連している疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、クローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに生殖器のイボから成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項1～4及び6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体の使用。

【請求項30】 活性物質の目的で、請求項15～18のいずれか1項に記載の少なくとも1つのポリペプチド、請求項1～4及び6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの全部又は一部、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体、並びに医薬として許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項31】 活性物質の目的で、請求項15～18のいずれか1項に記載の少なくとも1つのポリペプチド、請求項1～4及び6～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの全部又は一部、請求項12に記載の組換えベクター、請求項13に記載の宿主細胞及び/又は請求項20に記載の抗体を含む診断組成物。

【請求項32】 a) 治療上有効な量の、請求項15～

18のいずれか1項に記載のポリペプチド、及び/又はb) 請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、及び/又は

c) 処置され得る対象者に由来する、請求項13に記載の宿主細胞の使用であって；

請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの、対象者における発現又は活性を増大せしめることを意図する薬物を調製するための使用。

【請求項33】 a) 治療上有効な量の、請求項20に記載の抗体、及び/又は

b) 請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現の阻害を可能にするポリヌクレオチドの使用であって、請求項15～18のいずれか1項に記載のポリペプチドの、対象者における発現又は活性を減少せしめることを意図する薬物を調製するための使用。

【請求項34】 患者のゲノムにおける、配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列であって、以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの1つを含んで成るヌクレオチド配列の存在と関連しているIFN-2変異体によって生じる疾患又は病気を有する前記患者の予防又は処置のための薬物の調製のための、IFN-2タンパク質の使用。

【請求項35】 IFN-2遺伝子のポリヌクレオチド内の、以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つと、病気又は病気に対する耐性ととの間の、統計学的に関連している関係を決定するための方法であって、

a) 個体群を遺伝子型判定し、  
b) 前記個体群内の前記病気又は病気に対する耐性の分布を決定し、  
c) 遺伝子型のデータと、前記病気又は病気に対する耐性の分布とを比較し、そして  
d) 統計的に関連している関係についての前記比較を解析すること、  
を含んで成る方法。

【請求項36】 病気又は病気に対する耐性のための診断/予後のキットを開発するための、IFN-2遺伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つの使用。

【請求項37】 M171I変異型IFN-2の遺伝子産物と比較して、実質的に類似又はそれ以下の生物活性を有する新規化合物。

【請求項 38】 前記生物活性が、例えば Daudi Burkitt 細胞系上での細胞の抗増殖活性又はシグナル伝達能を測定することによって評価される、請求項 37 に記載の化合物。

【請求項 39】 天然の野生型 IFN - 2 よりも少なくとも 15 倍低い、Daudi Burkitt 細胞系上での細胞の抗増殖活性を有する新規化合物。

【請求項 40】 天然の野生型 IFN - 2 よりも少なくとも 10 倍低い、MCF7 細胞上でのシグナル伝達能を有する新規化合物。

【請求項 41】 請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の化合物の同定のための、M171I の SNP を含む、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 42】 以下の段階：

a) 生物活性、例えば Daudi Burkitt 細胞系上での細胞の抗増殖活性又はシグナル伝達能を決定し、

b) 試験され得る化合物の、段階 a) で決定した活性を、M171I 変異型 IFN - 2 の遺伝子産物の活性と比較し、そして

c) 段階 b) で実施した比較に基づき、試験され得る化合物が、M171I 変異型 IFN - 2 の遺伝子産物と比較して実質的に類似又はそれより低い活性を有するか否かを決定すること、

を含んで成る、請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の化合物の同定方法。

【請求項 43】 試験され得る化合物が、合成ペプチドコンビナトリアルライブラリー、高処理量スクリーニングからあらかじめ同定され、又はコンピューターを使ったドラッグデザインによって設計された結果、M171I IFN - 2 遺伝子産物のポリペプチドと同一の三次元構造及び/又は化学作用を有することを特徴とする、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】 ガン及び腫瘍、心臓血管疾患、代謝病、感染症、中枢神経系の疾患、免疫学的及び自己免疫学的に関連している疾患、創傷治癒、化学療法処置と関連づけられる疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、胃腸疾患、性病から成る群から選択される疾患のうちの 1 つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【請求項 45】 癌腫、例えば転移型腎癌、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、心臓血管疾患、肥満、ウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎並びに HIV / エイズ、及び感染性肺炎、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分

裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、創傷治癒、化学療法と関連している疾患、透析されている患者の貧血、骨粗鬆症、クローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに生殖器のイボから成る群から選択される疾患のうちの 1 つの予防又は処置が意図される薬物の調製のための、請求項 37 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の化合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】 本発明は IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列に由来し、そして新規 SNP を含んで成る新規ポリヌクレオチド、天然 IFN - 2 タンパク質に由来し、そしてこれらの SNP によって生じる突然変異を含んで成る新規ポリペプチド、及びそれらの治療上での使用に関する。

【0002】 従来技術

インターフェロンアルファ-2 (IFN - 2) 遺伝子は以下の刊行物に記載されている：

- Olopade OI., Bohlander Sk. "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia." *Genomics*. 1992 Oct ; 14 (2) : 437-43 ;

- Ezekowitz Ra., Mulliken Jb., "Interferon alpha-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy" *N. Engl. J. Med.* 1992 May 28 ; 326 (22) : 1456-63. ;

- Dithmar S., Rusciano D., "Neoadjuvant interferon alpha-2b treatment in a murine model for metastatic ocular melanoma : a preliminary study" *Arch. Ophthalmol.* 2000 Aug ; 118 (8) : 1085-9.

【0003】 この遺伝子のヌクレオチド配列は、GenBank のデータベースにおいてアクセッション番号 J00207, V11834 のもとアクセス可能である。

【0004】 IFN は、それらの細胞性抗増殖作用、並びに抗ウイルス性及び抗寄生虫性応答におけるそれらの関与について知られている。

【0005】 IFN はまた、造血幹細胞のレベルで複数の他のサイトカインの発現を阻害し、そしてある腫瘍の細胞増殖を阻害することも知られている。

【0006】 IFN はまた、腎ガンにおける EGF 受容体の発現を低下させ、あるミトコンドリア遺伝子の発現を阻害し、そして線維芽細胞、単球及び B リンパ球の増殖を、特に *in vitro* で阻害し、そして B リンパ球による抗体の合成を阻止することも知られている。

【0007】 IFN はまた、腫瘍細胞の表面上での腫瘍特異的抗原の発現を誘導すること、そして更には ISRE 型 (インターフェロン刺激応答因子) のプロモーター領域の支配下にある遺伝子を、これらの ISRE の特異的な転写因子に対して作用させることによって誘導することも知られている。

【0008】 IFN が異なる障害及び/又はヒトの疾

患、例えば、限定しないが異なるガン、例えばガン腫、黒色腫、リンパ腫、白血病並びに肝臓、首、頭及び腎臓のガン、心臓血管疾患、代謝病、例えば免疫系等と関連していないもの、例えば肥満、感染症、例えばB型及びC型肝炎並びにAIDS、感染性肺炎、潰瘍性大腸炎、中枢神経系等の病気、例えばアルツハイマー病、精神分裂病及びうつ病、組織又は器官移植の拒絶、創傷治療、透析されている患者の貧血、アレルギー、喘息、多発性硬化症、骨粗鬆症、乾癬、リウマチ様関節炎、クローン病、自己免疫疾患及び障害、胃腸疾患、並びに化学療法処置と関連している障害、に關与することが知られている。

【0009】IFN は、ある白血病、転移型腎ガン及び免疫欠損後に現れる腫瘍、例えばAIDSの場合にはカポジ肉腫に特に使用される。IFN は、他のタイプの腫瘍及びあるウイルス感染に対しても有効である。IFN はまた、生殖器のイボ又は性病の処置についてFDA（食品医薬品局）によって承認されている。

【0010】しかしながら、IFN、特にIFN - 2は、それらを医薬組成物において使用する場合に多くの副作用があり、例えば急性過敏症（じんま疹、気管支収縮、アナフィラキシーショック等）、心不整脈、低血圧、てんかん性発作、甲状腺機能についての問題、流感様症候群（発熱、発汗、筋肉痛）等である。

【0011】更に、IFN で処置された患者はこれらの分子に対する抗体を発生させることがあり、これはそれらの有効性を中和して、その結果低下させる。

【0012】本発明は、IFN - 2 遺伝子及びその対応するタンパク質に対する、天然野生型IFN - 2 タンパク質と異なる機能を有し得る、新規ポリペプチド及び新規ポリヌクレオチドについて記載する。特に、これらの新規ポリペプチド及び新規ポリヌクレオチドのいくつかは、天然野生型IFN - 2 との比較で有意に阻害される細胞抗増殖活性を有する。

【0013】これらの新規ポリペプチド及びポリヌクレオチドは、特に前述の障害又は疾患を処置又は予防し、そしてそれらに関連している欠点の全部又は一部を避けるために使用され得る。

【0014】本発明  
本発明は、参照野生型IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列と異なる、1又は複数のSNP（一塩基多型）を含んで成る新規ポリヌクレオチドに関する。

【0015】ヒト参照野生型IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1は1733ヌクレオチドから成り、そしてヌクレオチド511（開始コドン）からヌクレオチド1077（終止コドン）に及び567ヌクレオチドのコード配列を含んで成る。

【0016】本出願人は、参照野生型IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列中で9個のSNPを同定した。

【0017】これらの9個のSNPは以下の通りであ

る：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acctta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t。

【0018】当然のことながら、本発明の意味において、番号付けは、あらかじめ定義したSNPの位置に対応し、そして配列番号1に示したヌクレオチド配列と関連している。

【0019】文字a, t, c及びgは、それぞれ窒素性塩基のアデニン、チミン、シトシン及びグアニンに対応する。

【0020】最初の文字は野生型のヌクレオチドに対応し、一方、最後の文字は変異型ヌクレオチドに対応する。

【0021】この様に、例えばSNP c527aは、参照野生型IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1の、527位のヌクレオチドであるシトシン(c)が、アデニン(a)に変異したことに対応し、そしてSNP 96-100del(aattt)は、参照野生型IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1の96~100位までの5個のヌクレオチドaatttが欠失した変異に対応する。

【0022】これらのSNPは、引用によって本明細書に組み入れられる、2000年12月6日に提出された出願人の特許出願FR0022894及び2001年12月6日に提出されたUS10/010749に記載の決定方法を用いて本出願人によって同定された。

【0023】これらの特許出願に記載の方法は、無作為な個体群由来の少なくとも1つの個体において、1（又は複数）の既存のSNPの同定を可能にする。

【0024】本発明の範囲において、一方が完全なコード配列を含んで成る、IFN - 2 遺伝子のヌクレオチド配列の2つのフラグメントが、無作為な方法で選択した個体群の異なる個体から単離された。

【0025】続いて、これらのフラグメントの配列決定が、DHPLC（「変性-高性能液体クロマトグラフィー」）による解析の後、ヘテロ二重鎖プロファイル（すなわち、参照野生型IFN - 2 遺伝子配列と異なるプロファイル）を有するこれらの試料のうちのいくつかについて行われた。

【0026】この方法で配列決定されたフラグメントを、次に参照野生型IFN - 2 遺伝子のフラグメントのヌクレオチド配列と比較し、そして本発明に基づくSNPが同定された。

【0027】この様にSNPは天然のものであり、そしてこれらの各々が世界の人口のある個体に存在している。

【0028】参照野生型IFN - 2 遺伝子は、最初の23アミノ酸を含むシグナルペプチドの開裂によって165アミノ酸の成熟タンパク質に変換され得る、アミノ

酸配列である配列番号2に対応する、188アミノ酸の未成熟タンパク質をコードする。

【0029】本発明のコードSNPのいずれか、すなわちc527a及びg1023aは、アミノ酸配列のレベルで、IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の修飾をもたらす。

【0030】アミノ酸配列におけるこれらの修飾は以下の通りである：SNP c527aは、アミノ酸配列である配列番号2に対応する、IFN-2遺伝子によってコードされる未成熟タンパク質の6位のアミノ酸であるアラニン(A)をアスパラギン酸(D)に変異させ、そしてこれはシグナル配列に属するので、成熟タンパク質には存在していない。本発明の説明において、このSNPによってコードされる突然変異は、A6Dと称されることもある。

【0031】SNP c527aは当該タンパク質のシグナル配列に位置するアミノ酸残基に影響を及ぼす。このシグナル配列は、成熟タンパク質の適切なターゲティングに必要な全ての情報を含む。従って、SNP c527aは成熟タンパク質の最終的な局在に影響を及ぼし得る。

【0032】SNP g1023aは、アミノ酸配列である配列番号2と対応する、IFN-2遺伝子によってコードされる未成熟タンパク質の171位のアミノ酸であるメチオニン(M)をイソロイシン(I)に変異させ、そしてこれは成熟タンパク質の148位に当する。本発明の説明において、用語M148I及びM171Iは、一方がそれぞれ成熟タンパク質又は未成熟タンパク質を言及するかどうかに従い、このSNPによってコードされる突然変異を言及するために使用され得る。

【0033】SNP g1023aは、参照野生型IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドと比較して、本発明に従うポリペプチドの空間的配座の修飾をもたらす。

【0034】空間的配座における修飾は、当業者に周知の方法に従い、例えば新規のモデリングツール(例えば、SEQFOLD/MSI)、ホモロジー(例えば、MODELER/MSI)、力場の最小化(例えば、DISCOVER, DELPHI/MSI)及び/又は分子動力学(CFF/MSI)を利用して、コンピューター分子モデリングによって観察され得る。

【0035】その様なモデリングの一例は、本明細書において実験の項目に示される。

【0036】コンピューター分子モデリングは、成熟変異型タンパク質上の突然変異M148Iが、IFN-2のヘリックスA及びE上の、突然変異の部分に近い側方の鎖における変化をもたらすという観察を可能にする。変異した側方の鎖のI148は、側方の鎖のE141と塩橋で会合しており、これは成熟変異型タンパク質の空間的配座におけるいくつかの変化をもたらす。一

方、野生型IFN-2の三次元配座において、R144の側方鎖は当該分子の内部に向かって配置され、R144の側方鎖は成熟変異型タンパク質の外側に向かって配置される。同様に、成熟変異型タンパク質において、R22及びE141の側方鎖は置換される。この様に、変異型タンパク質は、天然野生型IFN-2タンパク質と異なる三次元配座を有する。

【0037】この様に、コンピューター分子モデリングは、148位のアミノ酸、メチオニンの存在が参照野生型IFN-2タンパク質の構造及び機能の重大な修飾に関与するという予想を可能にする。

【0038】本発明に従う他のSNP、すなわち96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c1047tは、アミノ酸配列である配列番号2のレベルで、IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の修飾に関与しない。

【0039】SNP c1047tはサイレントであり、そしてSNP 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427tは非コード領域である。

【0040】本発明に従うポリヌクレオチドの遺伝子型判定(genotyping)は、群におけるこれらのポリヌクレオチドの対立遺伝子頻度を決定する様な方法で実施され得る。遺伝子型判定の6個の例を、後文の実験の項目において提示する。

【0041】本発明のポリペプチドの機能性の決定も、それらの生物活性の試験によって実施され得る。

【0042】これについては、例えばDaudi Burkitt's細胞系に対する、本発明に従うポリペプチドの抗増殖作用を測定し、そして天然野生型IFN-2タンパク質と比較することが可能である。

【0043】機能性の決定の一例は、後文の実験の項目において提示する。

【0044】本発明はまた、本発明に従うポリヌクレオチド及びポリペプチド並びにこれらのポリヌクレオチド及びポリペプチドから出発して得られ、そして/あるいは同定される治療分子の使用であって、特にあるヒトの障害及び/又は疾患の予防及び処置のための使用に関する。

【0045】本発明の詳細な説明  
定義

「参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列」とは、ヒト遺伝子のヌクレオチド配列、配列番号1であると理解される。

【0046】この配列は、GenBankにおいて、アクセス番号J00207, V11834のもとアクセス可能であり、そしてOlopade OI., Bohlander Sk.

「Mapping of the Shortest region of overlap of deletions of the Short arm of Chromosome 9 associated with human neoplasia」, Genomics. 1992 Oct ; 14(2) : 437-43に記載されている。

【0047】「天然野生型 I F N - 2 タンパク質」とは、参照野生型 I F N - 2 遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされる成熟タンパク質であると理解される。天然野生型未成熟 I F N - 2 タンパク質は、ペプチド配列である配列番号 2 に対応する。

【0048】「ポリヌクレオチド」とは、修飾型又は非修飾型 DNA 又は RNA であり得るポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドであると理解される。

【0049】用語ポリヌクレオチドは、例えば一本鎖又は二本鎖 DNA、1 又は複数の一本鎖領域及び 1 又は複数の二本鎖領域の混合物から成る DNA、一本鎖又は二本鎖 RNA 並びに 1 又は複数の一本鎖領域及び 1 又は複数の二本鎖領域の混合物から成る RNA を含む。用語ポリヌクレオチドは、更に 1 又は複数の三本鎖領域を含む RNA 及び / 又は DNA を含むこともある。ポリヌクレオチドとは、安定性の理由又は他の理由のために修飾された骨格を有する様な方法で修飾された 1 又は複数の塩基を含む DNA 及び RNA であると等しく理解される。修飾された塩基とは、例えば異常な塩基、例えばイノシンであると理解される。

【0050】「ポリペプチド」とは、例えば同じペプチドの場合には通常の又は修飾されたペプチド結合によって、互いに連結した、少なくとも 2 つのアミノ酸を含んで成るペプチド、オリゴペプチド、オリゴマー又はタンパク質であると理解される。

【0051】本発明に従うポリペプチドは、遺伝コードによって定義される、20 アミノ酸以外のアミノ酸から成ることがあり、そして当業者に周知の、天然の過程、例えば翻訳後成熟過程又は化学的過程によって修飾されたアミノ酸から成ることもある。その様な修飾は文献において完全に詳述されている。これらの修飾は、ポリペプチド、ペプチド骨格、アミノ酸鎖において、又は例えばカルボキシ末端若しくはアミノ末端であっても、いずれかに出現し得る。

【0052】ポリペプチドはユビキチン結合後に枝分かれするか、あるいは枝分かれしながら又は枝分かれせずに環状化することがある。このタイプの修飾は、当業者に周知の天然又は合成翻訳後過程の結果であり得る。

【0053】ポリペプチドの修飾は、例えばアセチル化、アシル化、ADP リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘムの共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、共有又は非共有架橋、還元、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、システイン形成、ピログルタミン酸塩形成、ホルミ

ル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解過程、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セネロイル化 (senescence)、硫酸化、アミノ酸付加、例えばアルギニル化又はユビキチン結合を含むことがある。その様な修飾は文献: PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2<sup>nd</sup> Ed., T.E. Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182 : 626-646, and Rattan et al. "Protein Synthesis : Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663 : 48-62、において十分に詳述されている。

【0054】「単離されたポリヌクレオチド」又は「単離されたポリペプチド」とは、例えば既に定義されている様な、ヒトの身体から単離され、又はさもなければ技術的手法によって産生されるポリヌクレオチド又はポリペプチドであると理解される。

【0055】「同一性」とは、ヌクレオチド又はポリペプチド配列の同一性の測定値であると理解される。

【0056】同一性は当業者にとって周知の用語であり、そして文献に詳細に記載されている。COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998 ; BIOCOMPUTING INFORMATICS AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993 ; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M. and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994 ; and SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987 を参照のこと。

【0057】2 つの配列間の同一性及び類似性を決定するために一般的に利用される方法も、文献において詳細に記載されている。GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied Math (1988) 48 : 1073 を参照のこと。

【0058】例えば、ヌクレオチド配列である配列番号 1 と少なくとも 95 % の同一性を有するポリペプチドは、前記配列と比較して、100 ヌクレオチドの範囲に多くても 5 個所の突然変異を含むポリヌクレオチドである。

【0059】これらの突然変異の個所は、1 (又は複数) のヌクレオチドの 1 (又は複数) の置換、付加及び / 又は欠失であってもよい。

【0060】同様に、例えば、アミノ酸配列である配列番号 2 と少なくとも 95 % の同一性を有するポリペプチドは、前記配列と比較して、100 ヌクレオチドの範囲

に多くても5個所の突然変異を含むポリペプチドである。

【0061】これらの突然変異の個所は、1（又は複数）のアミノ酸の1（又は複数）の置換、付加及びノ又は欠失であってもよい。

【0062】本発明のSNPのうち少なくとも1つを含む、ヌクレオチド配列である配列番号1又はアミノ酸配列である配列番号2とそれぞれ完全には同一ではない、本発明に従うポリヌクレオチド及びポリペプチドは、それらの配列の変異体とみなされる。

【0063】通常、本発明に従うポリペプチドは、本発明のSNPのうち少なくとも1つを含んで成るヌクレオチド配列、配列番号1と、同一又は事実上同一の生物活性を有する。

【0064】同様に、本発明に従うポリペプチドは通常、本発明のコードSNPのうち少なくとも1つを含んで成るアミノ酸配列、配列番号2と同一又は事実上同一の生物活性を有する。

【0065】本発明に従う変異体は、例えば部位指定突然変異導入法又は直接合成によって得ることができる。

【0066】「SNP」とは、ヌクレオチド配列における塩基の何らかの天然の変異であると理解される。ヌクレオチド配列のSNPは、コード、サイレント又は非コードであってもよい。

【0067】コードSNPは、このヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列における1又は複数のアミノ酸の修飾に関するコード配列における多型である。この場合、用語SNPは、拡大解釈すれば、アミノ酸配列中の突然変異にも適用される。

【0068】サイレントSNPは、このヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列におけるアミノ酸の修飾に全く関与しないヌクレオチド配列のコード配列における多型である。

【0069】非コードSNPは、ヌクレオチド配列の非コード配列における多型である。この多型は、特にイントロン、スプライシング領域、転写プロモーター又はエンハンサー部位の配列において見られる。

【0070】「機能的SNP」とは、既に定義した様な、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に含まれ、そしていくつかの機能を有するSNPであると理解される。

【0071】「機能性」とは、ポリペプチド又はポリヌクレオチドの生物活性であると理解される。

【0072】本発明に従うポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能性は、参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列又はこの後述するヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの生物活性の保存、増大、減少又は抑制から成るといえる。

【0073】本発明に従うポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能性は、同様に参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列又はこの後述するヌクレオチド配列によってコ

ードされるポリペプチドの生物活性の性質における変化から成るともいえる。

【0074】生物活性は、特に本発明に従うポリペプチドと受容体との親和性又は親和性の不在と関連していることがある。

#### 【0075】ポリヌクレオチド

本発明は、

a) 配列番号1の配列又はそのコード配列（ヌクレオチド511～ヌクレオチド1077）との少なくとも80%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、更に好ましくは少なくとも95%の同一性、そして更に好ましくは少なくとも99%の同一性を有するヌクレオチド配列であって、以下のコードSNP：c527a又はg1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0076】本発明は、同様に、

a) ヌクレオチド配列である配列番号1又はそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下のコードSNP：c527a又はg1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、あるいは、  
b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成る単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0077】好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1の配列又はそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下のコードSNP：c527a、g1023aのうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるものから成る。

【0078】本発明に従い、既に定義したポリヌクレオチドは、c527a及びg1023aから成る群から選択される単一のコードSNPを含んで成る。

【0079】既に定義した様なポリヌクレオチドは、更に以下の非コード及びサイレントSNP：96-100del(aattt)、t110c、139-144del(acttta)、t338a、t363c、c427t、c1047t、のうちの少なくとも1つを含むことがある。

【0080】本発明はまた、

a) ヌクレオチド配列である配列番号1又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下の非コード又はサイレントSNP：96-100del(aattt)、t110c、139-144del(acttta)、t338a、t363c、c427t又はc1047t、のうちの少なくとも1つを含んで成る様なもの；あるいは

b) a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、を含んで成り、又はそれらから成る単離され

たポリヌクレオチドに関する。

【0081】当然ながら、サイレントSNP c1047tのみがヌクレオチド配列である配列番号1のコード配列に位置する。

【0082】本発明はまた、

a)ヌクレオチド配列である配列番号1又は、必要によりそのコード配列であって、これらの配列のそれぞれが、以下のSNP:96-100del(aattt),t110c,139-144del(acttta),t338a,t363c,c427t,c527a,g1023a,c1047t、うちの少なくとも1つを含む様なもの;あるいは

b)a)におけるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列、の一部から成る単離されたポリヌクレオチドであって、少なくとも10個のヌクレオチドから構成されるものに関する。

【0083】好ましくは、上文で定義した様な単離されたポリヌクレオチドは10~40個のヌクレオチドから構成される。

【0084】本発明はまた、

a)アミノ酸配列である配列番号2、又は  
b)アミノ酸配列である配列番号2の24~188位に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列であって、a)及びb)におけるアミノ酸配列のそれぞれが、以下のコードSNP:A6D,M171I、のうちの少なくとも1つを含んで成ると理解されるもの、を含んで成るポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0085】当然のことながら、本発明の意味において、A6D,M171IのSNPの位置に対応する番号は、アミノ酸配列である配列番号2の番号に関連している。

【0086】本発明の好ましい態様において、既に定義されているポリペプチドは、上文で定義した様な単一のコードSNPを含んで成る。

【0087】好ましくは、本発明に従うポリヌクレオチドは、DNA又はRNA分子から構成される。

【0088】本発明に従うポリヌクレオチドは、標準的なDNA又はRNA合成法によって得ることができる。

【0089】本発明に従うポリヌクレオチドも、ヌクレオチド配列である配列番号1上の各SNPのための変異型ヌクレオチドによって野生型ヌクレオチドを修飾することによって、IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列から出発する、部位指定突然変異導入法によって得ることができる。

【0090】例えば、SNP g1023aを含んで成る、本発明に従うポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列である配列番号1の1023位にあるグアノシン(g)をアデノシン(a)に変化させることによって、IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列から出発する、

部位指定突然変異導入法によって得ることができる。

【0091】この様に実施され得る部位指定突然変異導入法の過程は当業者にとって周知であり、刊行物であるTA Kunkelの、1985年の「Proc. Natl. Acad. Sci. US A」82: 488を参照のこと。

【0092】単離されたポリヌクレオチドも、例えば、プレ、プロ又はプレ-プロタンパク質のアミノ酸配列又はマーカアミノ酸配列、例えばヘキサヒスチジンペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むことがある。

【0093】本発明のポリヌクレオチドはまた、融合タンパク質又は他の精製産物を得るために、他のタンパク質又はタンパク質フラグメントをコードするヌクレオチド配列を伴うこともある。

【0094】本発明に従うポリヌクレオチドはまた、ヌクレオチド配列、例えば5及び/又は3非コード配列、例えば転写又は非転写配列、翻訳又は非翻訳配列、スプライシングシグナル配列、ポリアデニル化配列、リボソーム結合配列あるいはmRNAを安定化する配列でさえも含むことがある。

【0095】前記ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列は、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件下で、このヌクレオチド配列とハイブリダイズし得るものと定義される。

【0096】「ストリンジントなハイブリダイゼーション条件」とは、ヌクレオチド配列が少なくとも80%、好ましくは90%以上、より更に好ましくは95%以上、そして最も好ましくは97%以上の同一性を有する場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする化学条件であると広く理解されるが必ずしもそうではない。

【0097】ストリンジントな条件は、当業者にとって周知な方法に従い、例えば50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl,15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリソ酸ナトリウム(pH=7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン及び20µgの変性サケ精子DNAを含んで成る溶液中での、42での前記ポリヌクレオチドのインキュベーション、続く0.1×SSC、65でのフィルター洗浄によって得ることができる。

【0098】本発明の範囲において、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件のみが、100%に等しい同一性を有するヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを可能にする場合、ヌクレオチド配列は、a)において記載した様なヌクレオチド配列と厳密に相補的であると考えられる。

【0099】当然のことながら、本発明の意味において、ヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチドは、本発明に従う少なくとも1つのアンチセンスSNPを含んで成る。

【0100】従って、例えば、前記ヌクレオチド配列がSNP g1023aを含んで成る場合、その相補ヌク

レオチド配列は 1023 位と同等の位置に、チミン (t) を含んで成る。

**【0101】SNP を含んで成るポリヌクレオチドの同定、ハイブリダイゼーション及び/又は増幅**

本発明はまた、

a) ヌクレオチド配列である配列番号 1 と 80 ~ 100 % の同一性を有するポリヌクレオチド、及び/又は

b) 少なくとも 1 つの SNP を含んで成る、本発明に従うポリヌクレオチド、の全部又は一部の使用であって、ヌクレオチド配列である配列番号 1 又は、必要によりそのコード配列 (ヌクレオチド 511 ~ ヌクレオチド 1077) と 80 ~ 100 % の同一性を有するポリヌクレオチドの全部又は一部であって、これらの配列のそれぞれ 1 つが以下の SNP : 96 - 100 del (a a t t t), t 110 c, 139 - 144 del (a c t t t a), t 338 a, t 363 c, c 427 t, c 527 a, g 1023 a, c 1047 t、のうちの少なくとも 1 つを含むと理解されるもの、を同定し、ハイブリダイズし、そして/あるいは増幅するための使用に関する。

**【0102】遺伝子型判定及び SNP の頻度の決定**

本発明はまた、

a) ヌクレオチド配列である配列番号 1 と 80 ~ 100 % の同一性 (好ましくは少なくとも 90 % の同一性、更に好ましくは 95 % の同一性、そして特に 100 % の同一性) を有するポリヌクレオチド、及び/又は

b) 少なくとも 1 つの SNP を含んで成る、本発明に従うポリヌクレオチド、の全部又は一部の使用であって、配列番号 1 又は、必要によりそのコード配列 (ヌクレオチド 511 ~ ヌクレオチド 1077) と 80 ~ 100 % の同一性 (好ましくは少なくとも 90 % の同一性、更に好ましくは 95 % の同一性、そして特に 100 % の同一性) を有するポリヌクレオチドの全部又は一部であって、これらの配列のそれぞれ 1 つが、以下の SNP : 96 - 100 del (a a t t t), t 110 c, 139 - 144 del (a c t t t a), t 338 a, t 363 c, c 427 t, c 527 a, g 1023 a, c 1047 t、のうちの少なくとも 1 つを含んで成ると理解されるものの、遺伝子型判定のための使用という目的を有する。

【0103】本発明に従い、遺伝子型判定は個体又は個体群、最も好ましくは個体群で行われ得る。遺伝子型は、1 又は複数の特異的な遺伝子座に存在する対立遺伝子の決定から成る。

【0104】本発明の意味において、遺伝子型判定は個体又は個体群の遺伝子型の決定のための方法として定義される。遺伝子型は、1 又は複数の特異的な遺伝子座に存在する対立遺伝子から成る。

【0105】「個体群」とは、ランダムな方法又はランダムでない方法で選択された、決定される個体の一群であると理解される。これらの個体はヒト、動物、微生物

又は植物であってもよい。通常、個体群は少なくとも 10 人、好ましくは 100 ~ 300 人含んで成る。

【0106】個体は、それらの民族性に従い、又はそれらの表現型に従い、特に以下の障害及び/又は疾患によって影響を受けるものが選択され得る：

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎並びに HIV / エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、
- 創傷治癒、
- 化学療法と関連している疾患、
- 透析されている患者の貧血、
- 骨粗鬆症、
- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに
- 性病、例えば生殖器のイボ。

【0107】SNP を遺伝子型判定するために実施され得る多くの方法が存在している (例えば、Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches")。これらの技術は 4 つの以下の原理のうちの 1 つに基づいている：対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、任意にデオキシヌクレオチドの存在下でのジデオキシヌクレオチドによるオリゴヌクレオチドの伸長、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのライゲーション又は対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの開裂。これらの技術のいずれか一つが、検出系、例えば直接的な又は偏光した蛍光の測定、あるいは質量分析と組み合わせられ得る。

【0108】遺伝子型判定は、特に偏光型蛍光スキャナーと一緒に、放射性 ddNTP (異なるフルオロフォアによって標識された 2 つの異なる ddNTP) 及び非放射性 ddNTP (2 つの異なる非標識型 ddNTP) を用いたミニ配列決定によって実施され得る。偏光型蛍光の読み込みによるミニ配列決定のプロトコール (FP-TDI 技術又は蛍光偏光鋳型直接ダイターミネーター取り込み (Fluorescence Polarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation)) は当業者にとって周知である。

【0109】FP-TDI は、各個体の DNA のポリメ

ラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅後に得られる産物で実施され得る。このPCR産物は、研究されたSNPを含むポリヌクレオチドの遺伝子領域を網羅するために選択される。PCRサーモサイクラーにおける最後の段階の後、続いて、フルオロフォア特異的励起及び放射フィルターを用いることによる標識された塩基の読み込みのために、偏光型蛍光スキャナー上にプレートが据えられる。標識された塩基の強度の値はグラフ上に記される。

【0110】PCR増幅に関して、本発明のSNPの場合、センス及びアンチセンスプライマーはそれぞれ、1又は複数のSNPを含む注目の領域を増幅するために、本発明のSNPの位置に従い、当業者によって容易に選択され得る。

【0111】例えば、PCR増幅のためのセンス及びアンチセンスヌクレオチドの最初の組み合わせは、  
センスプライマー：GCCTCTTATGTACCCACAAA  
アンチセンスプライマー：CACCAGTAAAGCAAAGGTCA  
であってよい。

【0112】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1においてヌクレオチド3からヌクレオチド537に及び、535ヌクレオチドの長さを有するフラグメントの増幅を可能にする。

【0113】例えば、PCR増幅のためのセンス及びアンチセンスヌクレオチド配列の第2の組み合わせは、  
センスプライマー：CACCCATTTCAACCCAGTCTA  
アンチセンスプライマー：AGCTGGCATAACGAATCAAT  
であってよい。

【0114】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1においてヌクレオチド470～ヌクレオチド1124に及び、655ヌクレオチドの長さを有するフラグメントの増幅を可能にする。

【0115】個体群におけるSNPを含んで成る遺伝子によってコードされる各対立遺伝子の頻度(対立遺伝子頻度)の統計解析が続いて行われ、これはこの個体群を構成する多様な民族性を含む異なる亜集団におけるそれらの影響及びそれらの分布の重要性の決定を可能にする。

【0116】遺伝子型判定のデータは、研究された群において観察された異なる対立遺伝子の分布頻度を推定するために解析される。対立遺伝子頻度の計算は、ソフトウェア、例えばSAS-suite(商標)(SAS)又はSPPLUS(商標)(MathSoft)を用いて実施され得る。個体群における異なる民族性の集団に及び本発明のSNPの対立遺伝子分布の比較は、ソフトウェア、例えばARLEQUIN(商標)及びSAS-suite(商標)によって実施され得る。

【0117】遺伝子マーカーとしての本発明のSNP 遺伝子の機能配列(例えばプロモーター、スプライシング部位、コード領域)を修飾するSNPは病気の感受性

又は耐性と直接関連すると思われるが、全てのSNP(機能的又は非機能的)がこれらの病気の状態に關与する1又は複数の遺伝子の同定にとって価値のあるマーカーを提供することが可能であり、そしてこの結果、これらの病気の状態と間接的に關連するであろう(Cargill et al. (1999). Nature Genetics 22 : 231-238 ; Riley et al. (2000). Pharmacogenomics 1 : 39-47 ; Roberts L. (2000). Science 287 : 1898-1899を参照のこと)。

【0118】この様に、本発明はまた、IFN-2遺伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t、のうちの少なくとも1つを含んで成るデータバンクに關する。

【0119】更に当然のことながら、前記SNPはヌクレオチド配列である配列番号1に従い番号が付けられている。

【0120】このデータバンクは、IFN-2遺伝子のポリヌクレオチド内の、以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つと、病気又は病気に対する耐性ととの間の、統計学的に關連している関係を決定するために、  
a) 個体群を遺伝子型判定し、  
b) 前記個体群内の前記病気又は病気に対する耐性の分布を決定し、  
c) 遺伝子型のデータと、前記病気又は病気に対する耐性とを比較し、そして  
d) 統計的に關連している関係についての前記比較を解析すること、  
によって解析され得る。

【0121】本発明はまた、病気又は病気に対する耐性のための診断/予後のキットを開発するための、IFN-2遺伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP：96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの少なくとも1つの使用に關する。

【0122】本発明のSNP、例えば上述したものは、病気又は病気に対する耐性と直接又は間接的に關連することがある。

【0123】好ましくは、これらの病気は上文で言及した様に定義されるものであってもよい。

【0124】発現ベクター及び宿主細胞 本発明はまた、本発明に従う少なくとも1つのポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターに關する。

【0125】多くの発現系、例えば染色体、エピソー

ム、誘導型ウイルスが使用され得る。更に具体的には、使用される組換えベクターは細菌性プラスミド、トランスポゾン、酵母のエピソーム、挿入因子、酵母染色体因子、ウイルス、例えばバキュロウイルス、パピローマウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、キツネボックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルスから誘導されることもある。

【0126】これらの組換えベクターはまた、コスミド又はファージミド誘導體であってもよい。ヌクレオチド配列は、当業者にとって周知な方法、例えばMOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (上記) Sambrook et al. に記載のものによって、組換え発現ベクター内に挿入され得る。

【0127】前記組換えベクターは、ポリヌクレオチド発現の制御を調節するヌクレオチド配列並びに本発明のポリヌクレオチドの発現及び転写並びに本発明のポリペプチドの翻訳を可能にするヌクレオチド配列を含むことがあり、これらの配列は使用される宿主細胞に従い選択される。

【0128】従って、例えば適切な分泌シグナルが前記組換えベクターに組み込まれることがあり、その結果、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、小胞体の内腔に向かって、細胞膜周辺腔に向かって、膜上に、又は細胞外環境に向かって、方向づけられるであろう。

【0129】本発明はまた、本発明に従う組換えベクターを含んで成る宿主細胞に関する。

【0130】宿主細胞内への組換えベクターの導入は、当業者にとって周知な方法、例えばBASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 1986及びMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989 に記載のもの、例えばリン酸カルシウムによるトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン性脂質によるトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入又は感染、に従い実施され得る。

【0131】前記宿主細胞は、細菌細胞、例えばストレプトコッカス(Streptococci)、スタフィロコッカス(Staphylococci)、E. コリ(Coli)又はバチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)の細胞、真菌の細胞、例えば酵母細胞及びアスペルギルス(Aspergillus)、ストレプトマイセス(Streptomyces)の細胞、昆虫細胞、例えばショウジョウバエS2及びスポドプテラ(Spodoptera) Sf9の細胞、動物細胞、例えばCHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293細胞及び処置すべき対象のヒト細胞であっても、又は植物細胞でもよい。

【0132】前記宿主細胞は、例えば後文で明らかとなる様に、本発明のポリペプチドを発現させるために、又は医薬組成物中の活性産物として使用され得る。

#### 【0133】ポリペプチド

本発明はまた、a) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24~188位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列であって、a)及びb)におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものと、少なくとも80%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、更に好ましくは少なくとも95%の同一性、そしてより更に好ましくは少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んで成る単離されたポリペプチドに関する。

【0134】本発明のポリペプチドはまた、a) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24~188位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a)及びb)におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるもの、を含んで成ることがある。

【0135】本発明のポリペプチドは、更に具体的にはa) 配列番号2のアミノ酸配列、又はb) 配列番号2のアミノ酸配列の24~188位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列であって、a)及びb)におけるアミノ酸配列のうちのそれぞれが、以下のコードSNP: A6D, M171Iのうちの少なくとも1つを含むと理解されるものから成ることもある。

【0136】好ましくは、本発明に従うポリペプチドは、A6D及びM171Iから成る群から選択される単一のコードSNPを含む。

【0137】本発明はまた、その目的のために上述のポリペプチドの調製方法を有し、ここで、既に定義した宿主細胞が培養液中で培養され、そして前記ポリペプチドが当該培養液から単離される。

【0138】前記ポリペプチドは、当業者にとって周知な方法、例えばカオトロピック剤、例えば塩、特に硫酸アンモニウム、エタノール、アセトン又はトリクロロ酢酸による沈澱、酸抽出；イオン交換クロマトグラフィー；ホスホセルロースクロマトグラフィー；疎水性相互作用クロマトグラフィー；親和性クロマトグラフィー；ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー又は排除クロマトグラフィーに従い、宿主細胞の培養液から出発して精製され得る。

【0139】「培養液」とは、本発明のポリペプチドが単離され、又は精製される培地であると理解される。この培地は細胞外培地及び/又は細胞溶解物から構成され得る。当業者にとって周知な技術も、前記ポリペプチドの高次構造が単離又は精製の間に変化する場合に、後者

のものが前記ポリペプチドの活性高次構造を生むことを可能にする。

#### 【0140】抗体

本発明はまた、免疫特異的抗体を得るための方法に関する。

【0141】「抗体」とは、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、一本鎖及び/又はヒト化抗体並びにFabフラグメント、例えばFab又は免疫グロブリン発現ライブラリー産物であると理解される。

【0142】免疫特異的抗体は、本発明に従うポリペプチドによる動物の免疫化によって得ることができる。

【0143】本発明はまた、本発明に従うポリペプチド、例えば上文で定義したもののための免疫特異的抗体に関する。

【0144】本発明に従うポリペプチド、そのフラグメントの1つ、類似体、その変異体の1つ又はこのポリペプチドを発現している細胞も、免疫特異的抗体を産生するために使用され得る。

【0145】用語「免疫特異的」とは、抗体が、当業界で知られている他のポリペプチドよりも本発明のポリペプチドに対してより良い親和性を有することを意味する。

【0146】免疫特異的抗体は、本発明のポリペプチド、そのフラグメントの1つ、類似体又はエピトープフラグメント又はこのポリペプチドを発現している細胞を、哺乳類、好ましくはヒト以外に、当業者にとって周知な方法に従い投与することによって得ることができる。

【0147】モノクローナル抗体の調製に関して、抗体産生のための典型的な方法、例えばハイブリドーマ技術(Kohler et al., Nature (1975) 256: 495-497)、トリオーマ技術、ヒトのB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4: 72)及びEBVハイブリドーマ技術(Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, 1985)が、細胞系から出発して使用され得る。

【0148】単鎖抗体の産生の技術、例えば米国特許第4,946,778号に記載のものも使用され得る。

【0149】トランスジェニック動物、例えばマウスも、ヒト化抗体を産生するのに使用され得る。

【0150】本発明のポリペプチドと相互作用する物質  
本発明はまた、その目的のために、本発明に従うポリペプチドを活性化し、又は阻害する物質の同定のための方法であって、

- a) 少なくとも1つのコードSNPを含む、本発明に従うポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、
- b) a)に従う組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、
- c) b)に従う宿主細胞と試験され得る物質との接触、

及び

d) 試験され得る物質によって生成する活性又は阻害作用の決定、

を含んで成る方法を有する。

【0151】本発明に従うポリペプチドはまた、それと相互作用する化合物をスクリーニングするために適用され得る。

【0152】これらの化合物は、本発明に従うポリペプチドの固有の活性を活性化する(アゴニスト)又は阻害する(アンタゴニスト)物質であってもよい。これらの化合物はまた、本発明のポリペプチドのリガンド又は基質であってもよい。Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991)を参照のこと。

【0153】通常、その様な方法を実行するために、最初に本発明に従うポリペプチドを発現する適切な宿主細胞を生成することが望ましい。その様な細胞は、例えば哺乳類、酵母、昆虫、例えばショウジョウバエ又は細菌、例えばE.コリの細胞であってもよい。

【0154】これらの細胞又はこれらの細胞の膜抽出物が、続いて試験され得る化合物の存在下に据えられる。

【0155】本発明のポリペプチドとの、試験され得る化合物の結合能、並びに機能的応答の阻害又は活性化が続いて観察され得る。

【0156】上述の方法の段階d)は、直接又は間接的に標識される、試験され得る物質を用いることによって実行され得る。それはまた、標識又は非標識物質及び標識競合物質を用いることによる競合試験を含むことがある。

【0157】試験され得る化合物が、検出され得るシグナルに従い適切に選択された検出手段を用いることによって、本発明のポリペプチドを発現する細胞上で活性又は阻害シグナルを生じるか否かも決定され得る。

【0158】その様な活性又は阻害物質はポリヌクレオチドであってもよく、そしてある場合にはオリゴヌクレオチド又はポリペプチド、例えばタンパク質又は抗体であってもよい。

【0159】本発明はまた、本発明に従うポリペプチドによって活性化され又は阻害される物質の同定方法であって、

- a) 少なくとも1つのコードSNPを含む、本発明に従うポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターの調製、
  - b) a)に従う組換えベクターを含んで成る宿主細胞の調製、
  - c) 試験され得る物質の存在下に、b)に従う宿主細胞を据えること、
  - d) 試験され得る物質に対する、前記ポリペプチドによって生じる活性又は阻害作用の決定、
- を含んで成る方法に関する。

【0160】本発明のポリペプチドによって活性化され、又は阻害される物質は、それぞれ、このポリペプチドの存在下での活性化又は阻害によって応答する物質である。本発明のポリペプチドによって直接又は間接的に活性化され又は阻害される物質は、例えば膜結合型又は核受容体、キナーゼ及び更に好ましくはチロシンキナーゼ、転写因子又はポリヌクレオチドから成ることもある。

#### 【0161】病気の検出

本発明はまた、目的のために、対象者において、本発明に記載のポリヌクレオチド及び/又は本発明に記載のポリペプチドの生物学的特性を解析するための方法であって、以下の、

a) 対象者のゲノムにおいて、本発明に従うポリヌクレオチドの存在又は非存在を決定し、  
b) 対象者において、本発明に従うポリヌクレオチドの発現レベルを決定し、  
c) 対象者において、本発明に従うポリペプチドの存在又は非存在を決定し、  
d) 対象者において、本発明に従うポリペプチドの濃度を決定し、

e) 対象者において、本発明に従うポリペプチドの機能性を決定すること、

のうちの少なくとも1つを含んで成る方法を有する。

【0162】これらの生物学的特性は、対象者において、又は対象者由来の試料において解析され得る。

【0163】これらの生物学的特性は、遺伝子診断を実施し、そして対象者が本発明に従うポリヌクレオチド及び/又は本発明に従うポリペプチドの存在と関連している病気、軽い病気又は障害の発生に対して影響を受けているか、又は影響を受ける危険性があるか、又は反対に、それに対する部分的な耐性があるか否かを決定することを可能にし得る。

【0164】これらの病気は障害及び/又はヒトの病気、例えば：

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、

- 創傷治癒、
- 化学療法と関連している疾患、
- 透析されている患者の貧血、
- 骨粗鬆症、
- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに

- 性病、例えば生殖器のイボ、であってもよい。

【0165】この方法はまた、対象者において、本発明に従うSNPによってコードされる変異対立遺伝子の存在と関連している病気又は病気に対する耐性の遺伝子診断を可能にする。

【0166】好ましくは、段階a)において、既に定義した様な、少なくとも1つのコードSNPを含むポリヌクレオチドの存在又は不在が検出され得る。

【0167】ポリヌクレオチドの検出は、研究され得る対象者由来の生物学的試料、例えば細胞、血液、尿、唾液から出発して、あるいは研究され得る対象者の生検又は部検から出発して実施され得る。ゲノムDNAは、例えば直接的に又はPCR増幅後に使用され得る。RNA又はcDNAも同様に使用され得る。

【0168】この結果、本発明に従うポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、対象者のゲノムにおいて検出されるヌクレオチド配列と比較することが可能となる。

【0169】ヌクレオチド配列の比較は、配列決定によって、DNAハイブリダイゼーション法によって、変性剤を用いる、又は用いない、電気泳動ゲノム上でのDNAフラグメントの移動度の差異によって、あるいは融解温度の差異によって実施され得る。Myers et al., Science (1985) 230 : 1242 を参照のこと。ヌクレオチド配列の構造における正確な位置でのその様な修飾も、ヌクレアーゼ保護試験によって、例えばRNアーゼ及びS1ヌクレアーゼによって、又は更に化学開裂剤によって解明されることがある。Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 85 : 4397-4401 を参照のこと。本発明のポリヌクレオチドフラグメントを含んで成るオリゴヌクレオチドプローブはまた、スクリーニングを行うのにも使用され得る。

【0170】当業者にとって周知の多くの方法が、本発明のポリヌクレオチドの発現を決定し、そしてこのポリヌクレオチドの遺伝的変異性を同定するために使用され得る (Chee et al., Science (1996), vol.274, pp610-613 を参照のこと。)

【0171】段階b)において、ポリヌクレオチドの発現レベルは、当業者にとって周知な方法に従い、このポリヌクレオチドによってコードされる(そしてポリペプチドをコードする)RNAのレベルを定量することによって、例えばPCR、RT-PCR、RNアーゼ保護、ノーザンプロット、及び他のハイブリダイゼーション法によって、測定され得る。

【0172】段階c)及びd)において、対象者又は対

象者由来の試料における、本発明に従うポリペプチドの存在又は不在及び濃度が、周知の方法、例えば免疫放射アッセイ、競合的結合試験、ウェスタンブロット及び E L I S A 試験によって実施され得る。

【0173】段階 d) に続いて、本発明に従うポリペプチドの決定された濃度は、対象者において通常見出される天然野生型タンパク質の濃度と比較され得る。

【0174】当業者は、上文の様に起こる病気、軽い病気又は障害に対する感受性又は、反対に耐性が現れる、しきい値の上限又は下限を、従来技術の刊行物又は常用の試験若しくはアッセイ、例えば既に言及されているものの助けを借りて同定することができる。

【0175】段階 e) において、本発明に従うポリペプチドの機能の決定は、当業者にとって周知な方法によって、例えば *in vitro* での試験、例えば上文で言及したものによって、又は前記ポリペプチドを発現する宿主細胞の使用によって実施され得る。

#### 【0176】薬物及び病気の処置

本発明のポリペプチドは非常に興味深い薬理学的特性を有している。特に、それらはヒト I F N - 2 受容体と結合し得る。これらの特性は、ヒトの身体の治療的処置のための、すなわち薬物又は治療組成物としての本発明のポリペプチドの使用に従う。

【0177】この様に、本発明はまた、活性物質の目的で本発明に従うポリペプチドを含む薬物に関する。

【0178】本発明はまた、異なるヒトの障害及び/又は病気、例えば：

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
  - 心臓血管疾患、
  - 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
  - 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎並びに H I V / エイズ、及び感染性肺炎、
  - 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
  - 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、
  - 創傷治癒、
  - 化学療法と関連している疾患、
  - 透析されている患者の貧血、
  - 骨粗鬆症、
  - 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに
  - 性病、例えば生殖器のイボ、
- の予防又は処置を意図する薬物の製造のための、本発明

に従うポリペプチドの使用に関する。

【0179】本発明に従うポリペプチドを得ることを可能にする化合物及びこのポリペプチドによって得られ、又はこれから同定される化合物のいくつかは、同様にヒトの身体の治療的処置のために、すなわち薬物として使用され得る。

【0180】このことが、本発明が更に活性物質の目的で、少なくとも 1 つの既に定義されているコード S N P、既に定義されている組換えベクター、既に定義されている宿主細胞、及び/又は既に定義されている抗体を含む、本発明に従うポリヌクレオチドを含む薬物を目的とする理由である。

【0181】本発明はまた、異なるヒトの障害及び/又は病気、例えば：

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎並びに H I V / エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、
- 創傷治癒、
- 化学療法と関連している疾患、
- 透析されている患者の貧血、
- 骨粗鬆症、
- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに
- 性病、例えば生殖器のイボ、

の予防又は処置を意図する薬物の製造のための、少なくとも 1 つの既に定義されているコード S N P、既に定義されている組換えベクター、既に定義されている宿主細胞、及び/又は既に定義されている抗体を含む、本発明に従うポリヌクレオチドの使用に関する。

【0182】活性物質として有用な、本発明のポリペプチド及び他の化合物の用量は、化合物の選択、治療の兆候、投与形態、製剤の性質、対象者の性質及び医師の判断に依存する。

【0183】それを活性物質として使用する場合、本発明に従うポリペプチドは、通常 1 ~ 100  $\mu$ g / 対象者の kg に及ぶ用量で投与される。

【0184】本発明はまた、活性物質として、少なくとも 1 つの上記化合物、例えば本発明に従うポリペプチ

ド、少なくとも1つの既に定義されているSNPを含む本発明に従うポリヌクレオチド、既に定量されている組換えベクター、既に定義されている宿主細胞、及び/又は既に定義されている抗体、並びに医薬として許容される賦形剤を含む医薬組成物を目的として有する。

【0185】これらの医薬組成物において、前記活性物質は生理学的に有効な量で有利に存在する。

【0186】これらの医薬組成物は、例えば固体又は液体であってもよく、そしてヒトの薬物において現在使用されている医薬形態で、例えば単純な又はコートされた錠剤、ゲルキャップ、顆粒、キャラメル、座剤並びに好ましくは注射用調製物及び注射用調製物のための粉末で存在していてもよい。これらの医薬の形態は有用な方法に従い調製され得る。

【0187】前記活性物質は、医薬組成物において通常適用される賦形剤、例えばタルク、アラビアゴム、ラクトース、デンプン、デキストロース、グリセロール、エタノール、ステアリン酸マグネシウム、カカオバター、水性又は非水性担体、動物又は植物起源の脂肪物質、パラフィン誘導體、グリコール、種々の湿潤剤、分散剤又は乳化剤、防腐剤に組み込まれることもある。

【0188】本発明に従う活性物質は、単独で、又は他の化合物、例えば治療化合物、例えば他のインターフェロン - 若しくは他のサイトカイン、例えばインターロイキンと組み合わせで適用され得る。

【0189】前記医薬組成物の異なる製剤は、投与の形態に従い適合される。

【0190】前記医薬組成物は、当業者にとって既知の異なる投与経路によって投与され得る。

【0191】本発明はまた、活性物質として少なくとも1つの上記化合物、例えば本発明に従うポリペプチド、本発明に従うポリヌクレオチドの全部又は一部、既に定義した組換えベクター、既に定義した宿主細胞、及び/又は既に定義した抗体、並びに医薬として許容される賦形剤を含む診断組成物を目的のために有する。

【0192】この診断組成物は、例えば適当な賦形剤、例えば診断組成物において一般に使用されているもの、例えば緩衝液及び防腐剤を含むことがある。

【0193】本発明はまた、

- a) 治療として有効な量の本発明に従うポリペプチド、
- b) 本発明に従うポリヌクレオチド、及び/又は
- c) 既に定義されている、処置され得る対象者由来の宿主細胞の、

対象者における、本発明に従うポリペプチドの発現又は活性を増大せしめることを意図する薬物の調製のための使用を目的として有する。

【0194】この様に、本発明のポリペプチドの発現又は活性の増大を必要とする対象者を処置するために、複数の方法が可能である。

【0195】前記対象者に、治療として有効な量の本発

明に従うポリペプチドを、医薬として許容される賦形剤と一緒に投与することは可能である。

【0196】同様に、前記対象者に対する、本発明に従うポリヌクレオチドの投与によって、本発明のポリペプチドの内因性の産生を増大せしめることが可能である。例えば、そのポリヌクレオチドはレトロウイルス発現ベクター内に挿入され得る。その様なベクターは、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターに感染した細胞から出発して、形質導入された細胞が注目の遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する様な方法で単離され得る。GeneTherapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) を参照のこと。

【0197】本発明に従い、少なくとも1つのコードSNP、例えば既に定義されているものを含むポリヌクレオチドが好ましくは使用される。

【0198】更に、対象者に対して、本人に属する宿主細胞であって、既に記載した様に本発明のポリペプチドを発現する様にあらかじめ採取され、そして修飾された宿主細胞を投与することが可能である。

【0199】本発明はまた、

- a) 治療として有効な量の、既に定義されている免疫特異的抗体、及び/又は
  - b) 本発明に従うポリヌクレオチドの発現の阻害を可能にするポリヌクレオチドの、
- 対象者における、本発明に従うポリペプチドの発現又は活性を低下せしめることを意図する薬物の調製のための使用に関する。

【0200】この様に、前記対象者に対して、治療として有効な量の阻害剤及び/又は抗体、例えば既に定義されているものを、好ましくは医薬として許容される賦形剤と組み合わせで投与することが可能である。

【0201】また、前記対象者に対して、本発明のポリヌクレオチドの発現の阻害を可能にする、本発明に従う相補的なポリヌクレオチドの投与によって、本発明のポリペプチドの内因性の産生を減少させることも可能である。

【0202】好ましくは、少なくとも1つのコードSNP、例えば既に定義されているものを含む相補ポリヌクレオチドが使用され得る。

【0203】本発明はまた、以下のSNP: 96-100 del(aattt), t110c, 139-144 del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047tのうちの一つを含んで成るヌクレオチド配列、配列番号1と、少なくとも95%の同一性(好ましくは97%の同一性、更に好ましくは99%の同一性及び特に100%の同一性)を有する、患者のゲノムにおけるヌクレオチ

ド配列の存在と関連している I F N - 2 変異体によって生じる障害又は病気を有する前記患者の予防又は処置のための薬物の調製のための I F N - 2 タンパク質の使用に関する。

【0204】好ましくは、前記薬物は、

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
  - 心臓血管疾患、
  - 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
  - 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎並びに H I V / エイズ、及び感染性肺炎、
  - 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
  - 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、
  - 創傷治癒、
  - 化学療法と関連している疾患、
  - 透析されている患者の貧血、
  - 骨粗鬆症、
  - 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、並びに
  - 性病、例えば生殖器のイボ、
- から成る群から選択される病気の一つの予防又は処置に使用される。

【0205】SNP M171Iを含んで成る I F N - 2 ポリペプチドの模倣化合物

本発明はまた、M171I I F N - 2 遺伝子産物のものと比較して実質的に類似又はそれ以下の生物活性を有する新規化合物に関する。

【0206】M171I 変異型 I F N - 2 遺伝子産物は、

- a) アミノ酸配列である配列番号 2、又は
- b) アミノ酸配列である配列番号 2 の 24 ~ 188 位に含まれるアミノ酸配列を含んで成るアミノ酸配列であって、a) 及び b) における前記アミノ酸配列が M171I SNP を含んで成るもの、のポリペプチドに対応する。

【0207】前記生物活性は、下文の実験の項目に記載のルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて、D a u d i B u r k i t t 細胞系上での細胞性抗増殖活性の測定又は M C F 7 細胞上でのシグナル伝達アッセイによって評価され得る。

【0208】実験の項目で述べる様に、M171I 変異型 I F N - 2 は、D a u d i B u r k i t t 細胞系上で、天然野生型 I F N - 2 のものより低い細胞抗増

殖活性を有する。

【0209】実験の項目で述べる様に、M171I 変異型 I F N - 2 の存在下で測定される乳ガン細胞系 M C F - 7 におけるシグナル伝達の活性化は、天然野生型 I F N - 2 で測定されるものより低い。

【0210】本発明の新規化合物、例えば既に定義されているものは、M171I 変異型 I F N - 2 のものと実質的に類似の、すなわち天然野生型 I F N - 2 のものより低い生物活性を有することがある。

【0211】前記化合物はまた、M171I 変異型 I F N - 2 のものより更に低い生物活性を有することもある。

【0212】前記化合物は、生化学化合物、例えばポリペプチド又はペプチド、あるいは有機化学化合物、例えば合成ペプチド模倣物であってもよい。

【0213】本発明はまた、D a u d i B u r k i t t 細胞系上で、天然野生型 I F N - 2 のものより少なくとも 15 倍低い細胞抗増殖活性を有する新規化合物を提供する。

【0214】本発明はまた、M C F 7 細胞上で、天然野生型 I F N - 2 のものより少なくとも 10 倍低いシグナル伝達能を有する新規化合物を提供する。

【0215】本発明はまた、上文で定義した様な化合物の同定のための、M171I SNP を含む本発明のポリペプチドの使用に関する。

【0216】本発明は、以下の段階：

- a) 生物活性、例えば D a u d i B u r k i t t 細胞系上での細胞の抗増殖活性又はシグナル伝達能を決定し、
- b) 試験され得る化合物の、段階 a) で決定した活性を、M171I 変異型 I F N - 2 の遺伝子産物の活性と比較し、そして
- c) 段階 b) で実施した比較に基づき、試験され得る化合物が、M171I 変異型 I F N - 2 の遺伝子産物のものと比較して実質的に類似又はそれより低い活性を有するか否かを決定すること、を含んで成る、本発明の化合物の同定方法に関する。

【0217】好ましくは、試験され得る化合物は、合成ペプチドコンビナトリアルライブラリー、高処理量スクリーニングから既に同定され、又はコンピューターを使ったドラッグデザインによって設計された結果、M171I 変異型 I F N - 2 遺伝子産物のものと同じの三次元構造及び/又は化学作用を有することがある。化合物を同定し、そして設計するための方法は、当業者に周知である。

【0218】これらの方法を引用している刊行物は、例えば：

- Silverman R.B. (1992). "Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action". Academic Press, 1st edition (January 15, 1992).

- Anderson S and Chiplin J. (2002). "Structural genomics ; shaping the future of drug design? Drug Discov. Today. 7 (2) : 105-107.
- Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH. (2002). "The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery". Drug Discov. Today. 7 (2) : 109-116.
- Burbidge R, Trotter M, Buxton B, Holden S. (2001). "Drug design by machine learning : support vector machines for pharmaceutical data analysis". Comput. Chem. 26 (1) : 5-14.
- Kauvar L.M. (1996). "Peptide mimetic drugs : a comment on progress and prospects" 14 (6) : 709、であってもよい。

【0219】本発明の化合物は、

- ガン及び腫瘍、例えばガン腫、例えば転移型腎ガン、黒色腫、リンパ腫、例えば濾胞性リンパ腫、白血病、例えば白血性白血病及び慢性骨髄性白血病、肝臓、首、頭及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド性腫瘍及び免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合カポジ肉腫、
- 心臓血管疾患、
- 代謝病、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、
- 感染症、例えばウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズ、及び感染性肺炎、
- 中枢神経系の病気、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、精神分裂病及びうつ病、
- 免疫及び自己免疫関連性疾患、例えば組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬及びリウマチ様関節炎、
- 創傷治癒、
- 化学療法と関連している疾患、
- 透析されている患者の貧血、
- 骨粗鬆症、
- 胃腸の障害、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、

並びに

- 性病、例えば生殖器のイボ、
- から成る群から選択される病気のうちの1つの予防又は処置を意図する薬物の調製のために使用され得る。

【0220】実験の項目

例1 : g1023aのSNPを含むヌクレオチド配列のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質及び参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のモデリング

最初の段階において、IFN-2の三次元構造は、ソフトウェアModeler (MSI, San Diego, CA)を用いてPDBデータベース(コード1ITF)において利用可能な構造を有するヒトIFN-2のものから出発して構築した。

【0221】続いて成熟したポリペプチドフラグメント

が、突然変異M148Iを再生成する様な方法で修飾される。

【0222】1000回の分子最小化段階が、プログラムAMBER及びDISCOVER (MSI : Molecular Simulations Inc. )を用いることによってこの変異型フラグメント上で行われた。

【0223】次に、2回の分子力学計算の実行が同じプログラム及び同じ力場で行われた。

【0224】それぞれの場合において、50,000回の段階が300°Kで計算され、300回の平衡段階によって終了した。

【0225】このモデリングの結果を図1及び2に表す。

【0226】例2 : c527a SNPを含むヌクレオチド配列のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質及び参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のアドレッシングの予測

c527aの多型性は未成熟IFN-2タンパク質のレベルでA6Dの多型性に関与する。この位置は、未成熟タンパク質の最初の23アミノ酸を含んで成るシグナルペプチド上に位置している。当該シグナルペプチドは、タンパク質のアドレッシング及び成熟タンパク質が発現する細胞内又は細胞外区画を制御する。

【0227】PSORTは、未成熟タンパク質のアミノ酸配列を解析し、そして成熟タンパク質が局在するであろう区画を予測するパブリックドメインソフトウェアである(Nakai K and Kanehisa M (1992). A Knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. Genomics 14, 897-911)。

【0228】PSORTは、A6Dの多型が細胞レベルでのIFN-2の局在を変化させることを予測している。事実、それは野生型成熟IFN-2タンパク質が分泌され、細胞外に局在化され、一方、D6変異型IFN-2は核及び/又はミトコンドリア画分内に存在し得ることを予測している。

【0229】IFN-2のA6D変異体が、野生型タンパク質と比較してその構造及び機能において恐らく影響を受けないとしても、その活性は通常見出されるほどではないであろう。

【0230】例3 : ポリヌクレオチド配列である配列番号1における欠失、139-144del(acctta)によって生じるIFN-2発現の変化の予測

推定される結合部位に対する139-144del(acctta)の効果は、Match(Transfec)の実施後に評価された。この欠失は全てのインターフェロンに共通の制御領域内に位置していないが、それは転写因子のための3つの推定される結合部位を削除する :

- Msx-1についての推定される結合部位は、野生型の参照配列番号である配列番号1上のヌクレオチド1

34~142を包含する。この結合部位に対するこの欠失の効果は、この転写因子がよく理解されておらず、そしてその機能が手足の形成に関連していることが提案されているが、はっきりと同定されていないため、相応に推定され得る (Hwang et al. (1998). Am. J. Med. Genet. 75 :419-423)。

- Oct-1についての推定される結合部位は、野生型参照配列番号である、配列番号1上のヌクレオチド141~163を包含する。この結合部位は転写開始部位の約400ヌクレオチド上流に位置するが、その欠失は、この部位を認識する転写因子がT及びBリンパ球における転写開始の異なる機構に関与するので、重要な効果を有すると思われる (Ullman et al. (1991). Science. 254 : 558-562 ; Kemler et al. (1989). EMBO J. 8 : 2001-2008 ; Kamps et al. (1990). Mol Cell Biol. 10 : 5464-5472)。

- Hoxa3についての推定される結合部位は、野生型の参照配列番号である、配列番号1上のヌクレオチド143~151を包含する。Hoxa3は、胸腺の形成を促進する、胎児の胸腺上皮細胞の制御に関与する転写因子である (Suet al. (2001). Dev. Biol. 236 : 316-329)。

【0231】この結果、139-144del(acctta)SNPはIFN-2の発現の正常な制御に影響を及ぼし得る。

【0232】例4：個体群におけるSNP t110c, t338a, t363c, c427t, c527a及びg1023aの遺伝子型判定

SNPの遺伝子型判定は、生成物が偏光した蛍光を読み込むことによって検出される、ミニ配列決定の原理に基づいている。当該技術は蛍光ミニ配列決定 (FP-TDI技術又はFluorescence Polarization Template-directed Dye-Terminator Incorporation) から成る。

【0233】ミニ配列決定は、前記群の各個体のゲノムDNAからPCRによって増幅された生成物で行われ

る。PCR生成物は、それが遺伝子型判定され得るSNPを含む遺伝子領域を覆う様な方法で選択される。使用されなかったPCRプライマー及び組み込まれなかったdNTPの排除後、ミニ配列決定は行われる。

【0234】ミニ配列決定は、ポリメラーゼ酵素及び蛍光標識したジデオキシヌクレオチドを用いることによって、SNPの部位のすぐ上流に配置されたポリヌクレオチドプライマーを伸長することから成る。この伸長過程から生じた生成物は、偏光した蛍光を読み込むことによって直接解析される。

【0235】全てのこれらの段階、及び読み込みが同一のPCRプレートにおいて行われる。

【0236】この様に、遺伝子型判定は5つの段階：

- 1) PCRによる増幅
- 2) 酵素消化によるPCR生成物の精製
- 3) オリゴヌクレオチドプライマーの伸長
- 4) 偏光した蛍光の読み込み
- 5) 読み込みの解釈

を必要とする。

【0237】遺伝子型判定の段階1及び2は、一方ではSNP t110c, t338a, t363c及びc427tのそれぞれ、そして他方ではSNP c527a、及びg1023aのそれぞれについて、同一の条件で行われる。

【0238】段階3, 4及び5は、これらの多型のそれぞれ1つに特異的である。

【0239】1) IFN-2遺伝子のヌクレオチド配列のPCR増幅は、民族的に異なる起源の268人の個体に由来するゲノムDNAから出発して行われる。

【0240】これらのゲノムDNAは、米国のCoriell Instituteによって提供された。

【0241】268人の個体は以下の様に分布される：

【表1】

系統群	特異的民族群	合計	%
アフリカ系アメリカ人	アフリカ系アメリカ人	50	100.0
	小計	50	18.7
アメリカインディアン	南アメリカアンデス	10	66.7
	南西アメリカインディアン	5	33.3
	小計	15	5.6
カリブ人	カリブ人	10	100.0
	小計	10	3.7
ヨーロッパ系コーカソイド	北アメリカカフカス人	79	79.8
	イベリア人	10	10.1
	イタリア人	10	10.1
	小計	99	36.9
メキシコ人	メキシコ人	10	100.0
	小計	10	3.7
北東アジア人	中国人	10	50.0
	日本人	10	50.0
	小計	20	7.5
非ヨーロッパ系コーカソイド	ギリシア人	8	21.6
	インドーパキスタン人	9	24.3
	中東の人	20	54.1
	小計	37	13.8
東南アジア人	太平洋諸島の人	7	41.2
	南アジア人	10	58.8
	小計	17	6.3
南アメリカ人	南アメリカ人	10	100.0
	小計	10	3.7
合計		268	100

【0242】これらの個体のそれぞれ1つに由来するゲノムDNAが試料を構成する。

【0243】SNP t110c, t338a, t363c及びc427tの場合、PCR増幅は、以下のプライマーから出発して行われる。

センスプライマー：GCCTCTATGTACCCACAAA

アンチセンスプライマー：CACCAGTAAAGCAAAGGTCA

【0244】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1の、ヌクレオチド3～ヌクレオチド537の、535ヌクレオチドの長さのフラグメントの増幅を可能にする。

【0245】SNP c527a、及びg1023aの場合、PCR増幅は、以下のプライマーから出発して行われる。

センスプライマー：CACCCATTTCAACCAGTCTA

アンチセンスプライマー：AGCTGGCATACGAATCAAT

【0246】これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列である配列番号1の、ヌクレオチド470～ヌクレオチド1124の、655ヌクレオチドの長さのフラグメントの増幅を可能にする。

【0247】それぞれのSNPの場合、PCR生成物はミニ配列決定のための鋳型を務めるであろう。

【0248】当該PCR反応の合計の反応液量は各試料当たり5μlである。

【0249】この反応液量は、以下の表に示す試薬から構成される：

【表2】

業者	参考	反応剤	初濃度	管当たりの体積 ( $\mu$ l)	終濃度
Life Technology	Taqによって配達	緩衝液(X)	10	0.5	1
Life Technology	Taqによって配達	MgSO <sub>4</sub> (mM)	50	0.2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs(mM)	10	0.1	0.2
	請求次第	センスプライマー( $\mu$ M)	10	0.1	0.2
	請求次第	アンチセンスプライマー( $\mu$ M)	10	0.1	0.2
Life Technology	11304-029	Taq白金	5U/ $\mu$ l	0.02	0.1U/反応
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	1.98	
		DNA(試料)	2.5ng/ $\mu$ l	2	5ng/反応
		合計量		5 $\mu$ l	

【0250】これらの試薬は、AB Geneによって供給される、384個のウェルを有するブラックPCRプレート(参照:TF-0384-K)に配分される。当該プレートはシーリングされ、遠心され、続いて384ウェルプレート用のサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)内に据えられ、そして以下のインキュベーションを受ける:PCRサイクル:94で1分、これに3段階(94で15秒、56で30秒、68で1分)から成る36サイクルが続く。

【0251】2)PCR増幅生成物は、続いて2つの酵素:シュリンブアルカリホスファターゼ(SAP)及びエキソヌクレアーゼI(ExoI)を用いて精製され\*

\*。これらの最初の酵素は、PCR増幅の間に組み込まれなかったdNTPの脱リン酸化を可能にし、一方、2番目のものは一本鎖DNA残基、特にPCRの間に使用されなかったプライマーを除去する。

【0252】この消化は、PCRプレートの各ウェルにおける、試料当たり5 $\mu$ lの反応混合物の添加によって行われる。

【0253】この反応混合物は以下の試薬から構成される:

【表3】

業者	参考	反応剤	初濃度	管当たりの体積 ( $\mu$ l)	終濃度
AP Biotech	E70092X	SAP	1U/ $\mu$ l	0.5	0.5/反応
AP Biotech	070073Z	ExoI	10U/ $\mu$ l	0.1	1/反応
AP Biotech	SAPによって供給される	緩衝液SAP(X)	10	0.5	1
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	3.9	
		PCR生成物		5 $\mu$ l	
		合計量		10 $\mu$ l	

【0254】充填したら、プレートをシーリングし、遠心し、続いて384ウェルプレート用のサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)内に据え、そして以下のインキュベーションを受ける:SAP

-EXO消化:37で45分、80で15分。

【0255】続いて、伸長又はミニ配列決定段階が、調製した試料当たり5 $\mu$ lの反応混合物の添加によって消化されたPCR生成物で行われる。

【0256】ミニ配列決定3)及び読み込み段階4)及び読み込みの解釈5)は、それぞれのSNP t110c, t338a, t363c, c427t, c527a、及びg1023aに特異的である。

【0257】全てのこれらの段階は、これらの多型のうちのそれぞれ1つに使用される具体的な条件をまとめて後文に記載する。

【0258】3)ミニ配列決定  
遺伝子型判定に必要な2つのミニ配列決定プライマーの配列は、本発明に従うSNPの部位の上流に位置するヌ\*

\*クレオチドの配列に対応する方法で判定した。SNPを含むPCR生成物が二本鎖DNA生成物であるので、遺伝子型判定はセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれかで行われ得る。選択したプライマーはLifeTechnologies Inc.によって製造される。

【0259】次の表は、各SNPについての、試験したミニ配列決定プライマーの配列及び遺伝子型判定のために保持される最適条件を示す。

【表4】

SNP	試験したプライマー	遺伝子型判定のために保持される最適条件
t110c	センスプライマー: taatttaatttttaattggt アンチセンスプライマー: tctttttgctttctttatac	アンチセンスプライマー+ ddATP-R110+ddGTP-Tamra
t338a	センスプライマー: ctgaaaaccatgtaaagag アンチセンスプライマー: tctttttgctttctttatac	センスプライマー+ dTTP-R110+ddATP-Tamra
t363c	センスプライマー: aaagaaagcaaaaagagaag アンチセンスプライマー: atgccctgtgttactttct	センスプライマー+ ddTTP-R110+ddCTP-Tamra
c427t	センスプライマー: tccctatttaagctaggca アンチセンスプライマー: ttctctgaagaccttgcttt	センスプライマー+ ddTTP-R110+ddCTP-Tamra
c527a	センスプライマー: tacaatggccttgaccttg アンチセンスプライマー: ccaggaggccaccagtaaa	アンチセンスプライマー+ ddGTP-R110+ddTTP-Tamra
g1023a	センスプライマー: gttgtcagagcagaaatcat アンチセンスプライマー: gttgacaaagaaaagatct	センスプライマー+ ddATP-R110+ddGTP-Tamra

【0260】SNPのミニ配列決定は、最初に16個の試料に及んで確認され、続いて268人の個体及び10人のコントロールから構成される個体群の集合に及んで遺伝子型判定された。

【0261】次に、伸長又はミニ配列決定段階が次の表に示す様に行われる。

【表5】

業者	参考	反応剤	初濃度	管当たりの体積 ( $\mu$ l)	終濃度
自己調製		伸長緩衝液 <sup>1</sup> (X)	5	1	1
Life Technologies	請求次第	Miniseq Primer ( $\mu$ M) A又はB	10	0.5	1
AP Biotech	27-2051 (61, 71, 81)-01	ddNTPs <sup>2</sup> ( $\mu$ M) 2つは標識 されない	それぞれ 2.5	0.25	それぞれ 0.125
NEN	NeI 472/5 及び NeI 492/5	ddNTPs <sup>2</sup> ( $\mu$ M) 2つが <sup>3</sup> Tamra 及びR110で 標識される	それぞれ 2.5	0.25	それぞれ 0.125
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequen ase	3.2U/ $\mu$ l	0.125	0.4U/反応
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	3.125	
		消化したPCR 生成物		10	
		合計量		15	

<sup>1</sup> 5×伸長緩衝液は、250mM Tris-HCl pH 9, 250mM KCl, 25mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> 及び40%グリセロールから構成される。

<sup>2</sup> ddNTP: ddNTPに関して、4塩基の混合物が研究される多型に従い実施される。SNPを構成する注目の2塩基(野生型ヌクレオチド/変異型ヌクレオチド)のみが、例えばTamra又はR110のいずれかで標識される。

<sup>3</sup> SNP c527aの場合、ddNTPの混合物は:

- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddATP、
- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddCTP、
- 2.5 $\mu$ MのddTTP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddTTP及び0.625 $\mu$ MのTamra標識型ddTTP)、
- 2.5 $\mu$ MのddGTP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddGTP及び0.625 $\mu$ MのR110標識ddGTP)、

から構成される。

SNP g1023aの場合、ddNTPの混合物は:

- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddCTP、
- 2.5 $\mu$ Mの非標識ddTTP、
- 2.5 $\mu$ MのddGTP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddGTP及び0.625 $\mu$ MのTamra標識型ddGTP)、
- 2.5 $\mu$ MのddATP(1.875 $\mu$ Mの非標識ddATP及び0.625 $\mu$ MのR110標識型ddATP)、

P)、

から構成される。

【0262】充填したら、プレートはシーリングされ、遠心され、続いて384ウェルプレート用のサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)に据えられ、そして次のインキュベーションを受ける: 伸長サイクル: 93 で1分、これに2段階(93 で10秒、55 で30秒)から構成される35サイクルを続ける。

【0263】サーモサイクラーにおける最後の段階の後、LJL Biosystems Inc. のAralyst(商標)型の、偏光型蛍光リーダー上にプレートを直接据える。プレートは、2つの方法を用いるCriterion Host(商標)のソフトウェアを使用して読み込む。最初のもは、このフルオロフォアに特異的な発光及び励起フィルターを用いることによって、Tamra標識型塩基の読み込みを可能にし(発光550~10nm、励起580~10nm)、そして2番目のものは、このフルオロフォアに特異的な発光及び励起フィルターを用いることによって、R110標識型塩基の読み込みを可能にする(発光490~10nm、励起520~10nm)。両者の場合において、二色性二重ミラー(dichroic double mirror)(R110/Tamra)が使用され、そして他の読み込みパラメーターは: Zの高さ: 1.5mm

アテニューエーター: アウト

インテグレーションタイム：100,000マイクロ秒  
生データユニット：カウント/秒

スイッチ偏光：ウェルごと

プレート設定時間：0ミリ秒

PMT設定：Smart Read (+)、感度2

動的偏光子：発光

静的偏光子：S

である。

【0264】ファイルの結果は、この様にTamraフィルターの場合のmP（ミリ偏光）の計算値及びR110フィルターの場合のものを含めて得られる。これらのmP値は、以下の式に従い、平行な面（//）及び垂直な面（⊥）に対して得られる強度から出発して計算される：

$$MP = 1000 \left( \frac{I_{//} - g}{I_{//} + g} \right)$$

【0265】この計算において、値  $g$  は係数  $g$  によって加重される。それは実験的にあらかじめ決定されなければならない機械的な係数である。

【0266】4) 及び5) 読み込みの解釈及び遺伝子型の決定

mP値は、Microsoft Inc.のExcel、及び/又はLJL Biosystems Inc.によって開発されたAllele Caller（商標）を用いてグラフ上に記された。

【0267】横軸上にはTamra標識型塩基のmP値を示し、縦軸上にはR110標識型塩基のmP値を示す。強力なmP値は、このフルオロフォアで標識した塩基が組み込まれたことを示し、そして反対に弱いmP値は、この塩基の不在を明らかにしている。

【0268】異なる遺伝子型を有するヌクレオチド配列の、最大3つの同種の群が得られる。

【0269】Allele Caller（商標）のソフトウェアの使用は、一度異なる群の同定が行われると、表の書式において各個体について定義されている遺伝子型の直接的な抽出を可能にする。

【0270】SNP t110c, t338a, t363c, c427t, c527a, 及びg1023aに関するミニ配列決定の結果

遺伝子型判定の過程の完了後、本明細書で研究したSN

Pについての、個体群のうちの個体の遺伝子型の決定は、上述したグラフを用いて行われる。

【0271】SNP t110cの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体TT、又はヘテロ接合体TC、又はホモ接合体CCのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型CCは個体群において検出されていない。

【0272】SNP t338aの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体においてホモ接合体TT、又はヘテロ接合体TA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型AAは個体群において検出されていない。

【0273】SNP t363cの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体TT、又はヘテロ接合体TC、又はホモ接合体CCのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型CCは個体群において検出されていない。

【0274】SNP c427tの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体CC、又はヘテロ接合体CT、又はホモ接合体TTのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型TTは個体群において検出されていない。

【0275】SNP c527aの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体においてホモ接合体CC、又はヘテロ接合体CA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型AAは個体群において検出されていない。

【0276】SNP g1023aの場合、遺伝子型は、理論的には試験した個体において、ホモ接合体GG、又はヘテロ接合体GA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、そして以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型AAは個体群において検出されていない。

【0277】個体群において決定された遺伝子型の分布及び研究した6個のSNPに関する異なる対立遺伝子頻度の計算の結果を次の表に提示する：

【表6】

系統群	合計	t110c								
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC	%	合計
アフリカ系アメリカ人	50	8.0	(2.7, 13.3)	42	84.0	8	16.0			50
アメリカン・イン ディアン	15			15	100					15
カリブ人	10			10	100					10
ヨーロッパ系コカイト	99	1.0	(0, 2.4)	97	98.0	2	2.0			99
メキシコ人	10			10	100					10
非ヨーロッパ系コカイト	37			37	100					37
北東アジア人	20			20	100					20
南アメリカ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0			10
東南アジア人	17			17	100					17
合計	268	2.1	(0.9, 3.3)	257	95.9	11	4.1			268

系統群	合計	t338a								
		f	(95% CI)	TT	%	TA	%	AA	%	合計
アフリカ系アメリカ人	50	17.0	(9.4, 24.6)	31	66.0	16	34.0			47
アメリカン・イン ディアン	15			15	100					15
カリブ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0			10
ヨーロッパ系コカイト	99	0.5	(0, 1.5)	98	99.0	1	1.0			99
メキシコ人	10			10	100					10
非ヨーロッパ系コカイト	37	1.4	(0, 4.0)	36	97.3	1	2.7			37
北東アジア人	20			20	100					20
南アメリカ人	10			10	100					10
東南アジア人	17			17	100					17
合計	268	3.6	(2.0, 5.2)	246	92.8	19	7.2			265

系統群	合計	t363c								
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC	%	合計
アフリカ系アメリカ人	50			48	100					48
アメリカン・イン ディアン	15			15	100					15
カリブ人	10			10	100					10
ヨーロッパ系コカイト	99	0.5	(0, 1.5)	97	99.0	1	1.0			98
メキシコ人	10			10	100					10
非ヨーロッパ系コカイト	37			36	100					36
北東アジア人	20			20	100					20
南アメリカ人	10			10	100					10
東南アジア人	17			17	100					17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	263	99.6	1	0.4			264

【表7】

系統群	合計	c427t							合計
		f	(95% CI)	CC	%	CT	%	TT	
アフリカ系アメリカ人	50			50	100				50
アメリカンディーン	15			15	100				15
カリブ人	10			10	100				10
ヨーロッパ系コーカソイド	99			99	100				99
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系コーカソイド	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0		10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	267	99.6	1	0.4		268

系統群	合計	c527a (A6D)							合計
		f	(95% CI)	CC	%	CA	%	AA	
アフリカ系アメリカ人	50			50	100				50
アメリカンディーン	15			15	100				15
カリブ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0		10
ヨーロッパ系コーカソイド	99			95	100				95
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系コーカソイド	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	263	99.6	1	0.4		264

系統群	合計	g1023a (M1711)							合計
		f	(95% CI)	GG	%	GA	%	AA	
アフリカ系アメリカ人	50			50	100				50
アメリカンディーン	15			14	100				14
カリブ人	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0		10
ヨーロッパ系コーカソイド	99			97	100				97
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系コーカソイド	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0.2	(0, 0.6)	264	99.6	1	0.4		265

【0278】上記の表において、

- Nは個体数を表し、
- %は特異的な亜集団における個体のパーセンテージを表し、
- 対立遺伝子頻度は、特異的な亜集団における変異した対立遺伝子のパーセンテージを表し、
- 95%のICは、信頼性の最小値と最大値の間隔が95%であることを表す。

【0279】例えば、アンチセンスにおいて遺伝子型判定されたc527aのSNPの場合、アンチセンスで読み込まれたgは、センスで読み込まれた対立遺伝子c、及び未成熟IFN-2タンパク質のアミノ酸配列の6位のアラニンの存在に対応し、そしてその結果、アンチセンスで読み込まれた対立遺伝子tは、対応するタンパク質の配列において、この位置のアスパラギン酸と対応する、センスで読み込まれた対立遺伝子aに対応するこ

とを明確にしておくことは必要である。

【0280】系統群、及びSNPによるこれらの結果を調べることによって、次のことが観察される：

- SNP t110cの場合、11人のヘテロ接合体の個体(TC)が、個体群において、系統群アフリカ系アメリカ人、ヨーロッパ系コーカソイド、及び南アメリカ人から生じている。
- SNP t338aの場合、19人のヘテロ接合体の個体(TA)が見られ、彼等は個体群において系統群アフリカ系アメリカ人、カリブ人、ヨーロッパ系コーカソイド、非ヨーロッパ系コーカソイドに由来している。
- SNP t363cの場合、唯一のヘテロ接合体の個体(TC)が、個体群において系統群ヨーロッパ系コーカソイド人から生じている。
- SNP c427tの場合、唯一のヘテロ接合体の個体(CT)が、個体群において系統群南アメリカ人か

ら生じている。

- SNP c 5 2 7 a の場合、唯一のヘテロ接合体の個体 ( C A ) が、個体群において系統群カリブ人から生じている。

- SNP g 1 0 2 3 a の場合、唯一のヘテロ接合体の個体 ( G A ) が、個体群において系統群カリブ人から生じている。

【0281】例5：天然野生型 I F N - 2 のものと比較される、変異型 M 1 4 8 I I F N - 2 の生物学的機能の研究

a) 原核生物の発現ベクター p T r c / H i s - t o p o における天然野生型 I F N - 2 及び変異型 ( M 1 4 8 I ) I F N - 2 のクローニング

天然野生型及び変異型 I F N - 2 タンパク質をコードするヌクレオチド配列は P C R によって増幅される。

【0282】その様な増幅を可能にする P C R プライマーは：

センスプライマー：CACCCATTTCAACCCAGTCTA

アンチセンスプライマー：AGCTGGC ATACGAATCAAT

である。

【0283】当該 P C R 生成物は、T O P O ( 商標 ) - クローニング ( Invitrogen Corp. ) によって、I P T G ( イソ - プロピル - チオ - ガラクトシド ) により誘導可能な T r c ハイブリッドプロモーターの制御下にある原核生物発現ベクター p T r c / H i s - T o p o 内に挿入される。

【0284】このベクターは、ミニ - シストロンユニットの存在に起因する、細菌における真核生物タンパク質の異種発現を可能にする。

【0285】野生型タンパク質及び変異型タンパク質は、6 ヒスチジン末端から構成される N 末端伸長及び特異的抗体のためのエピトープを有する融合タンパク質の形態で生成される。

【0286】エンテロキナーゼエンドプロテアーゼを用いることによって、この追加の領域を開裂することが可能である。

【0287】組換えタンパク質をコードするベクターの領域のヌクレオチド配列を調べた後、E . コリの菌株、T o p 1 0 ( Invitrogen ) がこれらの組換え発現ベクターで形質転換される。

【0288】b) 天然野生型 I F N - 2 及び変異型 M 1 4 8 I 変異型ポリヒスチジン I F N - 2 の E . コリにおける異種発現及び精製

アマット、野生型 I F N - 2 をコードするクローン又は M 1 4 8 I I F N - 2 をコードするものを含む、100 mL の L B A 培地 ( L u r i a B e r t o n i + 100 µ g / mL アンピシリン ) の 2 つの飽和プレ培養が、200 回転 / 分 ( rpm ) の振盪で、30 で 24 時間行われた。24 時間の増殖の後、培養物は、900 mL の L B A 培地 ( あらかじめ 37 で一晩インキュベ

トされたもの ) で 1 / 10 にして接種するのに使用された。

【0289】2 番目の培養の組み合わせが、600 nm の波長で測定される 0 . 8 の光学密度に相当する細胞密度に達した場合、続いてポリヒスチジンタンパク質の発現が 1 mM の終濃度で I P T G を添加することによって誘導され、そして培養が、200 rpm の振盪で、30 で 5 時間維持される。

【0290】4 で 30 分の、4000 × g での遠心後に得られた細菌のペレットは、25 mL の緩衝液 A ( T r i s 50 mM , pH 8 , N a C l 50 mM , イミダゾール 10 mM , P M S F 0 . 1 mM pH 8 ) 中で再懸濁される。

【0291】0 . 5 mg / mL のリソザイム及び 20 ユニットの D N アーゼ I の存在下での、氷冷下での 30 分のブレインキュベーションは、試料の温度を調節しながらの 3 つの段階で行われる超音波処理 ( 10 秒間の停止を含む、10 秒間の衝撃当たり 240 ワット供給される 1 分間の段階 ) の前に行う。次に、細胞懸濁液を、4 で 30 分の、15 , 000 × g での遠心によって清澄にする。

【0292】次に、遠心の上清を 0 . 22 マイクロメートルのフィルター上で濾過する。

【0293】存在しているポリヒスチジンタンパク質は、続いてあらかじめ 50 mM T r i s , 300 mM N a C l pH 8 . 0 ( 緩衝液 B ) 中で平衡化した H i T r a p ( 商標 ) ニッケルアフィニティー樹脂 ( A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h ) 上での H P L C によって精製される。

【0294】回収した画分におけるポリヒスチジンタンパク質の存在は、一方で S D S P A G E 電気泳動によって、他方で融合タンパク質の N 末端に対する特異的抗体を用いる免疫検出によって証明される。

【0295】この段階で、注目のタンパク質は最大 80 % 純粋である。

【0296】精製の最終段階は、イオン交換クロマトグラフィーカラム上でのタンパク質の分離から成る。

【0297】融合タンパク質を含む画分は、50 mM T r i s pH 8 の緩衝液中であらかじめ平衡化した陰イオン交換カラム ( M i n i Q P E 4 . 6 / 50 , P h a r m a c i a ) に注入される。タンパク質の溶出は、50 mM T r i s pH 8 . 0 の緩衝液中の、0 ~ 500 mM に及び N a C l グラジエントの通過によって行われる。

【0298】注目のタンパク質の純度は S D S / P A G E 上で推定され、そしてタンパク質濃度は B C A アッセイ ( ビンコニン酸及び硫酸銅、S i g m a ) によって測定された。

【0299】N 末端ポリヒスチジン末端を含む精製野生型及び変異型 I F N - 2 タンパク質が、D a u d i 細

胞系の細胞増殖に対するIFN-2のこれらの2つの形態の抗増殖活性の測定から成る機能的試験の間使用される。

【0300】c) Daudi Burkitt細胞系のヒトリンパ芽球の抗増殖を誘導する天然野生型及び変異型M148I IFN-2の能力の評価

これらの試験は、2つの異なるIFN-2の型、すなわち天然野生型IFN-2及びM148I IFN-2で行われる。前もってRPMI1640培地(10%ウシ胎児血清及び2mMのL-グルタミンを添加したもの)中で培養された細胞(ヒトDaudi Burkittリンパ腫細胞系、以後「Daudi細胞」と称する)は、 $4 \times 10^4$ 細胞/穴の細胞密度で96穴プレート中に接種される。

【0301】各穴において、Daudi細胞は、天然野生型又は変異型IFN-2のいずれかの濃度の増大させつつ据えられる。野生型及び変異型IFN-2のいずれかの場合に、0.003pM~600nMの終濃度が試験される。

【0302】8個の異なる培養、及びそれによる異なる測定が、両タンパク質及び各濃度について平行して行われる。

【0303】Daudi細胞は、続いて5%CO<sub>2</sub>のもと、37°Cで66時間培養される。

【0304】66時間の増殖後、各IFN-2の抗増殖効果が、なおもミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性を示す生細胞の数によって決定される。これらのデヒドロゲナーゼ活性は、テトラゾリウム塩であるMTTの開裂に由来するホルマザン結晶の形成に対応する550nmでの光学密度をモニタリングすることによって、12mM MTTの存在下(37°Cで4時間インキュベート)で検出され得る。

【0305】野生型IFN-2又はM148I変異型IFN-2の抗増殖活性は、細胞増殖を50%阻害するIFN-2の濃度に相当するIC50の測定に基づいている。

【0306】得られた結果は図3に例示する。

【0307】野生型及び変異型(M148I)タンパク質の各濃度について、グラフ上に表された点は、タンパク質及び濃度のそれぞれについて平行して作製された4つの培養物上で行われた4つの測定値の平均である。

【0308】野生型IFN-2について測定される平均IC50値は0.3であり、一方、変異型M148I IFN-2について測定される平均IC50値は5.0である。従って、天然野生型タンパク質の値に対する変異型タンパク質のIC50値に対応する比は15.3に達する。

【0309】この試験は、細胞の抗増殖活性が、M148I変異型IFN-2の場合、野生型IFN-2と比較して大きく低下することを示している。

【0310】d) 乳ガン細胞系MCF-7におけるシグナル伝達を活性化する天然野生型及び変異型M148I IFN-2の能力の評価

インターフェロンは、JAK(Janusキナーゼ)及びSTAT(シグナルトランスデューサー及び転写のアクチベーター)タンパク質が関与するシグナル伝達経路を介して作用することが知られている。インターフェロンの、その受容体への結合は、リン酸化によってSTATタンパク質を次々に活性化するJAKタンパク質のリン酸化を誘導する。活性化されたSTATタンパク質は、それらが、各遺伝子の転写を刺激する、遺伝子プロモーター上のインターフェロン応答因子と結合する核に転移する。インターフェロンによって開始されるシグナル伝達経路を研究するために、レポーター遺伝子技術を使用した。方法は後述する。

【0311】乳ガン細胞MCF-7(ECACC)は、24時間、10%ウシ胎児血清を添加したRPMI中の、96穴プレートの $1 \times 10^4$ 細胞/穴の密度で播種された。続いて、細胞は、取扱説明書に従い、Superfect(Qiagen)を用いてインターフェロン刺激型応答因子(Clontech)の制御下で配置されたホタルルシフェラーゼをコードするレポーター遺伝子コンストラクト(pISRE-Luc)で6時間トランスフェクションされた。次に、培養液を交換し、そして細胞を種々の用量の野生型又は変異型IFN-2タンパク質を用いて、37°Cで6時間刺激した後に、CO<sub>2</sub>インキュベーター内でそれらを一晩インキュベートした。刺激の後、培養液を捨て、そして100μl/穴のリン酸緩衝液(PBS)/1mM MgCl<sub>2</sub>と交換した。ルシフェラーゼ活性は、100μl/穴の基質であるLucLite-Plus(Packard)の添加後に、Micro Betaカウンター(Perkin-Elmer)において測定した。

【0312】結果はルシフェラーゼ活性の最大刺激のパーセンテージとして表される。測定は3回行い、そして本明細書で示した値は3回1組の決定の平均を表す。

【0313】シグナル伝達カスケードの引き金を引く野生型IFN-2又は変異型M148I IFN-2の能力は、ルシフェラーゼ活性を50%刺激するそれらの各濃度に対応するそれらの50%有効量(EC50)の測定に基づいている(最大刺激が100%の活性であるとみなされる)。

【0314】野生型IFN-2について測定される平均EC50値は12.33pMである。

【0315】変異型M148I IFN-2について測定される平均EC50値は122pMである。

【0316】従って、野生型タンパク質についてのEC50値に対する、変異型タンパク質についてのEC50値に対応する比は9.91に達する(標準偏差3.4)。

【0317】従って、この試験は変異型M148I I

F N - 2 の生物活性が、インターフェロンのシグナル  
伝達経路を活性化するその能力に基づいて、野生型 I F  
N - 2 のものより 10 倍低いことを示している。 【0318】  
【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GENODYSSEE

&lt;120&gt; New polynucleotides and polypeptides of the IFNalpha-2 gene

&lt;130&gt; B025434

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR.01 02843

&lt;151&gt; 2001-03-01

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1733

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

gcgcctctta tgtaccaca aaaatctatt ttca
aaaaag ttgctctaag aatatagtta      60
tcaagttaag taaaatgtca atagcctttt aatt
taattt ttaattgttt tatcattctt     120
tgcaataata aaacattaac ttatacttt ttaa
tittaat gtatagaata gagatataca     180
taggatatgt aatagatac acagtgtata tgtg
attaaa atataatggg agattcaatc     240
agaaaaaagt ttctaaaaag gctctggggg aaaa
gaggaa ggaacaata atgaaaaaaa     300
tgtggtgaga aaaacagctg aaaacccatg taaa
gagtgt ataaagaaag caaaaagaga     360
agtagaaagt aacacagggg catttgaaa atgt
aaacga gtatgttccc tatttaaggc     420
taggcacaaa gcaaggctct cagagaacct ggag
cctaag gtttaggctc acccatttca     480
accagtctag cagcatctgc aacatctaca atgg
ccttga cctttgcttt actggtggcc     540
ctcctgggtc tcagctgcaa gtcaagctgc tctg
tgggct gtgatctgcc tcaaaccac     600
agcctgggta gcaggaggac ctgatgctc ctgg
cacaga tgaggagaat ctctcttttc     660
tcttgcttga aggacagaca tgactttgga ttic
cccagg aggagtttgg caaccagttc     720
caaaaggctg aaaccatccc tgcctccat gaga
tgatcc agcagatctt caatctcttc     780
agcacaagg actcatctgc tgcttgggat gaga
ccctcc tagacaaatt ctacactgaa     840
ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc tgtg
tgatac agggggtggg ggtgacagag     900
actcccctga tgaaggagga ctccattctg gctg
tgagga aatacttcca aagaatcact     960
ctctatctga aagagaagaa atacagccct tgtg
cctggg aggtgtcag agcagaatc     1020

```

<213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala  
 Leu Leu Val Leu Ser Cys  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu  
 Pro Gln Thr His Ser Leu  
 20 25 30  
 Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala  
 Gln Met Arg Arg Ile Ser  
 35 40 45  
 Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp  
 Phe Gly Phe Pro Gln Glu  
 50 55 60  
 Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu  
 Thr Ile Pro Val Leu His  
 65 70 75 80  
 Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe  
 Ser Thr Lys Asp Ser Ser  
 85 90 95  
 Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys  
 Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr  
 100 105 110  
 Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val  
 Ile Gln Gly Val Gly Val

【図面の簡単な説明】 115 120 【図 3】図 3は、Daudi Burkitt 細胞系に  
 【図 1】図 1は、S ThP GIM Th4 BrI を含んで成る本発明のポリペプチド及びヒト IFN - 2 の  
 明に従いコードされたタンパク質及び天然野生型 IFN 参照野生型遺伝子によってコードされるポリペプチドの  
 - 2 タンパク質のモデルを表す。図 1 の濃いリボンが抗増殖効果を測定する試験の結果を表す。この図におい  
 天然野生型 IFN TyI のタンパク質の構造を表す。図 1 Leu Lys、横軸はピコモル (pM) のタンパク質濃度の対数に対  
 の薄いリボンは M 1 QI 変異型 TyF Ser PrQ タンパク 応し、そして縦軸は細胞増殖のパーセンテージに対応す  
 質の構造を表す。 145 150 る。野生型 IFN - 2 の抗増殖効果は三角によって表  
 【図 2】図 2は、図 10で表したタンパク質の一方の右側 され、そして変異型 IFN - 2 の抗増殖効果は丸によ  
 の近寄ったモデルを表す。Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu いて表される。  
 Met Arg Ser Phe Ser Leu  
 165 170 175  
 Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser  
 Lys Glu

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	185	F I	テ-マコード <sup>8</sup> (参考)
A 6 1 K	48/00		A 6 1 P	3/04 4 C 0 5 7
A 6 1 P	1/00			9/00 4 C 0 8 4
	3/04			11/06 4 C 0 8 5
	9/00			15/00 4 C 0 8 6
	11/06			17/02 4 H 0 4 5
	15/00			17/06
	17/02			19/02
	17/06			19/10
	19/02			25/00
	19/10			25/16

25/00	1 0 1	25/18	
25/16		25/24	
25/18		25/28	
25/24		29/00	1 0 1
25/28		31/12	
29/00	1 0 1	31/18	
31/12		35/00	
31/18		37/00	
35/00		37/08	
37/00		C 0 7 H 21/00	
37/08		C 0 7 K 14/56	
C 0 7 H 21/00		16/24	
C 0 7 K 14/56		C 1 2 N 1/15	
16/24		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		C 1 2 Q 1/02	
5/10		1/68	A
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	
33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/66	F

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA11 BB50 DA12  
DA13 DA14 DA36 FB02  
4B024 AA01 AA11 BA23 BA61 CA04  
DA06 EA04 GA11 HA01 HA11  
4B063 QA01 QA05 QA13 QA18 QQ20  
QQ47 QR32 QR48 QR62 QR75  
QS25 QS34 QX02  
4B064 AG09 AG26 CA02 CA19 CC24  
CE11 CE12 DA03 DA13  
4B065 AA26X AA93Y AB01 BA02  
BB15 CA24 CA44  
4C057 BB02 DD01 MM02 MM04  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17  
BA35 CA53 CA56 CA59 DA22  
MA35 MA52 MA55 MA66 NA06  
NA14 ZA021 ZA121 ZA161  
ZA181 ZA361 ZA591 ZA661  
ZA701 ZA811 ZA891 ZA961  
ZA971 ZB071 ZB131 ZB151  
ZB261 ZB271 ZB331 ZC551  
4C085 AA13 BB11 CC05 DD22 DD23  
EE01 GG01  
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA52  
MA55 MA66 NA14 ZA02 ZA12  
ZA16 ZA18 ZA36 ZA59 ZA66  
ZA70 ZA81 ZA89 ZA96 ZA97  
ZB07 ZB13 ZB15 ZB26 ZB33  
ZC55 ZC78  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 DA16 DA75 EA20 FA74

## 【外国語明細書】

## 1. Title of Invention

New polynucleotides and polypeptides of the IFNalpha-2 gene

## 2. Claims

## 1. Isolated polynucleotide comprising:

a) a nucleotide sequence having at least 80 % identity with the sequence SEQ ID N° 1 or its coding sequence, it being understood that this nucleotide sequence contains at least one of the following coding SNPs: c527a or g1023a, or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

## 2. Isolated polynucleotide comprising:

a) the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or its coding sequence, it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following coding SNPs: c527a, g1023a, or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

3. Polynucleotide according to any one of claims 1 to 2, characterized in that it consists of the sequence SEQ ID N° 1 or its coding sequence, it being understood that each one of the sequences contains at least one of the following coding SNPs: c527a, g1023a.

4. Polynucleotide according to any one of claims 1 to 3, characterized in that the nucleotide sequence a) contains a single coding SNP selected from the group consisting of: c527a and g1023a.

## 5. Isolated polynucleotide comprising:

a) the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence, it being understood that each one of these sequences contains at least one of the following SNPs: 96-100del(aatt), t110c, 139-144del(actta), t338a, t363c, c427t, c1047t, or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

## 6. Isolated polynucleotide consisting of a part of:

a) a nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence, it being understood that each one of these sequences contains at

least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t, or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a);

said isolated polynucleotide being composed of at least 10 nucleotides.

7. Isolated polynucleotide, characterized in that it codes for a polypeptide comprising:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or

b) the amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N° 2;

it being understood that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

8. Polynucleotide according to claim 7, characterized in that it codes for a polypeptide containing a single coding SNP selected from the group consisting of: A6D and M171I.

9. Use of all or part of:

a) a polynucleotide having 80 to 100 % identity with the nucleotide sequence SEQ ID N°1, and/or

b) a polynucleotide according to any one of claims 1 to 8;

in order to identify, hybridize and/or amplify all or part of a polynucleotide having 80 to 100 % identity with the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence, it being understood that each one of these sequences contains at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t.

10. Use of all or part of:

a) a polynucleotide having 80 to 100 % identity with the nucleotide sequence SEQ ID N°1, and/or

b) a polynucleotide according to any one of claims 1 to 8;

for the genotyping of all or part of a polynucleotide having 80 to 100 % identity with the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence, it being understood that each one of these sequences contains at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t.

11. Use according to claim 10, in which the genotyping is carried out by minisequencing.

12. Recombinant vector comprising a polynucleotide according to one of claims 1 to 8.

13. Host cell comprising a recombinant vector according to claim 12.

14. Process for the preparation of a polypeptide, characterized in that a host cell according to claim 13 is cultivated in a culture medium and said polypeptide is isolated from the culture medium.

15. Isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80 % identity with:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or

b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N° 2;

it being understood that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

16. Polypeptide according to claim 15, characterized in that it comprises:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or

b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N° 2;

it being understood that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

17. Polypeptide according to any one of claims 15 and 16, characterized in that it consists of:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or

b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N° 2;

it being understood that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

18. Polypeptide according to any one of claims 15 to 17 characterized in that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains a single coding SNP selected from the group consisting of: A6D and M171I.

19. Process for obtaining an immunospecific antibody, characterized in that it is obtained by immunization of an animal with a polypeptide according to any one of claims 15 to 18.

20. Immunospecific antibody for a polypeptide according to any one of claims 15 to 18.

21. Process for the identification of an agent activating or inhibiting a polypeptide according to any one of claims 15 to 18, comprising :

a) the preparation of a recombinant vector comprising a polynucleotide according to any one of claims 1 to 4 and 6 to 8,

b) the preparation of host cells comprising a recombinant vector according to a),

c) the contacting of the host cells according to b) with an agent to be tested, and

d) the determination of the activating or inhibiting effect generated by the agent to be tested.

22. Process for the identification of an agent activated or inhibited by a polypeptide according to any one of claims 15 to 18, comprising:

a) the preparation of a recombinant vector comprising a polynucleotide according to any one of claims 1 to 4 and 6 to 8,

b) the preparation of host cells comprising a recombinant vector according to a),

c) the contacting of the host cells according to b) with an agent to be tested, and

b) the determination of the activating or inhibiting effect generated by the polypeptide on the agent to be tested.

23. Process for analyzing the biological characteristics of a polynucleotide according to the invention and/or of a polypeptide according to the invention in a subject, comprising at least one of the following:

a) Determining the presence or the absence of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 8 in the genome of a subject,

b) Determining the level of expression of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 8 in a subject,

c) Determining the presence or the absence of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18 in a subject,

d) Determining the concentration of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18 in a subject, and/or

e) Determining the functionality of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18 in a subject.

24. Medicament comprising by way of active agent at least one polypeptide according to any one of claims 15 to 18.

25. Use of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18, for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of cancers and tumors, cardiovascular diseases, metabolic diseases, infectious diseases, diseases of the central nervous system, immunologically and auto-immunologically related diseases, healing of wound, disorders connected with chemotherapy treatment, anemia in dialyzed patient, osteoporosis, gastrointestinal disorders, venereal diseases.

26. Use of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18, for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeucocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple

myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, cardiovascular diseases, obesity, viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression, the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis, healing of wounds, disorders connected with chemotherapy treatment, anemia in dialyzed patient, osteoporosis, Crohn's disease and ulcerative colitis, and genital warts.

27. Medicament comprising by way of active agent at least one polynucleotide according to any one of claims 1 to 4 and 6 to 8, a recombinant vector according to claim 12, a host cell according to claim 13 and/or an antibody according to claim 20.

28. Use of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 4 and 6 to 8, a recombinant vector according to claim 12, a host cell according to claim 13 and/or an antibody according to claim 20, for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of cancers and tumors, cardiovascular diseases, metabolic diseases, infectious diseases, diseases of the central nervous system, immunologically and auto-immunologically related diseases, healing of wound, disorders connected with chemotherapy treatment, anemia in dialyzed patient, osteoporosis, gastrointestinal disorders, venereal diseases.

29. Use of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 4 and 6 to 8, a recombinant vector according to claim 12, a host cell according to claim 13 and/or an antibody according to claim 20, for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising

Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, cardiovascular diseases, obesity, viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression, the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis, healing of wounds, disorders connected with chemotherapy treatment, anemia in dialyzed patient, osteoporosis, Crohn's disease and ulcerative colitis, and genital warts.

30. Pharmaceutical composition containing by way of active agent at least one polypeptide according to any one of claims 15 to 18, all or part of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 4 and 6 to 8, a recombinant vector according to claim 12, a host cell according to claim 13 and/or an antibody according to claim 20, as well as a pharmaceutically acceptable excipient.

31. Diagnostic composition containing by way of active agent at least one polypeptide according to any one of claims 15 to 18, all or part of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 4 and 6 to 8, a recombinant vector according to claim 12, a host cell according to claim 13 and/or an antibody according to claim 20.

32. Use:

- a) of a therapeutically effective quantity of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18, and/or
- b) of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 8, and/or
- c) of a host cell according to claim 13, this cell coming from the subject to be treated;

in order to prepare a medicament intended to increase the expression or the activity in a subject, of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18.

33. Use:

- a) of a therapeutically effective quantity of an antibody according to claim 20, and/or

b) of a polynucleotide permitting inhibition of the expression of a polynucleotide according to any one of claims 1 to 8;

in order to prepare a medicament intended to decrease the expression or the activity, in a subject, of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18.

34. Use of a IFN $\alpha$ -2 protein for the preparation of a medicament for the prevention or the treatment of a patient having a disorder or a disease caused by a IFN $\alpha$ -2 variant linked to the presence in the genome of said patient of a nucleotide sequence having at least 95% identity with the nucleotide sequence SEQ ID N° 1, provided that said nucleotide sequence comprises one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t.

35. Method for determining statistically relevant associations between: at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -2 gene, and a disease or a resistance to a disease comprising:

- a) genotyping a group of individuals,
- b) determining the distribution of said disease or resistance to disease within said group of individuals,
- c) comparing the genotype data with the distribution of said disease or resistance to disease, and
- d) analyzing said comparison for statistically relevant associations.

36. Use of at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -2 gene, for developing diagnostic/prognostic kits for a disease or a resistance to a disease.

37. A new compound having a biological activity substantially similar or lower in comparison to that of the M171I mutated IFN $\alpha$ 2 gene product

38. A compound according to claim 37, wherein said biological activity being evaluated, for example, by measuring cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line or signal transduction capacity.

39. A new compound having a cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line at least 15 times lower than that of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

40. A new compound having a signal transduction capacity on MCF7 cells at least 10 times lower than that of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

41. Use of a polypeptide according to any one of claims 15 to 18, containing the M171I SNP, for the identification of a compound according to any one of claims 37 to 40.

42. Process for the identification of a compound according to any one of claims 37 to 40, comprising the following steps:

a) Determining the biological activity, such as the cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line or signal transduction capacity,

b) Comparing the activity determined in step a) of the compound to be tested, with the activity of M171I mutated IFN $\alpha$ 2 gene product, and

b) Determining, on the basis of the comparison carried out in step b), whether the compound to be tested has a substantially similar or lower activity compared to that of the M171I mutated IFN $\alpha$ 2 gene product.

43. Process according to claim 42, characterized in that the compound to be tested is previously identified from synthetic peptide combinatorial libraries, high-throughput screening, or designed by computer-aided drug design so as to have the same three-dimensional structure and/or chemical effect as that of the polypeptide of M171I IFN $\alpha$ 2 gene product.

44. Use of a compound according to any one of claims 37 to 40, for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of cancers and tumors, cardiovascular diseases, metabolic diseases, infectious diseases, diseases of the central nervous system, immunologically and auto-immunologically related diseases, healing of wound, disorders connected with chemotherapy treatment, anemia in dialyzed patient, osteoporosis, gastrointestinal disorders, venereal diseases.

45. Use of a compound according to any one of claims 37 to 40, for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoïd tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, cardiovascular diseases, obesity, viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression, the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis, healing of wounds, disorders connected with chemotherapy treatment, anemia in dialyzed patient, osteoporosis, Crohn's disease and ulcerative colitis, and genital warts.

### 3. Detailed Description of Invention

The present invention relates to new polynucleotides deriving from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene and comprising new SNPs, new polypeptides derived from the natural IFN $\alpha$ -2 protein and comprising mutations caused by these SNPs as well as their therapeutic uses.

#### PRIOR ART

The interferon alpha-2 (IFN $\alpha$ -2) gene is described in the following publications:

- Olopade OI., Bohlander Sk. "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia." *Genomics*. 1992 Oct; 14(2):437-43;
- Ezekowitz Ra., Mulliken Jb., "Interferon alpha-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy" *N. Engl. J. Med.* 1992 May 28; 326(22):1456-63.;
- Dithmar S., Rusciano D., "Neoadjuvant interferon alpha-2b treatment in a murine model for metastatic ocular melanoma: a preliminary study" *Arch. Ophthalmol.* 2000 Aug; 118(8):1085-9.

The nucleotide sequence of this gene is accessible under accession number J00207, V11834 in the GenBank database.

The IFN $\alpha$  are known for their cellular antiproliferative effects and their involvements in antiviral and antiparasitic responses.

The IFN $\alpha$  are also known to inhibit the expression of several other cytokines at the level of the hematopoietic stem cells, as well as to inhibit the cellular proliferation of certain tumors.

The IFN $\alpha$  are also known to reduce the expression of EGF receptors in renal carcinomas, to inhibit the expression of certain mitochondrial genes, to inhibit the proliferation of fibroblasts, monocytes and B lymphocytes, especially in vitro, and to block the synthesis of antibodies by B lymphocytes.

The IFN $\alpha$  are also known to induce the expression of tumors specific antigens on the surface of tumor cells and also to induce the genes placed under the control of promoter regions of the ISRE type (Interferon-Stimulated Response Element) by acting on the specific transcription factors of these ISRE.

It is known that the IFN $\alpha$  are involved in different disorders and/or human diseases, including but not limited to the different cancers such as carcinomas, melanomas, lymphomas, leukemias and cancers of the liver, neck, head and kidneys, cardiovascular diseases, metabolic diseases such as those that are not connected with the immune system like, for example, obesity, infectious diseases such as hepatitis B and C and AIDS, pneumonias, ulcerative colitis, diseases of the central nervous system like, for example, Alzheimer's disease, schizophrenia and depression, the rejection of tissue or organ grafts, healing of wounds, anemia in dialyzed patients, allergies, asthma, multiple sclerosis, osteoporosis, psoriasis, rheumatoid arthritis, Crohn's disease, autoimmune diseases and disorders, gastrointestinal disorders, and disorders connected with chemotherapy treatments.

The IFN $\alpha$  are particularly used for the treatment of certain leukemias, metastasized renal carcinomas as well as tumors that appear following an immunodeficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS. The IFN $\alpha$  are also effective against other types of tumors and against certain viral infections. The IFN $\alpha$  are also recognized by the FDA (Food and Drug Administration) for the treatment of genital warts or venereal diseases.

However, the IFN $\alpha$  and in particular IFN $\alpha$ -2, have numerous side effects when they are used in pharmaceutical compositions, such as reactions of acute hypersensitivity (urticaria, bronchoconstriction, anaphylactic shock etc.), cardiac arrhythmias, low blood pressure, epileptic seizures, problems with thyroid functions, flu-like syndromes (fevers, sweats, myalgias) etc.

Furthermore, patients treated with IFN $\alpha$  can develop antibodies to these molecules, which neutralize and thus decrease their effectiveness.

The present invention is drawn to new polypeptide and new polynucleotide analogs to the IFN $\alpha$ -2 gene and its corresponding protein capable of having a different functionality from the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein. In particular, certain of these new polypeptides and new polynucleotides have a cellular antiproliferative activity significantly inhibited by comparison with the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

These new polypeptides and polynucleotides can notably be used to treat or prevent the disorders or diseases previously mentioned and avoid all or part of the disadvantages, which are tied to them.

#### THE INVENTION

The present invention is directed to new polynucleotides that differ from the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene, in that it comprises one or more SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

The nucleotide sequence SEQ ID N°1 of the human reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene is composed of 1733 nucleotides and comprises a coding sequence of 567 nucleotides, from nucleotide 511 (start codon) to nucleotide 1077 (stop codon).

The applicant has identified 9 SNPs in the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene.

These 9 SNPs are the following: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t.

It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponds to the positioning of the SNPs previously defined and is relative to the nucleotide sequence shown in SEQ ID N°1.

The letters a, t, c and g correspond respectively to the nitrogenous bases adenine, thymine, cytosine and guanine.

The first letter corresponds to the wild-type nucleotide, whereas the last letter corresponds to the mutated nucleotide.

Thus, for example, the SNP c527a corresponds to a mutation of the nucleotide cytosine (c) at position 527 of the nucleotide sequence SEQ ID

N°1 of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene into an adenine (a) and the SNP 96-100del(aattt) corresponds to a mutation in which the 5 nucleotides aattt from positions 96 to 100 of the nucleotide sequence SEQ ID N°1 of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene have been deleted.

These SNPs were identified by the applicant using the determination process described in applicant's patent applications FR 00 22894, filed December 6, 2000 and US 10/010 749, filed on December 6, 2001, cited here by way of reference.

The process described in these patent applications permits the identification of one (or several) preexisting SNP(s) in at least one individual from a random population of individuals.

In the scope of the present invention, two fragments of the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene, one of which comprises the complete coding sequence, were isolated from different individuals in a population of individuals chosen in a random manner.

Sequencing of these fragments was then carried out on certain of these samples having a heteroduplex profile (that is a profile different from that of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene sequence) after analysis by DHPLC ("Denaturing-High Performance Liquid Chromatography").

The fragment sequenced in this way was then compared to the nucleotide sequence of the fragment of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene and the SNPs in conformity with the invention identified.

Thus, the SNPs are natural and each of them is present in certain individuals of the world population.

The reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene codes for an immature protein of 188 amino acids, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID N°2, that will be converted to a mature protein of 165 amino acids by cleavage of the signal peptide that includes the first 23 amino acids.

Each of the coding SNPs of the invention, namely: c527a and g1023a, causes modifications, at the level of the amino acid sequence, of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene.

These modifications in the amino acid sequence are the following:

The SNP c527a causes a mutation of the amino acid alanine (A) at position 6 in the immature protein encoded by the IFN $\alpha$ -2 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID N°2, in aspartic acid (D) and is not present in the mature protein since it belongs to the signal sequence. In the description of the present invention the mutation encoded by this SNP will also be called A6D.

The SNP c527a affects an amino acid residue located in the signal sequence of the protein. This signal sequence contains all the information necessary for the proper targeting of the mature protein. Thus, the SNP c527a may affect the final localization of the mature protein.

The SNP g1023a causes a mutation of the amino acid methionine (M) at position 171 in the immature protein encoded by the IFN $\alpha$ -2 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID N°2, in isoleucine (I) and at position 148 of the mature protein. In the description of the present invention, the terminology M148I and M171I will be used to refer to the mutation encoded by this SNP according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein, respectively.

The SNP g1023a causes modifications of the spatial conformation of the polypeptides in conformity with the invention compared to the polypeptide encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene.

The modifications in the spatial conformation can be observed by computational molecular modeling, according to methods that are well known to a person skilled in the art, making use of, for example, the modeling tools *de novo* (for example, SEQFOLD/MSI), homology (for example, MODELER/MSI), minimization of the force field (for example, DISCOVER, DELPHI/MSI) and/or molecular dynamics (for example, CFF/MSI).

One example of such modelings is given hereinafter in the experimental part.

Computational molecular modeling permits the observation that the mutation M148I on the mature mutated protein causes a change in the

lateral chain near the point of mutation, on helices A and E of IFN $\alpha$ -2. The mutated lateral chain I148 is engaged into a salt bridge with the lateral chain E141, which causes some changes in spatial conformation of the mature mutated protein. Whereas, in the three dimensional conformation of the wild-type IFN $\alpha$ -2, the R144 lateral chain is oriented towards the interior of the molecule, the R 144 lateral chain is oriented towards the exterior in the mature mutated protein. Likewise, in the mature mutated protein, the R22 and E141 lateral chains are displaced. Thus, the mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein.

Thus, computational molecular modeling permits the prediction that the presence of the amino acid methionine at position 148 involves a significant modification of the structure and of the function of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 protein.

Other SNPs in conformity with the invention, namely: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c1047t, do not involve modification of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene at the level of the amino acid sequence SEQ ID N°2.

The SNP c1047t is silent and the SNPs 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t are non-coding.

Genotyping of the polynucleotides in conformity with the invention can be carried out in such a fashion as to determine the allelic frequency of these polynucleotides in a population. Six examples of genotyping are given, hereinafter, in the experimental part.

The determination of the functionality of the polypeptides of the invention can also be carried out by a test of their biological activity.

In this regard, it is possible to measure, for example, the antiproliferative effect of polypeptides in conformity with the invention on a Daudi Burkitt's cell line and compare with the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein.

One example of determination of functionality is given hereinafter in the experimental part.

The invention is also directed to the use of polynucleotides and of polypeptides in conformity with the invention as well as of therapeutic molecules obtained and/or identified starting from these polynucleotides and polypeptides, notably for the prevention and the treatment of certain human disorders and/or diseases.

~~Figure 1 represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP M148I and the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein.~~

Figure 2 represents a close up of the model of the right part of each one of the proteins represented in Figure 1.

The darker ribbon of Figure 1 represents the structure of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein. The lighter ribbon of Figure 1 represents the structure of the M148I mutated IFN $\alpha$ -2 protein.

Figure 3 represents the results of the test for measuring the antiproliferative effect of a polypeptide of the invention and a polypeptide encoded by the reference wild-type gene of human IFN $\alpha$ -2, on the Daudi Burkitt's cell line.

In this figure, the abscissas correspond to the logarithm of the protein concentration in picomoles (pM) and the ordinates correspond to the percentage of cell proliferation.

The antiproliferative effect of the wild-type IFN $\alpha$ -2 is represented by triangles and the antiproliferative effect of the mutated IFN $\alpha$ -2 is represented by circles.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

### Definitions

By "nucleotide sequence of the reference wild-type gene" is understood the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 of the human gene.

This sequence is accessible in GenBank under Accession number J00207, V11834 and described in Olopade OI., Bohlander Sk. "Mapping of the

shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia." *Genomics*. 1992 Oct;14(2):437-43.

By "natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein" is understood the mature protein encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN $\alpha$ -2 gene. The natural wild-type immature IFN $\alpha$ -2 protein corresponds to the peptide sequence SEQ ID N°2.

By "polynucleotide" is understood a polyribonucleotide or a polydeoxyribonucleotide that can be a modified or non-modified DNA or an RNA.

The term polynucleotide includes, for example, a single strand or double strand DNA, a DNA composed of a mixture of one or several single strand region(s) and of one or several double strand region(s), a single strand or double strand RNA and an RNA composed of a mixture of one or several single strand region(s) and of one or several double strand region(s). The term polynucleotide can also include an RNA and/or a DNA including one or several triple strand regions. By polynucleotide is equally understood the DNAs and RNAs containing one or several bases modified in such a fashion as to have a skeleton modified for reasons of stability or for other reasons. By modified base is understood, for example, the unusual bases such as inosine.

By "polypeptide" is understood a peptide, an oligopeptide, an oligomer or a protein comprising at least two amino acids joined to each other by a normal or modified peptide bond, such as in the cases of the isosteric peptides, for example.

A polypeptide according to the invention can be composed of amino acids other than the 20 amino acids defined by the genetic code and can equally be composed of amino acids modified by natural processes, such as post translational maturation processes or by chemical processes, which are well known to a person skilled in the art. Such modifications are fully detailed in the literature. These modifications can appear anywhere in the polypeptide: in the peptide skeleton, in the amino acid chain or even at the carboxy- or amino-terminal ends.

A polypeptide can also be branched following an ubiquitination or be cyclic with or without branching. This type of modification can be the result of natural or synthetic post-translational processes that are well known to a person skilled in the art.

Polypeptide modifications may include, for example, acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent fixation of flavine, covalent fixation of heme, covalent fixation of a nucleotide or of a nucleotide derivative, covalent fixation of a lipid or of a lipidic derivative, the covalent fixation of a phosphatidylinositol, covalent or non-covalent cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, cysteine formation, pyroglutamate formation, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodization, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processes, phosphorylation, prenylation, racemization, senescence, sulfatation, amino acid addition such as arginylation or ubiquitination. Such modifications are fully detailed in the literature: PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2<sup>nd</sup> Ed., T. E. Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182: 626-646, and Rattan et al. "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48-62.

By "isolated polynucleotide" or "isolated polypeptide" is understood a polynucleotide or a polypeptide such as previously defined which is isolated from the human body or otherwise produced by a technical process.

By "identity" is understood the measurement of nucleotide or polypeptide sequence identity.

Identity is a term well known to a person skilled in the art and well described in the literature. See COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I,

Griffin, A.M. and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994; and SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987.

The methods commonly employed to determine the identity and the similarity between two sequences are equally well described in the literature. See GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied Math (1988) 48: 1073.

A polynucleotide having, for example, an identity of at least 95 % with the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 is a polynucleotide which contains at most 5 points of mutation over 100 nucleotides, compared to said sequence.

These points of mutation can be one (or several) substitution(s), addition(s) and/or deletion(s) of one (or several) nucleotide(s).

In the same way, a polypeptide having, for example, an identity of at least 95 % with the amino acid sequence SEQ ID N° 2 is a polypeptide that contains at most 5 points of mutation over 100 amino acids, compared to said sequence.

These points of mutation can be one (or several) substitution(s), addition(s) and/or deletion(s) of one (or several) amino acid(s).

The polynucleotides and the polypeptides according to the invention which are not totally identical with, respectively, the nucleotide sequence SEQ ID N°1 or the amino acid sequence SEQ ID N°2, containing at least one of the SNPs of the invention, are considered as variants of these sequences.

In general, polynucleotides according to the invention possess the same or practically the same biological activity as the nucleotide sequence SEQ ID N°1 comprising at least one of the SNPs of the invention.

In similar fashion, polypeptides according to the invention generally possess the same or practically the same biological activity as the amino acid sequence SEQ ID N°2 comprising at least one of the coding SNPs of the invention.

A variant, according to the invention, can be obtained, for example, by site-directed mutagenesis or by direct synthesis.

By "SNP" is understood any natural variation of a base in a nucleotide sequence. A SNP, in a nucleotide sequence, can be coding, silent or non-coding.

A coding SNP is a polymorphism in the coding sequence that involves a modification of one or more amino acids in the sequence of amino acids encoded by this nucleotide sequence. In this case, the term SNP applies equally, by extension, to a mutation in an amino acid sequence.

A silent SNP is a polymorphism in the coding sequence of a nucleotide sequence that does not involve a modification of any amino acid in the amino acid sequence encoded by this nucleotide sequence.

A non-coding SNP is a polymorphism in the non-coding sequence of a nucleotide sequence. This polymorphism can notably be found in an intron, a splicing zone, a transcription promoter or an enhancer site sequence.

By "functional SNP" is understood a SNP, such as previously defined, which is included in a nucleotide sequence or an amino acid sequence, and has some functionality.

By "functionality" is understood the biological activity of a polypeptide or of a polynucleotide.

The functionality of a polypeptide or of a polynucleotide according to the invention can consist in a conservation, an augmentation, a reduction or a suppression of the biological activity of the polypeptide encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type gene or of this latter nucleotide sequence.

The functionality of a polypeptide or of a polynucleotide according to the invention can equally consist of a change in the nature of the biological activity of the polypeptide encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type gene or of this latter nucleotide sequence.

The biological activity can, notably, be linked to the affinity or to the absence of affinity of a polypeptide according to the invention with a receptor.

#### Polynucleotide

The present invention is directed to an isolated polynucleotide comprising:

a) a nucleotide sequence having at least 80 % identity, preferably at least 90 % identity, more preferably at least 95 % identity and still more preferably at least 99 % identity with the sequence SEQ ID N° 1 or its coding sequence (nucleotide 511 to nucleotide 1077), it being understood that this nucleotide sequence comprises at least one of the following coding SNPs : c527a or g1023a, or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

The present invention relates equally to an isolated polynucleotide comprising:

a) the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following coding SNPs: c527a or g1023a, or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

Preferably, the polynucleotide of the invention consists of the sequence SEQ ID N° 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following coding SNPs: c527a, g1023a.

According to the invention, the polynucleotide previously defined comprises a single coding SNP selected from the group consisting of: c527a and g1023a.

A polynucleotide such as previously defined can also include at least one of the following non-coding and silent SNPs: 96-100del(aattt), 1110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c1047t.

The present invention is also directed to an isolated polynucleotide comprising or consisting of:

a) the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence, such that each of these sequences comprises at least one of the following non coding or silent SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t or c1047t ; or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

It is understood that only the silent SNP c1047t is located in the coding sequence of the nucleotide sequence SEQ ID N° 1.

The present invention also concerns an isolated polynucleotide consisting of a part of:

a) a nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence, such that each one of these sequences contains at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t ; or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a);  
said isolated polynucleotide being composed of at least 10 nucleotides.

Preferably, the isolated polynucleotide as defined above is composed of 10 to 40 nucleotides.

The present invention is also directed to an isolated polynucleotide coding for a polypeptide comprising:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or

b) the amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 188 of the sequence of amino acids SEQ ID N° 2;

it being understood that each of the amino acid sequences under a) and b) comprises at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponding to the positioning of the A6D, M171I SNPs is relative to the numbering of the amino acid sequence SEQ ID N°2.

In a preferred embodiment of the invention, the previously defined polypeptide comprises a single coding SNP such as defined above.

Preferably a polynucleotide according to the invention is composed of a DNA or RNA molecule.

A polynucleotide according to the invention can be obtained by standard DNA or RNA synthetic methods.

A polynucleotide according to the invention can equally be obtained by site-directed mutagenesis starting from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene by modifying the wild-type nucleotide by the mutated nucleotide for each SNP on the nucleotide sequence SEQ ID N° 1.

For example, a polynucleotide according to the invention, comprising a SNP g1023a can be obtained by site-directed mutagenesis starting from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene by changing the guanosine (g) at position 1023 in the nucleotide sequence SEQ ID N°1 to adenosine (a).

The processes of site-directed mutagenesis that can be implemented in this way are well known to a person skilled in the art, see the publication of TA Kunkel in 1985 in "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82:488.

An isolated polynucleotide can equally include, for example, nucleotide sequences coding for pre-, pro- or pre-pro-protein amino acid sequences or marker amino acid sequences, such as hexa-histidine peptide.

A polynucleotide of the invention can equally be associated with nucleotide sequences coding for other proteins or protein fragments in order to obtain fusion proteins or other purification products.

A polynucleotide according to the invention can equally include nucleotide sequences such as the 5' and/or 3' non-coding sequences, such as, for example, transcribed or non-transcribed sequences, translated or non-translated sequences, splicing signal sequences, polyadenylated sequences, ribosome binding sequences or even sequences which stabilize mRNA.

A nucleotide sequence complementary to the nucleotide or polynucleotide sequence is defined as one that can hybridize with this nucleotide sequence, under stringent hybridization conditions.

By "stringent hybridization conditions" is generally but not necessarily understood the chemical conditions that permit hybridization only when the nucleotide sequences have an identity of at least 80 %, preferably greater than or equal to 90 %, still more preferably greater than or equal to 95 % and most preferably greater than or equal to 97 %.

The stringent conditions can be obtained according to methods well known to a person skilled in the art and, for example, by an incubation of the polynucleotides, at 42° C, in a solution comprising 50 % formamide, 5xSSC (150 mM of NaCl, 15 mM of trisodium citrate), 50 mM of sodium phosphate (pH = 7.6), 5x Denhardt Solution, 10 % dextran sulfate and 20 µg denatured salmon sperm DNA, followed by washing the filters at 0.1x SSC, at 65° C.

Within the scope of the invention, when the stringent hybridization conditions only permit hybridization of the nucleotide sequences having an identity equal to 100 %, the nucleotide sequence is considered to be strictly complementary to the nucleotide sequence such as described under a).

It is understood within the meaning of the present invention that the nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence comprises at least one anti-sense SNP according to the invention.

Thus, for example, if the nucleotide sequence comprises the SNP g1023a, its complementary nucleotide sequence comprises the thymine nucleotide (t) at the equivalent of position 1023.

#### Identification, hybridization and/or amplification of a polynucleotide comprising a SNP

The present invention is also directed to the use of all or part of:

a) a polynucleotide having 80 to 100 % identity with the nucleotide sequence SEQ ID N°1, and/or

b) a polynucleotide according to the invention comprising at least one SNP;

in order to identify, hybridize and/or amplify all or part of a polynucleotide having 80 to 100 % identity with the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence (nucleotide 511 to nucleotide 1077), it being understood that each one of these sequences contains at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t.

#### Genotyping and determination of the frequency of a SNP

The present invention equally has for its object the use of all or part of:

a) a polynucleotide having 80 to 100 % identity (preferably at least 90 % identity, more preferably 95 % identity and particularly 100 % identity) with the nucleotide sequence SEQ ID N°1, and/or

b) a polynucleotide according to the invention comprising at least one SNP;

for the genotyping of all or part of a polynucleotide having 80 to 100 % identity (preferably at least 90 % identity, more preferably 95 % identity and particularly 100 % identity) with the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 or if necessary its coding sequence (of the nucleotide 511 to the nucleotide 1077 ), it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t.

According to the invention, the genotyping may be carried out on an individual or a population of individuals, most preferably in a population of individuals. A genotype consists of the determination of the alleles present at one or more specific loci.

Within the meaning of the invention, genotyping is defined as a process for the determination of the genotype of an individual or of a population of individuals. Genotype consists of the alleles present at one or more specific

loci.

By "population of individuals" is understood a group of determined individuals selected in random or non-random fashion. These individuals can be humans, animals, microorganisms or plants. Usually, the group of individuals comprises at least 10 persons, preferably from 100 to 300 persons.

The individuals can be selected according to their ethnicity or according to their phenotype, notably those who are affected by the following disorders and/or diseases:

- cancers and tumors, such as carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS,
- cardiovascular diseases,
- metabolic diseases, such as non-immune associated diseases comprising obesity,
- infectious diseases, such as viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias,
- diseases of the central nervous system, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression,
- immunologically and auto-immunologically related diseases, such as the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis,
- healing of wounds,
- disorders connected with chemotherapy treatment,
- anemia in dialyzed patient,
- osteoporosis,
- gastrointestinal disorders, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and
- venereal diseases, such as genital warts.

Multiple technologies exist which can be implemented in order to genotype SNPs (see for example Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches"). These technologies are based on one of the four following principles: allele specific oligonucleotide hybridization, oligonucleotide elongation by dideoxynucleotides optionally in the presence of deoxynucleotides, ligation of allele specific oligonucleotides or cleavage of allele specific oligonucleotides. Each one of these technologies can be coupled to a detection system such as measurement of direct or polarized fluorescence, or mass spectrometry.

Genotyping can notably be carried out by minisequencing with hot ddNTPs (2 different ddNTPs labeled by different fluorophores) and cold ddNTPs (2 different non labeled ddNTPs), in connection with a polarized fluorescence scanner. The minisequencing protocol with reading of polarized fluorescence (FP-TDI Technology or Fluorescence Polarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation) is well known to a person skilled in the art.

FP-TDI can be carried out on a product obtained after amplification by polymerase chain reaction (PCR) of the DNA of each individual. This PCR product is selected to cover the polynucleotide genic region containing the studied SNP. After the last step in the PCR thermocycler, the plate is then placed on a polarized fluorescence scanner for a reading of the labeled bases by using fluorophore specific excitation and emission filters. The intensity values of the labeled bases are reported on a graph.

For the PCR amplification, in the case of a SNP of the invention, the sense and antisense primers, respectively, can easily be selected by a person skilled in the art according to the position of the SNPs of the invention in order to amplify a region of interest containing the SNP or SNPs.

For example, a first set of sense and antisense nucleotide sequences for the PCR amplification can be:

Sense primer: GCCTCTTATGTACCCACAAA

Antisense primer: CACCAGTAAAGCAAAGGTCA

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment

having a length of 535 nucleotides, from nucleotide 3 to nucleotide 537 in the nucleotide sequence SEQ ID N° 1.

For example, a second set of sense and antisense nucleotide sequences for the PCR amplification can be:

Sense primer: CACCCATTTCAACCAGTCTA

Antisense primer: AGCTGGCATACGAATCAAT

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment having a length of 655 nucleotides, from nucleotide 470 to nucleotide 1124 in the nucleotide sequence SEQ ID N° 1.

A statistical analysis of the frequency of each allele (allelic frequency) encoded by the gene comprising the SNP in the population of individuals is then achieved, which permits determination of the importance of their impact and their distribution in the different sub-groups including the diverse ethnic groups that constitute this population of individuals.

The genotyping data are analyzed in order to estimate the distribution frequency of the different alleles observed in the studied populations. The calculations of the allelic frequencies can be carried out with the help of software such as SAS-suite® (SAS) or SPLUS® (MathSoft). The comparison of the allelic distributions of a SNP of the invention across different ethnic groups of the population of individuals can be carried out by means of software such as ARLEQUIN® and SAS-suite®.

SNPs of the invention as genetic markers

Whereas SNPs modifying functional sequences of genes (e.g. promoter, splicing sites, coding region) are likely to be directly related to disease susceptibility or resistance, all SNPs (functional or not) may provide valuable markers for the identification of one or several genes involved in these disease states and, consequently, may be indirectly related to these disease states (See Cargill et al. (1999). Nature Genetics 22:231-238; Riley et al. (2000). Pharmacogenomics 1:39-47; Roberts L. (2000). Science 287: 1898-1899).

Thus, the present invention also concerns a databank comprising at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -2 gene.

It is well understood that said SNPs are numbered in accordance with the nucleotide sequence SEQ ID N°1.

This databank may be analyzed for determining statistically relevant associations between: at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -2 gene, and a disease or a resistance to a disease, comprising

- a) genotyping a group of individuals,
- b) determining the distribution of said disease or resistance to disease within said group of individuals,
- c) comparing the genotype data with the distribution of said disease or resistance to disease, and
- d) analyzing said comparison for statistically relevant associations.

The present invention also concerns the use of at least one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -2 gene, for developing diagnostic/prognostic kits for a disease or a resistance to a disease.

A SNP of the invention such as defined above may be directly or indirectly associated to a disease or a resistance to a disease.

Preferably, these diseases may be those which are defined as mentioned above.

#### Expression vector and host cell

The present invention is also directed to a recombinant vector comprising at least one polynucleotide according to the invention.

Numerous expression systems can be used, including, for example, chromosomes, episomes, derived viruses. More particularly, the recombinant vectors used can be derived from bacterial plasmids, transposons, yeast episome, insertion elements, yeast chromosome elements, viruses such as baculovirus, papilloma viruses such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fox pox viruses, pseudorabies viruses, retroviruses.

These recombinant vectors can equally be cosmid or phagemid derivatives. The nucleotide sequence can be inserted in the recombinant expression vector by methods well known to a person skilled in the art such as, for example, those that are described in MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra) Sambrook et al.

The recombinant vector can include nucleotide sequences that control the regulation of the polynucleotide expression as well as nucleotide sequences permitting the expression and the transcription of a polynucleotide of the invention and the translation of a polypeptide of the invention, these sequences being selected according to the host cells that are used.

Thus, for example, an appropriate secretion signal can be integrated in the recombinant vector so that the polypeptide, encoded by the polynucleotide of the invention, will be directed towards the lumen of the endoplasmic reticulum, towards the periplasmic space, on the membrane or towards the extracellular environment.

The present invention is also directed to a host cell comprising a recombinant vector according to the invention.

The introduction of the recombinant vector in a host cell can be carried out according to methods that are well known to a person skilled in the art such as those described in BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 1986 and MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, such as transfection by calcium phosphate, transfection by DEAE dextran, transfection, microinjection, transfection by cationic lipids, electroporation, transduction or infection.

The host cell can be, for example, bacterial cells such as cells of streptococci, staphylococci, *E. coli* or *Bacillus subtilis*, cells of fungi such as yeast cells and cells of *Aspergillus*, *Streptomyces*, insect cells such as cells of *Drosophila* S2 and of *Spodoptera* Sf9, animal cells, such as CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 cells and human cells of the subject to treat or even plant cells.

The host cells can be used, for example, to express a polypeptide of the invention or as an active product in pharmaceutical compositions, as will be seen hereinafter.

#### Polypeptides

The present invention is also directed to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80 % identity, preferably at least 90 % identity, more preferably at least 95 % identity and still more preferably at least 99 % identity with:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or with

b) the amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N° 2;

it being understood that each of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

The polypeptide of the invention can equally comprise:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or

b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N° 2;

it being understood that each of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

The polypeptide of the invention can more particularly consist of:

a) the amino acid sequence SEQ ID N° 2, or...

b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N° 2;

it being understood that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A6D, M171I.

Preferably, a polypeptide according to the invention contains a single coding SNP selected from the group consisting of: A6D and M171I.

The present invention equally has for its object a process for the preparation of the above-described polypeptide, in which a previously defined host cell is cultivated in a culture medium and said polypeptide is isolated from the culture medium.

The polypeptide can be purified starting from the host cells' culture medium, according to methods well known to a person skilled in the art such as precipitation with chaotropic agents such as salts, in particular ammonium sulfate, ethanol, acetone or trichloroacetic acid, acid extraction; ion exchange chromatography; phosphocellulose chromatography; hydrophobic interaction chromatography; affinity chromatography; hydroxyapatite chromatography or exclusion chromatographies.

By "culture medium" is understood the medium in which the polypeptide of the invention is isolated or purified. This medium can be composed of the extracellular medium and/or the cellular lysate. Techniques well known to a person skilled in the art also permit the latter to produce an active conformation to the polypeptide, if the conformation of said polypeptide was altered during the isolation or the purification.

Antibodies

The present invention also concerns a process for obtaining an immunospecific antibody.

By "antibody" is understood the monoclonal, polyclonal, chimeric, simple chain and/or humanized antibodies as well as the Fab fragments, including Fab or immunoglobulin expression library products.

An immunospecific antibody can be obtained by immunization of an animal with a polypeptide according to the invention.

The invention also relates to an immunospecific antibody for a polypeptide according to the invention, such as defined previously.

A polypeptide according to the invention, one of its fragments, an analog, one of its variants or a cell expressing this polypeptide can also be used to produce immunospecific antibodies.

The term "immunospecific" means that the antibody possesses a better affinity for the polypeptide of the invention than for other polypeptides known in the prior art.

The immunospecific antibodies can be obtained by administration of a polypeptide of the invention, of one of its fragments, of an analog or of an epitopic fragment or of a cell expressing this polynucleotide in a mammal, preferably non human, according to methods well known to a person skilled in the art.

For the preparation of monoclonal antibodies, typical methods for antibody production can be used, starting from cell lines, such as the hybridoma technique (Kohler et al., Nature (1975) 256: 495-497), the trioma technique, the human B cell hybridoma technique (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4: 72) and the EBV hybridoma technique (Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, 1985).

The techniques of single chain antibody production such as described, for example, in US Patent N° 4,946, 778 can also be used.

Transgenic animals such as mice, for example, can also be used to produce humanized antibodies.

Agents interacting with the polypeptide of the invention

The present invention equally has for its object a process for the identification of an agent activating or inhibiting a polypeptide according to the invention, comprising:

- a) the preparation of a recombinant vector comprising a polynucleotide according to the invention containing at least one coding SNP,
- b) the preparation of host cells comprising a recombinant vector according to a),
- c) the contacting of host cells according to b) with an agent to be tested, and
- d) the determination of the activating or inhibiting effect generated by the agent to test.

A polypeptide according to the invention can also be employed for screening compounds that interact with it.

These compounds can be activating (agonists) or inhibiting (antagonists) agents of intrinsic activity of a polypeptide according to the invention. These compounds can equally be ligands or substrates of a polypeptide of the invention. See Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991).

In general, in order to implement such a process, it is first desirable to produce appropriate host cells that express a polypeptide according to the invention. Such cells can be, for example, cells of mammals, yeasts, insects such as *Drosophila* or bacteria such as *E. coli*.

These cells or membrane extracts of these cells are then put in the presence of compounds to be tested.

The binding capacity of the compounds to be tested with the polypeptide of the invention can then be observed, as well as the inhibition or the activation of the functional response.

Step d) of the above process can be implemented by using an agent to be tested that is directly or indirectly labeled. It can also include a

competition test, by using a labeled or non-labeled agent and a labeled competitor agent.

It can also be determined if an agent to be tested generates an activation or inhibition signal on cells expressing the polypeptide of the invention by using detection means appropriately chosen according to the signal to be detected.

Such activating or inhibiting agents can be polynucleotides, and in certain cases oligonucleotides or polypeptides, such as proteins or antibodies, for example.

The present invention also concerns a process for the identification of an agent activated or inhibited by a polypeptide according to the invention, comprising:

- a) the preparation of a recombinant vector comprising a polynucleotide according to the invention containing at least one coding SNP,
- b) the preparation of host cells comprising a recombinant vector according to a),
- c) placing host cells according to b) in the presence of an agent to be tested, and
- d) the determination of the activating or inhibiting effect generated by the polypeptide on the agent to be tested.

An agent activated or inhibited by the polypeptide of the invention is an agent that responds, respectively, by an activation or an inhibition in the presence of this polypeptide. The agents, activated or inhibited directly or indirectly by the polypeptide of the invention, can consist of polypeptides such as, for example, membrane-bound or nuclear receptors, kinases and more preferably tyrosine kinases, transcription factor or polynucleotides.

#### Detection of diseases

The present invention also has for an object a process for analyzing the biological characteristics of a polynucleotide according to the

invention and/or of a polypeptide according to the invention in a subject, comprising at least one of the following:

- a) Determining the presence or the absence of a polynucleotide according to the invention in the genome of a subject,
- b) Determining the level of expression of a polynucleotide according to the invention in a subject,
- c) Determining the presence or the absence of a polypeptide according to the invention in a subject,
- d) Determining the concentration of a polypeptide according to the invention in a subject, and/or
- e) Determining the functionality of a polypeptide according to the invention in a subject.

These biological characteristics may be analyzed in a subject or in a sample from a subject.

These biological characteristics may permit to carry out a genetic diagnosis and to determine whether a subject is affected or at risk of being affected or, to the contrary, presents a partial resistance to the development of a disease, an indisposition or a disorder linked to the presence of a polynucleotide according to the invention and/or a polypeptide according to the invention.

These diseases can be disorders and/or human diseases, such as:

- cancers and tumors, such as carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS,
- cardiovascular diseases,
- metabolic diseases, such as non-immune associated diseases comprising obesity,
- infectious diseases, such as viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias,

- diseases of the central nervous system, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression,
- immunologically and auto-immunologically related diseases, such as the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis,
- healing of wounds,
- disorders connected with chemotherapy treatment,
- anemia in dialyzed patient,
- osteoporosis,
- gastrointestinal disorders, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and
- venereal diseases, such as genital warts.

This process also permits a genetic diagnosis of a disease or of a resistance to a disease linked to the presence, in a subject, of the mutant allele encoded by a SNP according to the invention.

Preferably, in step a), the presence or absence of a polynucleotide, containing at least one coding SNP such as previously defined, will be detected.

The detection of the polynucleotide may be carried out starting from biological samples from the subject to be studied, such as cells, blood, urine, saliva, or starting from a biopsy or an autopsy of the subject to be studied. The genomic DNA may be used for the detection directly or after a PCR amplification, for example. RNA or cDNA can equally be used in a similar fashion.

It is then possible to compare the nucleotide sequence of a polynucleotide according to the invention with the nucleotide sequence detected in the genome of the subject.

The comparison of the nucleotide sequences can be carried out by sequencing, by DNA hybridization methods, by mobility difference of the DNA fragments on an electrophoresis gel with or without denaturing agents or by melting temperature difference. See Myers et al., Science (1985) 230: 1242. Such modifications in the structure of the nucleotide sequence at a precise point can equally be revealed by nuclease protection tests, such as RNase and the

S1 nuclease or also by chemical cleaving agents. See Cotton et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1985) 85: 4397-4401. Oligonucleotide probes comprising a polynucleotide fragment of the invention can equally be used to conduct the screening.

Many methods well known to a person skilled in the art can be used to determine the expression of a polynucleotide of the invention and to identify the genetic variability of this polynucleotide (See Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp 610-613).

In step b), the level of expression of the polynucleotide may be measured by quantifying the level of RNA encoded by this polynucleotide (and coding for a polypeptide) according to methods well known to a person skilled in the art such as, for example, by PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blot, and other hybridization methods.

In step c) and d) the presence or the absence as well as the concentration of a polypeptide according to the invention in a subject or a sample from a subject may be carried out by well known methods such as, for example, by radioimmunoassay, competitive binding tests, Western blot and ELISA tests.

Consecutively to step d), the determined concentration of the polypeptide according to the invention can be compared with the natural wild-type protein concentration usually found in a subject.

A person skilled in the art can identify the threshold above or below which appears the sensitivity or, to the contrary, the resistance to the disease, the indisposition or the disorder evoked above, with the help of prior art publications or by conventional tests or assays, such as those that are previously mentioned.

In step e), the determination of the functionality of a polypeptide according to the invention may be carried out by methods well known to a person skilled in the art as, for example, by in vitro tests such as above mentioned or by an use of host cells expressing said polypeptide.

Medicaments and treatments of diseases

The polypeptides of the invention possess very interesting pharmacological properties. In particular, they can bind to the human IFN $\alpha$ -2 receptor. These properties are in accordance with the use of the polypeptides of the invention for therapeutic treatment of human body, i.e. as a medicament or therapeutic composition.

Thus, the present invention is also directed to a medicament containing, by way of active agent, a polypeptide according to the invention.

The invention also relates to the use of a polypeptide according to the invention, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases, such as:

- cancers and tumors, such as carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS,
- cardiovascular diseases,
- metabolic diseases, such as non-immune associated diseases comprising obesity,
- infectious diseases, such as viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias,
- diseases of the central nervous system, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression,
- immunologically and auto-immunologically related diseases, such as the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis,
- healing of wounds,
- disorders connected with chemotherapy treatment,
- anemia in dialyzed patient,
- osteoporosis,

- gastrointestinal disorders, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and
- venereal diseases, such as genital warts.

Certain of the compounds permitting to obtain the polypeptide according to the invention as well as the compounds obtained or identified by or from this polypeptide can likewise be used for the therapeutic treatment of the human body, i.e. as a medicament.

This is why the present invention also has for an object a medicament containing, by way of active agent, a polynucleotide according to the invention containing at least one previously defined coding SNP, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody.

The invention also relates to the use of a polynucleotide according to the invention containing at least one previously defined coding SNP, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases, such as:

- cancers and tumors, such as carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS,
- cardiovascular diseases,
- metabolic diseases, such as non-immune associated diseases comprising obesity,
- infectious diseases, such as viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias,
- diseases of the central nervous system, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression,
- immunologically and auto-immunologically related diseases, such as

the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis,

- healing of wounds,
- disorders connected with chemotherapy treatment,
- anemia in dialyzed patient,
- osteoporosis,
- gastrointestinal disorders, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and
- venereal diseases, such as genital warts.

The dosage of a polypeptide and of the other compounds of the invention, useful as active agent, depends on the choice of the compound, the therapeutic indication, the mode of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject and the judgment of the doctor.

When it is used as active agent, a polypeptide according to the invention is generally administered at doses ranging between 1 and 100 µg/kg of the subject.

The invention also has as an object a pharmaceutical composition that contains, as active agent, at least one above-mentioned compound such as a polypeptide according to the invention, a polynucleotide according to the invention containing at least one previously defined SNP, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody, as well as a pharmaceutically acceptable excipient.

In these pharmaceutical compositions, the active agent is advantageously present at physiologically effective doses.

These pharmaceutical compositions can be, for example, solids or liquids and be present in pharmaceutical forms currently used in human medicine such as, for example, simple or coated tablets, gelcaps, granules, caramels, suppositories and preferably injectable preparations and powders for injectables. These pharmaceutical forms can be prepared according to usual methods.

The active agent(s) can be incorporated into excipients usually employed in pharmaceutical compositions such as talc, Arabic gum, lactose, starch, dextrose, glycerol, ethanol, magnesium stearate, cocoa butter, aqueous or non-aqueous vehicles, fatty substances of animal or vegetable origin, paraffinic derivatives, glycols, various wetting agents, dispersants or emulsifiers, preservatives.

The active agent(s) according to the invention can be employed alone or in combination with other compounds such as therapeutic compounds such as other interferons- $\alpha$  or other cytokines such as interleukine, for example.

The different formulations of the pharmaceutical compositions are adapted according to the mode of administration.

The pharmaceutical compositions can be administered by different routes of administration known to a person skilled in the art.

The invention equally has for an object a diagnostic composition that contains, as active agent, at least one above-mentioned compound such as a polypeptide according to the invention, all or part of a polynucleotide according to the invention, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody, as well as a suitable pharmaceutically acceptable excipient.

This diagnostic composition may contain, for example, an appropriate excipient like those generally used in the diagnostic composition such as buffers and preservatives.

The present invention equally has as an object the use:

- a) of a therapeutically effective quantity of a polypeptide according to the invention, and/or
- b) of a polynucleotide according to the invention, and/or
- c) of a host cell from the subject to be treated, previously defined,  
to prepare a medicament intended to increase the expression or the activity, in a subject, of a polypeptide according to the invention.

Thus, to treat a subject who needs an increase in the expression or in the activity of a polypeptide of the invention, several methods are possible.

It is possible to administer to the subject a therapeutically effective quantity of a polypeptide of the invention with a pharmaceutically acceptable excipient.

It is likewise possible to increase the endogenous production of a polypeptide of the invention by administration to the subject of a polynucleotide according to the invention. For example, this polynucleotide can be inserted in a retroviral expression vector. Such a vector can be isolated starting from cells having been infected by a retroviral plasmid vector containing RNA encoding for the polypeptide of the invention, in such a fashion that the transduced cells produce infectious viral particles containing the gene of interest. See Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

In accordance with the invention, a polynucleotide containing at least one coding SNP such as previously defined will be preferably used.

It is equally possible to administer to the subject host cells belonging to him, these host cells having been preliminarily taken and modified so as to express the polypeptide of the invention, as previously described.

The present invention equally relates to the use:

a) of a therapeutically effective quantity of a previously defined immunospecific antibody, and/or

b) of a polynucleotide permitting inhibition of the expression of a polynucleotide according to the invention;

in order to prepare a medicament intended to reduce the expression or the activity, in a subject, of a polypeptide according to the invention.

Thus, it is possible to administer to the subject a therapeutically effective quantity of an inhibiting agent and/or of an antibody such as previously defined, possibly in combination, with a pharmaceutically acceptable excipient.

It is equally possible to reduce the endogenous production of a polypeptide of the invention by administration to the subject of a complementary

polynucleotide according to the invention permitting inhibition of the expression of a polynucleotide of the invention.

Preferably, a complementary polynucleotide containing at least one coding SNP such as previously defined can be used.

The present invention concerns also the use of a IFN $\alpha$ -2 protein for the preparation of a medicament for the prevention or the treatment of a patient having a disorder or a disease caused by an IFN $\alpha$ -2 variant linked to the presence in the genome of said patient of a nucleotide sequence having at least 95% identity (preferably, 97% identity, more preferably 99% identity and particularly 100% identity) with the nucleotide sequence SEQ ID N° 1, provided that said nucleotide sequence comprises one of the following SNPs: 96-100del(aattt), t110c, 139-144del(acttta), t338a, t363c, c427t, c527a, g1023a, c1047t.

Preferably, said medicament is used for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of:

- cancers and tumors, such as carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS,
- cardiovascular diseases,
- metabolic diseases, such as non-immune associated diseases comprising obesity,
- infectious diseases, such as viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias,
- diseases of the central nervous system, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression,
- immunologically and auto-immunologically related diseases, such as the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis,

- healing of wounds,
- disorders connected with chemotherapy treatment,
- anemia in dialyzed patient,
- osteoporosis,
- gastrointestinal disorders, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and
- venereal diseases, such as genital warts.

Mimetic compounds of a IFN $\alpha$ -2 polypeptide comprising the SNP M171I

The present invention also concerns a new compound having a biological activity substantially similar or lower in comparison to that of M171I IFN $\alpha$ 2 gene product.

The M171I mutated IFN $\alpha$ 2 gene product corresponds to a polypeptide of :

- a) amino acid sequence ID SEQ N°2, or
- b) amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 188 of the amino acid sequence SEQ ID N°2;

provided that said amino acid sequences under a) and b) comprise the M171I SNP.

Said biological activity may be evaluated, for example, by measuring cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line or signal transduction assays on MCF7 cells using luciferase reporter gene as described below in the experimental part.

As mentioned in the experimental part, the M171I mutated IFN $\alpha$ -2 possesses a cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line which is lower than that of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

As mentioned in the experimental part, the signal transduction activation in the breast carcinoma cell line MCF-7 measured in presence of the M171I mutated IFN $\alpha$ -2 is lower than that measured with the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

A new compound of the invention, such as previously defined,

may possess a biological activity substantially similar to that of the M171I mutated IFN $\alpha$ -2, i.e. which is lower than that of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

Said compound may also have a biological activity which is even lower than that of the M171I mutated IFN $\alpha$ -2.

Said compound may be a biochemical compound, such as a polypeptide or a peptide for example, or an organic chemical compound, such as a synthetic peptide-mimetic for example.

The present invention also provides a new compound having a cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line at least 15 times lower than that of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

The present invention also provides a new compound having a signal transduction capacity on MCF7 cells at least 10 times lower than that of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2.

The present invention also concerns the use of a polypeptide of the invention containing the M171I SNP, for the identification of a compound such as defined above.

The present invention also concerns a process for the identification of a compound of the invention, comprising the following steps:

- a) Determining the biological activity, such as the cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line or the signal transduction capacity,
- b) Comparing the activity determined in step a) of the compound to be tested, with the activity of the M171I mutated IFN $\alpha$ -2 gene product, and
- c) Determining on the basis of the comparison carried out in step b) whether the compound to be tested has a substantially similar or lower activity compared to that of the M171I mutated IFN $\alpha$ -2 gene product.

Preferably, the compound to be tested may be previously identified from synthetic peptide combinatorial libraries, high-throughput screening, or designed by computer-aided drug design so as to have the same three-dimensional structure and/or chemical effect as that of the M171I mutated IFN $\alpha$ -2 gene product. The methods to identify and design compounds are well

known by a person skilled in the art.

Publications referring to these methods may be, for example:

- Silverman R.B. (1992). "Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action". Academic Press, 1st edition (January 15, 1992).

- Anderson S and Chiplin J. (2002). "Structural genomics; shaping the future of drug design? Drug Discov. Today. 7(2):105-107.

- Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH. (2002). "The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery". Drug Discov. Today. 7(2):109-116.

- Burbidge R, Trotter M, Buxton B, Holden S. (2001). "Drug design by machine learning: support vector machines for pharmaceutical data analysis". Comput. Chem. 26(1): 5-14.

- Kauvar L.M. (1996). "Peptide mimetic drugs: a comment on progress and prospects" 14(6): 709.

The compounds of the invention may be used for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of:

- cancers and tumors, such as carcinomas comprising metastasized renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, leukemias comprising tricholeukocyte leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS,

- cardiovascular diseases,

- metabolic diseases, such as non-immune associated diseases comprising obesity,

- infectious diseases, such as viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, and infectious pneumonias,

- diseases of the central nervous system, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and depression,

- immunologically and auto-immunologically related diseases, such as

the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis and rheumatoid arthritis,

- healing of wounds,
- disorders connected with chemotherapy treatment,
- anemia in dialyzed patient,
- osteoporosis,
- gastrointestinal disorders, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and
- venereal diseases, such as genital warts.

#### EXPERIMENTAL PART

Example 1: Modeling of a protein encoded by a polynucleotide of nucleotide sequence containing the g1023a SNP and of the protein encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type gene

In a first step the threedimensional structure of IFN $\alpha$ -2 was constructed starting from that of human IFN $\alpha$ -2 whose structure is available in the PDB database (code 1ITF) using the software Modeler (MSI, San Diego, CA).

The mature polypeptide fragment was then modified in such a fashion as to reproduce the mutation M148I.

A thousand molecular minimization steps were conducted on this mutated fragment by using the programs AMBER and DISCOVER (MSI: Molecular Simulations Inc.).

Two molecular dynamic calculation runs were then carried out with the same program and the same force fields.

In each case, 50,000 steps were calculated at 300°K, terminated by 300 equilibration steps.

The result of this modeling is visualized on Figures 1 and 2.

Example 2: Prediction of the addressing of the protein encoded by a polynucleotide of nucleotide sequence containing the c527a SNP and of the protein encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type gene

The c527a polymorphism involves an A6D polymorphism at the level of the immature IFN $\alpha$ -2 protein. This position is located on the signal peptide comprising the first 23 amino acids of the immature protein. The signal peptide controls the addressing of the protein and the intracellular or extracellular compartment where the mature protein will be expressed.

PSORT is a software available in the public domain that analyzes the amino acid sequence of the immature protein and predicts in which compartment the mature protein will be localized (Nakai K and Kanehisa M (1992).

A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. Genomics 14, 897-911).

PSORT predicts that the A6D polymorphism changes the IFN $\alpha$ -2 localization at the cellular level. Indeed, it predicts that the wild-type mature IFN $\alpha$ -2 protein is secreted, meaning an extracellular localization, whereas the D6 mutated IFN $\alpha$ -2 will be in the nuclear and/or the mitochondrial compartments.

Even if the A6D mutant of IFN $\alpha$ -2 is probably not affected in its structure and function in comparison to the wild-type protein, its activity will not be found where it normally would have been.

Example 3. Prediction of changes in IFN $\alpha$ -2 expression caused by the deletion 139-144del(acttta) in the polynucleotide sequence SEQ ID N°1

The effects of the 139-144del(acttta) deletion on putative binding sites have been evaluated after a run in Match (Transfac). Although this deletion is not located in the regulatory region common to all interferons, it cancels three putative binding sites for transcription factors:

- the putative binding site for Msx-1 encompasses nucleotides 134 to 142 on the wild-type reference sequence ID SEQ N°1. The effect of this deletion

on this binding site cannot be estimated properly since this transcription factor is not well known and its function has been proposed to be related to limb development but has not been clearly identified (Hwang et al. (1998). Am. J. Med. Genet. 75:419-423).

- the putative binding site for Oct-1 encompasses nucleotides 141 to 163 on the wild-type reference sequence ID SEQ N°1. Although this binding site is located at about 400 nucleotides upstream of the transcription initiation site, its deletion may have an important effect since the transcription factor that recognizes this site is involved in different mechanisms of transcription initiation in lymphocytes T and B (Ullman et al. (1991). Science. 254:558-562 ; Kemler et al. (1989). EMBO J. 8:2001-2008 ; Kamps et al. (1990). Mol Cell Biol. 10:5464-5472).

- the putative binding site for Hoxa3 encompasses nucleotides 143 to 151 on the wild-type reference sequence ID SEQ N°1. Hoxa3 is a transcription factor that is involved in the regulation of fetal thymic epithelial cells to promote thymocyte development (Su et al. (2001). Dev. Biol. 236:316-329).

As a result, the 139-144del(acttta) SNP may affect the normal regulation of IFN $\alpha$ -2 expression.

#### Example 4: Genotyping of the SNPs t110c, t338a, t363c, c427t, c527a and g1023a in a population of individuals

The genotyping of SNPs is based on the principle of the minisequencing wherein the product is detected by reading polarized fluorescence. The technique consists of a fluorescent minisequencing (FP-TDI Technology or Fluorescence Polarization Template-direct Dye-terminator Incorporation).

The minisequencing is performed on a product amplified by PCR from genomic DNA of each individual of the population. The PCR product is chosen in such a manner that it covers the genic region containing the SNP to be genotyped. After elimination of the PCR primers that have not been used and the dNTPs that have not been incorporated, the minisequencing is carried

out.

The minisequencing consists of lengthening an oligonucleotide primer, placed just upstream of the site of the SNP, by using a polymerase enzyme and fluorolabeled dideoxynucleotides. The product resulting from this lengthening process is directly analyzed by reading polarized fluorescence.

All these steps, as well as the reading, are carried out in the same PCR plate.

Thus, the genotyping requires 5 steps:

- 1) Amplification by PCR
- 2) Purification of the PCR product by enzymatic digestion
- 3) Elongation of the oligonucleotide primer
- 4) Reading polarized fluorescence
- 5) Interpretation of the reading

The genotyping steps 1 and 2 are carried out in the same conditions for each of the SNPs t110c, t338a, t363c and c427t on the one hand and each of the SNPs c527a, and g1023a on the other hand.

The steps 3, 4 and 5 are specific to each one of these polymorphisms.

1) The PCR amplification of the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene is carried out starting from genomic DNA from 268 individuals of ethnically diverse origins.

These genomic DNAs were provided by the Coriell Institute in the United States.

The 268 individuals are distributed as follows:

Phylogenetic Population	Specific Ethnic Population	Total	%
African American	African American	50	100.0
	<i>Subtotal</i>	50	18.7
Amerind	South American Andes	10	66.7
	South West American Indians	5	33.3
	<i>Subtotal</i>	15	5.6
Caribbean	Caribbean	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	10	3.7
European Caucasoid	North American Caucasian	79	79.8
	Iberian	10	10.1
	Italian	10	10.1
	<i>Subtotal</i>	99	36.9
Mexican	Mexican	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	10	3.7
Northeast Asian	Chinese	10	50.0
	Japanese	10	50.0
	<i>Subtotal</i>	20	7.5
Non-European Caucasoid	Greek	8	21.6
	Indo-Pakistani	9	24.3
	Middle-Eastern	20	54.1
	<i>Subtotal</i>	37	13.8
Southeast Asian	Pacific Islander	7	41.2
	South Asian	10	58.8
	<i>Subtotal</i>	17	6.3
South American	South American	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	10	3.7
<i>Total</i>		268	100

The genomic DNA coming from each one of these individuals constitutes a sample.

For SNPs t110c, t338a, t363c and c427t, the PCR amplification is carried out starting from the following primers:

Sense primer: GCCTCTTATGTACCCACAAA

Antisense primer: CACCAGTAAAGCAAAGGTCA

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment of a length of 535 nucleotides, nucleotide 3 to nucleotide 537, in the nucleotide sequence SEQ ID N° 1.

For SNPs c527a, and g1023a, the PCR amplification is carried out starting from the following primers:

Sense primer: CACCCATTTCAACCAGTCTA

Antisense primer: AGCTGGCATACGAATCAAT

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment of a length of 655 nucleotides, nucleotide 470 to nucleotide 1124, in the nucleotide sequence SEQ ID N° 1.

For each SNP, the PCR product will serve as a template for the minisequencing

The total reaction volume of the PCR reaction is 5 µl per sample.

This reaction volume is composed of the reagents indicated in the following table:

Supplier	Reference	Reactant	Initial Conc.	Vol. per tube ( $\mu$ l)	Final Conc.
Life Technology	Delivered with Taq	Buffer (X)	10	0.5	1
Life Technology	Delivered with Taq	MgSO <sub>4</sub> (mM)	50	0.2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0.1	0.2
	On request	Sense Primer ( $\mu$ M)	10	0.1	0.2
	On request	Antisense Primer ( $\mu$ M)	10	0.1	0.2
Life Technology	11304-029	Taq platinum	5U/ $\mu$ l	0.02	0.1 U/ reaction
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	1.98	
		DNA (sample)	2.5 ng/ $\mu$ l	2	5 ng/ reaction
		Total volume		5 $\mu$ l	

These reagents are distributed in a black PCR plate having 384 wells provided by ABGene (ref: TF-0384-k). The plate is sealed, centrifuged, then placed in a thermocycler for 384-well plates (Tetrad of MJ Research) and undergoes the following incubation: PCR Cycles: 1 min at 94° C, followed by 36 cycles composed of 3 steps (15 sec. at 94° C, 30 sec. at 56° C, 1 min at 68° C).

2) The PCR amplified product is then purified using two enzymes: Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) and exonuclease I (Exo I). The first of these enzymes permits the dephosphorylation of the dNTPs which have not been incorporated during the PCR amplification, whereas the second eliminates the single stranded DNA residues, in particular the primers which have not been used during the PCR.

This digestion is done by addition, in each well of the PCR plate, of a reactional mixture of 5  $\mu$ l per sample.

This reactional mixture is composed of the following reagents:

Supplier	Reference	Reactant	Initial Conc.	Vol. per tube ( $\mu$ l)	Final conc.
AP Biotech	E70092X	SAP	1 U/ $\mu$ l	0.5	0.5/ reaction
AP Biotech	070073Z	Exo I	10 U/ $\mu$ l	0.1	1/ reaction
AP Biotech	Supplied with SAP	Buffer SAP (X)	10	0.5	1
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	3.9	
		PCR product		5 $\mu$ l	
		Total vol.		10 $\mu$ l	

Once filled, the plate is sealed, centrifuged, then placed in a thermocycler for 384-well plates (Tetrad of MJ Research) and undergoes the following incubation: Digestion SAP-EXO: 45 min at 37° C, 15 min at 80° C.

The elongation or minisequencing step is then carried out on the product of PCR digested by addition of a reactional mixture of 5  $\mu$ l per prepared sample.

The minisequencing 3) and the reading steps 4) and interpretation of reading 5) are specific to each SNP t110c, t338a, t363c, c427t, c527a, and g1023a.

All these steps are described hereinafter outlining the specific conditions used for each one of these polymorphisms.

### 3) Minisequencing

The sequences of the two minisequencing primers necessary for the genotyping were determined in a way to correspond to the sequence of the nucleotides located upstream of the site of a SNP according to the invention. The PCR product that contains the SNP being a double stranded DNA product, the genotyping can therefore be done either on the sense strand or on the antisense strand. The selected primers are manufactured by Life Technologies Inc.

The following table indicates, for each SNP, the sequence of the minisequencing primers that have been tested and the optimal condition retained for the genotyping:

SNP	Primers tested	Optimal condition retained for the genotyping
t110c	Sense primer: taatttaattttaattgt Antisense primer: tcttttgcttctttalac	antisense primer + ddATP-R110 + ddGTP-Tamra
t338a	Sense primer: ctgaaaacccatgtaaagag Antisense primer: tcttttgcttctttalac	sense primer + dTTP-R110 + ddATP-Tamra
t363c	Sense primer: aaagaaagcaaaaagagaag Antisense primer: atgccctgtgtactttct	sense primer + ddTTP-R110 + ddCTP-Tamra
c427t	Sense primer: tccclatttaaggctaggca Antisense primer: ttctctgaagacctgtctt	sense primer + ddTTP-R110 + ddCTP-Tamra
c527a	Sense primer: tacaatggccttgaccttg Antisense primer: ccaggaggccaccagtaaa	antisense primer + ddGTP-R110 + ddTTP-Tamra
g1023a	Sense primer: gttgtcagagcagaaatcat Antisense primer: gttgacaaaagaaaagatct	sense primer + ddATP-R110 + ddGTP-Tamra

The minisequencing of the SNPs was first validated over 16 samples, then genotyped over the set of the population of individuals composed of 268 individuals and 10 controls.

The elongation or minisequencing step is then carried out as indicated in the following table:

Supplier	Reference	Reactant	Initial conc.	Vol. per tube ( $\mu$ l)	Final conc.
Own preparation		Elongation Buffer <sup>1</sup> (X)	5	1	1
Life Technologies	On request	Miniseq Primer ( $\mu$ M) A or B	10	0.5	1
AP Biotech	27-2051 (61,71,81)-01	ddNTPs <sup>2</sup> ( $\mu$ M) 2 are non labeled	2.5 of each	0.25	0.125 of each
NEN	Nel 472/5 and Nel 492/5	ddNTPs <sup>2</sup> ( $\mu$ M) 2 are labeled with Tamra and R110	2.5 of each	0.25	0.125 of each
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequenase	3.2 U/ $\mu$ l	0.125	0.4 U/ reaction
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	3.125	
		digested PCR product		10	
		Total volume		15	

<sup>1</sup> The 5 X elongation buffer: is composed of 250 mM Tris-HCl pH 9, 250 mM KCl, 25 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 40 % glycerol.

<sup>2</sup> ddNTPs : For the ddNTPs, a mixture of the 4 bases is carried out according to the polymorphism studied. Only the 2 bases of interest (wild-type nucleotide / mutated nucleotide) composing the SNP are labeled, either in Tamra, or in R110. For example:

<sup>3</sup> For SNP c527a, the mixture of ddNTPs is composed of :

- 2.5  $\mu$ M of ddATP non labeled,
- 2.5  $\mu$ M of ddCTP non-labeled,
- 2.5  $\mu$ M of ddTTP (1.875  $\mu$ M of ddTTP non labeled and 0.625  $\mu$ M of ddTTP Tamra labeled),
- 2.5  $\mu$ M of ddGTP (1.875  $\mu$ M of ddGTP non labeled and 0.625  $\mu$ M of ddGTP R110 labeled).

For SNP g1023a, the mixture of ddNTPs is composed of :

- 2.5  $\mu$ M of ddCTP non labeled,
- 2.5  $\mu$ M of ddTTP non-labeled,
- 2.5  $\mu$ M of ddGTP (1.875  $\mu$ M of ddGTP non labeled and 0.625  $\mu$ M of ddGTP Tamra labeled),
- 2.5  $\mu$ M of ddATP (1.875  $\mu$ M of ddATP non labeled and 0.625  $\mu$ M of ddATP R110 labeled).

Once filled, the plate is sealed, centrifuged, then placed in a thermocycler for 384-well plates (Tetrad of MJ Research) and undergoes the following incubation: Elongation cycles : 1 min. at 93° C, followed by 35 cycles composed of 2 steps (10 sec. at 93° C, 30 sec. at 55° C).

After the last step in the thermocycler, the plate is directly placed on a polarized fluorescence reader of type Analyst® HT of LJI Biosystems Inc. The plate is read using Criterion Host® software by using two methods. The first permits reading the Tamra labeled base by using emission and excitation filters specific for this fluorophore (excitation 550-10 nm, emission 580-10 nm) and the second permits reading the R110 labeled base by using the excitation and emission filters specific for this fluorophore (excitation 490-10 nm, emission 520-10 nm). In the two cases, a dichroic double mirror (R110/Tamra) is used and the other reading parameters are:

Z-height: 1.5 mm

Attenuator: out

Integration time: 100,000 µsec.

Raw data units: counts/sec

Switch polarization: by well

Plate settling time: 0 msec

PMT setup: Smart Read (+), sensitivity 2

Dynamic polarizer: emission

Static polarizer: S

A file result is thus obtained containing the calculated values of mP (milliPolarization) for the Tamra filter and that for the R110 filter. These mP values are calculated starting from intensity values obtained on the parallel plane ( $//$ ) and on the perpendicular plane ( $\perp$ ) according to the following formula :

$$MP = 1000((// - g\perp)/(// + g\perp)).$$

In this calculation, the value  $\perp$  is weighted by a factor  $g$ . It is a machine parameter that must be determined experimentally beforehand.

4) and 5) Interpretation of the reading and determination of the genotypes.

The mP values are reported on a graph using Microsoft Inc. Excel

software, and/or Allele Caller® software developed by LJI Biosystems Inc.

On the abscissa is indicated the mP value of the Tamra labeled base, on the ordinate is indicated the mP value of the R110 labeled base. A strong mP value indicates that the base labeled with this fluorophore is incorporated and, conversely, a weak mP value reveals the absence of incorporation of this base.

Up to three homogenous groups of nucleotide sequences having different genotypes are obtained.

The use of the Allele Caller® software permits, once the identification of the different groups is carried out, direct extraction of the genotype defined for each individual in table form.

Results of the minisequencing for the SNPs t110c, t338a, t363c, c427t, c527a, and g1023a

After the completion of the genotyping process, the determination of the genotypes of the individuals of the population of individuals for the SNPs studied here was carried out using the graphs described above.

For SNP t110c, the genotype is in theory either homozygote TT, or heterozygote TC, or homozygote CC in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype CC is not detected in the population of individuals.

For SNP t338a, the genotype is in theory either homozygote TT, or heterozygote TA, or homozygote AA in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype AA is not detected in the population of individuals.

For SNP t363c, the genotype is in theory either homozygote TT, or heterozygote TC, or homozygote CC in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype CC is not detected in the population of individuals.

For SNP c427t, the genotype is in theory either homozygote CC, or heterozygote CT, or homozygote TT in the tested individuals. In reality, and

as shown below, the homozygote genotype TT is not detected in the population of individuals.

For SNP c527a, the genotype is in theory either homozygote CC, or heterozygote CA, or homozygote AA in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype AA is not detected in the population of individuals.

For SNP g1023a, the genotype is in theory either homozygote GG, or heterozygote GA, or homozygote AA in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype AA is not detected in the population of individuals.

The results of the distribution of the determined genotypes in the population of individuals and the calculation of the different allelic frequencies for the 6 SNPs studied are presented in the following tables:

Phylogenetic Population	Total	t110c							Total	
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC		%
African American	50	8.0	(2.7, 13.3)	42	84.0	8	16.0			50
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99	1.0	(0, 2.4)	97	98.0	2	2.0			99
Mexican	10			10	100					10
Non-European Caucasoid	37			37	100					37
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0			10
Southeast Asian	17			17	100					17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>2.1</b>	<b>(0.9, 3.3)</b>	<b>257</b>	<b>95.9</b>	<b>11</b>	<b>4.1</b>			<b>268</b>

Phylogenetic Population	Total	t338a							Total	
		f	(95% CI)	TT	%	TA	%	AA		%
African American	50	17.0	(9.4, 24.6)	31	66.0	16	34.0			47
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0			10
European Caucasoid	99	0.5	(0, 1.5)	98	99.0	1	1.0			99
Mexican	10			10	100					10
Non-European Caucasoid	37	1.4	(0, 4.0)	36	97.3	1	2.7			37
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10			10	100					10
Southeast Asian	17			17	100					17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>3.6</b>	<b>(2.0, 5.2)</b>	<b>246</b>	<b>92.8</b>	<b>19</b>	<b>7.2</b>			<b>265</b>

Phylogenetic Population	Total	t363c							Total	
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC		%
African American	50			48	100					48
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99	0.5	(0, 1.5)	97	99.0	1	1.0			98
Mexican	10			10	100					10
Non-European Caucasoid	37			36	100					36
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10			10	100					10
Southeast Asian	17			17	100					17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>0.2</b>	<b>(0, 0.6)</b>	<b>263</b>	<b>99.6</b>	<b>1</b>	<b>0.4</b>			<b>264</b>

Phylogenetic Population	Total	c427t						Total
		f	(95% CI)	CC	%	CT	%	
African American	50			50	100			50
Amerind	15			15	100			15
Caribbean	10			10	100			10
European Caucasoid	99			99	100			99
Mexican	10			10	100			10
Non-European Caucasoid	37			37	100			37
Northeast Asian	20			20	100			20
South American	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0	10
Southeast Asian	17			17	100			17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>0.2</b>	<b>(0, 0.6)</b>	<b>267</b>	<b>99.6</b>	<b>1</b>	<b>0.4</b>	<b>268</b>

Phylogenetic Population	Total	c527a (A6D)						Total
		f	(95% CI)	CC	%	CA	%	
African American	50			50	100			50
Amerind	15			15	100			15
Caribbean	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0	10
European Caucasoid	99			95	100			95
Mexican	10			10	100			10
Non-European Caucasoid	37			37	100			37
Northeast Asian	20			20	100			20
South American	10			10	100			10
Southeast Asian	17			17	100			17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>0.2</b>	<b>(0, 0.6)</b>	<b>263</b>	<b>99.6</b>	<b>1</b>	<b>0.4</b>	<b>264</b>

Phylogenetic Population	Total	g1023a (M1711)						Total
		f	(95% CI)	GG	%	GA	%	
African American	50			50	100			50
Amerind	15			14	100			14
Caribbean	10	5.0	(0, 14.6)	9	90.0	1	10.0	10
European Caucasoid	99			97	100			97
Mexican	10			10	100			10
Non-European Caucasoid	37			37	100			37
Northeast Asian	20			20	100			20
South American	10			10	100			10
Southeast Asian	17			17	100			17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>0.2</b>	<b>(0, 0.6)</b>	<b>264</b>	<b>99.6</b>	<b>1</b>	<b>0.4</b>	<b>265</b>

In the above tables,

- N represents the number of individuals,
- % represents the percentage of individuals in the specific sub-population,
- the allelic frequency represents the percentage of the mutated allele in the specific sub-population,
- 95 % IC represents the minimal and maximal interval of confidence at 95 %.

It is necessary to specify that, for example for the c527a SNP that has been genotyped in antisense, the allele g read in antisense corresponds to the allele c read in sense, and to the presence of a alanine at position 6 of the amino acid sequence of the immature IFN $\alpha$ -2 protein and therefore that the allele t read in antisense corresponds to the allele a read in sense corresponding to an aspartic acid for this position in the sequence of the corresponding protein.

By examining these results by phylogenic population, and by SNP, it is observed that:

- for SNP t110c, the 11 heterozygote individuals TC come from the phylogenic populations African-American, European Caucasoid, and South American in the population of individuals.
- for SNP t338a, 19 heterozygote individuals TA are found, they come from the phylogenic populations African American, Caribbean, European Caucasoid, Non-European Caucasoid in the population of individuals.
- for SNP t363c, the only heterozygote individual TC comes from the phylogenic population European Caucasoid in the population of individuals.
- for SNP c427t, the only heterozygote individual CT comes from the phylogenic population South American in the population of individuals.
- for SNP c527a, the only heterozygote individual CA comes from the phylogenic population Caribbean in the population of individuals.
- for SNP g1023a, the only heterozygote individual GA comes from the phylogenic population Caribbean in the population of individuals.

Example 5: Study of the biological function of mutated M148I IFN $\alpha$ -2 compared to that of natural wild-type IFN $\alpha$ -2

a) Cloning of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 and mutated (M148I) IFN $\alpha$ -2 in the prokaryotic expression vector pTrc/His-topo

The nucleotide sequences coding for the natural wild-type and mutated IFN $\alpha$ -2 protein are amplified by PCR.

The PCR primers permitting such an amplification are:

Sense primer: CACCCATTTCAACCAGTCTA

Antisense primer: AGCTGGCATACGAATCAAT

The PCR products are inserted in the prokaryotic expression vector pTrc/His-Topo under the control of the Trc hybrid promoter, inducible by IPTG (Iso-Propyl-Thio-Galactoside), by TOPO<sup>TM</sup>-cloning (Invitrogen Corp.).

This vector permits the heterologous expression of eukaryotic proteins in the bacteria thanks to the presence of a mini-cistronic unit.

The wild-type protein and the mutated protein are produced in the form of fusion proteins carrying an N-terminal extension composed of a 6-histidine tail and the epitope for a specific antibody.

It is possible to cleave this additional region by using the Enterokinase endoprotease.

After checking of the nucleotide sequence of the region of the vector coding for the recombinant proteins, the Top 10 strain of *E. coli* (Invitrogen) is transformed with these recombinant expression vectors.

b) Heterologous expression in *E. coli* and purification of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 and mutated M148I mutated polyhistidine IFN $\alpha$ -2

Two saturated pre-cultures of 100 ml of LBA medium (Luria Bertoni + 100  $\mu$ g/mL ampicillin) containing, respectively, a clone coding for wild-type IFN $\alpha$ -2 or that coding for M148I IFN $\alpha$ -2, were carried out for 24 hours at 30°C at an agitation of 200 rotations per minute (rpm). After 24 hours of growth, the cultures were used to inoculate, at 1/10, 900 mL of LBA medium (preincubated over-night at 37°C).

When the second set of cultures reaches a cellular density corresponding to an optical density of 0.8 measured at a wavelength of 600 nm, the expression of the poly-histidine proteins is then induced by the addition of IPTG at a final concentration of 1 mM and the culture is kept for 5 hours at 30 °C with an agitation at 200 rpm.

The pellet of bacteria obtained after centrifugation at 4000 x g, 30 min, 4 °C, is resuspended in 25 mL of buffer A (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 50 mM, imidazole 10 mM, PMSF 0.1 mM pH 8).

A preincubation of 30 min in ice in the presence of 0.5 mg/mL of lysozyme and 20 units of DNase I precedes a sonication carried out in three steps with control of the temperature of the sample (a step delivered 240 Watt per impulse of 10 sec with 10 sec stop, for 1 min). The cell suspension is then clarified by centrifugation at 15,000 x g for 30 min at 4 °C.

The centrifugation supernatant is next filtered on 0.22 micrometer-filter.

The polyhistidine proteins present are then purified by HPLC on HiTrap™ Nickel Affinity resin (Amersham Pharmacia Biotech) previously equilibrated in 50 mM Tris, 300 mM NaCl pH 8.0 (Buffer B). After copiously washing the column with 1M NaCl in 50 mM Tris pH 8.0, the elution of the proteins was induced by a linear gradient of imidazole with concentrations ranging from 0.01 to 0.25 M in buffer B.

The presence of the polyhistidine protein in the collected fractions is verified, on the one hand by SDS PAGE electrophoresis and on the other hand by immunodetection with the aid of a specific antibody directed against the N-terminal end of the fusion protein.

At this stage, the protein of interest is pure up to 80%.

The last step of the purification consists of a separation of the proteins on an ion-exchange chromatography column.

The fractions containing the fusion protein are injected on an anion-exchange column (MiniQ PE 4.6/50, Pharmacia) that was previously equilibrated in buffer 50 mM Tris pH 8. The elution of the proteins is carried out by the passage

of an NaCl gradient ranging from 0 to 500 mM, in buffer 50 mM Tris pH 8.

The purity of the protein of interest is estimated on the SDS/PAGE gel and the protein concentrations were measured by BCA assay (bicinchoninic acid and copper sulfate, Sigma).

The purified wild-type and mutated IFN $\alpha$ -2 proteins containing the N-terminal polyhistidine end are used during the functional tests that consist of measurement of the antiproliferative activity of these two forms of IFN $\alpha$ -2 on the cell growth of the Daudi cell line.

c) Evaluation of the capacity of natural wild-type and mutated M148I IFN $\alpha$ -2 to induce the antiproliferation of the human lymphoblasts of Daudi Burkitt's cell line

These tests are carried out on two different types of IFN $\alpha$ -2, namely: natural wild-type IFN $\alpha$ -2 and M148I IFN $\alpha$ -2. Cells (human Daudi Burkitt's lymphoma cell line, hereinafter called "Daudi cells") cultivated beforehand in a RPMI 1640 medium (supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM of L-Glutamine) are inoculated in 96-well plates at the cellular density of  $4 \cdot 10^4$  cells/well.

In each well, Daudi cells are placed in contact of increasing concentrations of either natural wild-type or mutated IFN $\alpha$ -2.

For each of the wild-type and mutated IFN $\alpha$ -2, final concentrations of 0.003 pM to 600 nM are tested.

Eight different cultures, and therefore different measurements, are carried out in parallel for both proteins and for each concentration.

The Daudi cells are then cultivated for 66 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.

After 66 h of growth the antiproliferative effect of each IFN $\alpha$ -2 is determined by the number of living cells still presenting mitochondrial dehydrogenase activity. The activity of these dehydrogenases can be detected in the presence of 12 mM MTT (incubated 4 h at 37 °C), by monitoring the optical density at 550 nm corresponding to the formation of formazan crystals derived from cleaving the tetrazolium salt, MTT.

The antiproliferative activity of the wild-type IFN $\alpha$ -2 or M148I

mutated IFN $\alpha$ -2 is based on the measurements of the IC<sub>50</sub> corresponding to the concentration of IFN $\alpha$ -2 inhibiting 50% of the cell growth.

The results obtained are illustrated in Figure 3.

For each concentration of wild-type and mutated (M148I) proteins, the points represented on the graph are the mean of four measurements performed on the four cultures made in parallel for each of the proteins and concentrations.

The average IC<sub>50</sub> value measured for the wild-type IFN $\alpha$ -2 is 0.3, whereas the average IC<sub>50</sub> value measured for the mutated M148I IFN $\alpha$ -2 is 5.0. Thus, the ratio corresponding to the value of the IC<sub>50</sub> of the mutated protein over the value of the natural wild-type protein reaches 15.3.

This test demonstrates that the cellular antiproliferative activity is greatly decreased in the case of M148I mutated IFN $\alpha$ -2 by comparison with wild-type IFN $\alpha$ -2.

d) Evaluation of the capacity of natural wild-type and mutated M148I IFN $\alpha$ -2 to activate signal transduction in the breast carcinoma cell line MCF-7

The interferons are known to act through signaling pathways involving the JAK (Janus Kinase) and the STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) proteins. The binding of interferon to its receptor induces phosphorylation of the JAK proteins which in turn activate by phosphorylation the STAT proteins. Activated STAT proteins translocate to the nucleus where they bind to interferon response elements on gene promoters, which stimulates transcription of the respective genes. To study the signaling pathways initiated by interferon, the reporter gene technique was used. The procedure is described below.

The breast carcinoma cells MCF-7 (ECACC) were seeded at a density of  $1.10^4$  cells/well in 96-well plates in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum for 24 hours. Cells were then transfected for 6 hours with a reporter gene construct (pSRE-Luc) coding for the Firefly Luciferase placed under the control of the Interferon-Stimulated Response Element (Clontech)

using Superfect (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Then, culture media were changed and cells were incubated over-night in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C after which they were stimulated with various doses of wild-type or mutated IFN $\alpha$ -2 protein for 6 hours at 37°C. After stimulation, culture media were discarded and replaced with 100 $\mu$ l/well of Phosphate Buffered Saline (PBS)/1mM MgCl<sub>2</sub>. Luciferase activity was measured in a MicroBeta counter (Perkin-Elmer) following addition of 100 $\mu$ l/well of the substrate LucLite-Plus (Packard).

Results are expressed as the percentage of maximal stimulation of the Luciferase activity. The measurements were performed three times, and the values given here represent the means of the triplicate determinations.

The ability of the wild-type IFN $\alpha$ -2 or mutated M148I IFN $\alpha$ -2 to trigger the signal transduction cascades is based on the measurements of their Efficacy Doses at 50% (EC50's) corresponding to their respective concentrations stimulating 50% of the Luciferase activity (the maximal stimulation is considered as being 100% activity).

The average EC50 value measured for the wild-type IFN $\alpha$ -2 is 12.33 pM.

The average EC50 value measured for the mutated M148I IFN $\alpha$ -2 is 122 pM.

Thus, the ratio corresponding to the EC50 value for the mutated protein over the EC50 value for the wild-type protein reaches 9.91 (with a standard deviation of 3.4).

Consequently, this test demonstrates that the biological activity of mutated M148I IFN $\alpha$ -2 is 10 times less than that of wild-type IFN $\alpha$ -2 based on its capacity to activate the interferon signaling pathway.

#### 4. Brief Description of Drawings

~~\_\_\_\_\_ The invention is also directed to the use of polynucleotides and of polypeptides in conformity with the invention as well as of therapeutic molecules obtained and/or identified starting from these polynucleotides and polypeptides, notably for the prevention and the treatment of certain human disorders and/or diseases.~~

Figure 1 represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP M148I and the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein.

Figure 2 represents a close up of the model of the right part of each one of the proteins represented in Figure 1.

The darker ribbon of Figure 1 represents the structure of the natural wild-type IFN $\alpha$ -2 protein. The lighter ribbon of Figure 1 represents the structure of the M148I mutated IFN $\alpha$ -2 protein.

Figure 3 represents the results of the test for measuring the antiproliferative effect of a polypeptide of the invention and a polypeptide encoded by the reference wild-type gene of human IFN $\alpha$ -2, on the Daudi Burkitt's cell line.

In this figure, the abscissas correspond to the logarithm of the protein concentration in picomoles (pM) and the ordinates correspond to the percentage of cell proliferation.

The antiproliferative effect of the wild-type IFN $\alpha$ -2 is represented by triangles and the antiproliferative effect of the mutated IFN $\alpha$ -2 is represented by circles.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

##### Definitions

By "nucleotide sequence of the reference wild-type gene" is understood the nucleotide sequence SEQ ID N° 1 of the human gene.

This sequence is accessible in GenBank under Accession number J00207, V11834 and described in Olopade OI., Bohlander Sk. "Mapping of the

FIGURE 1

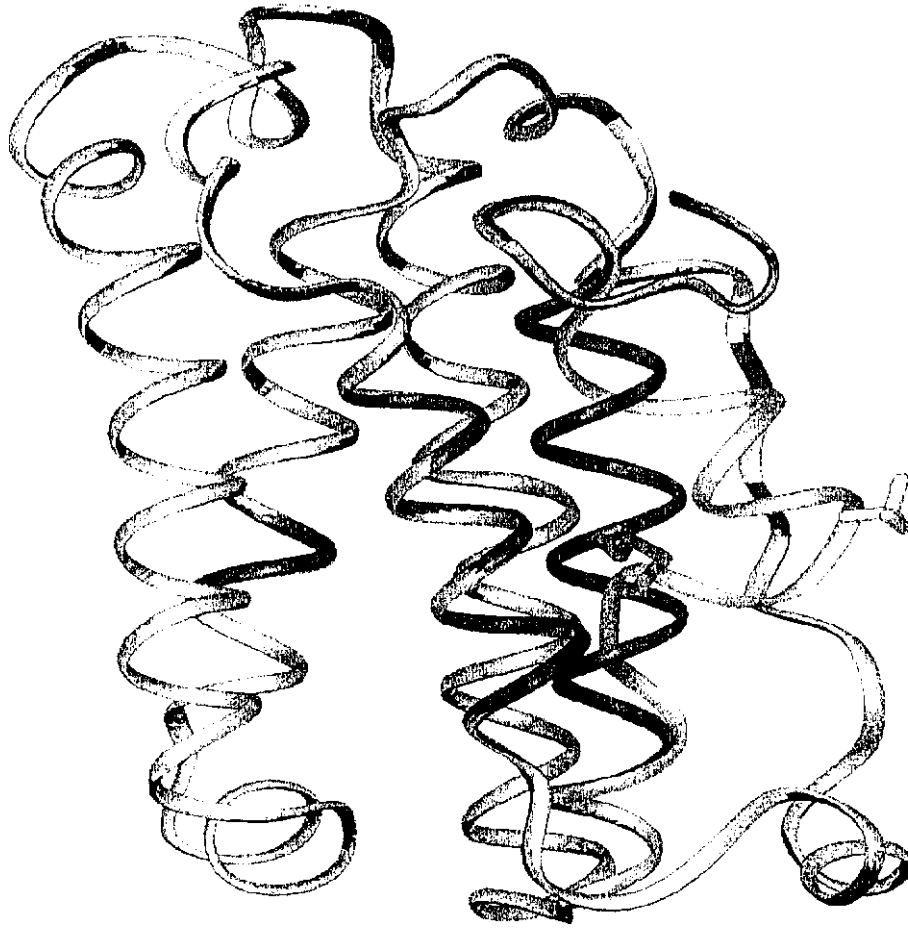
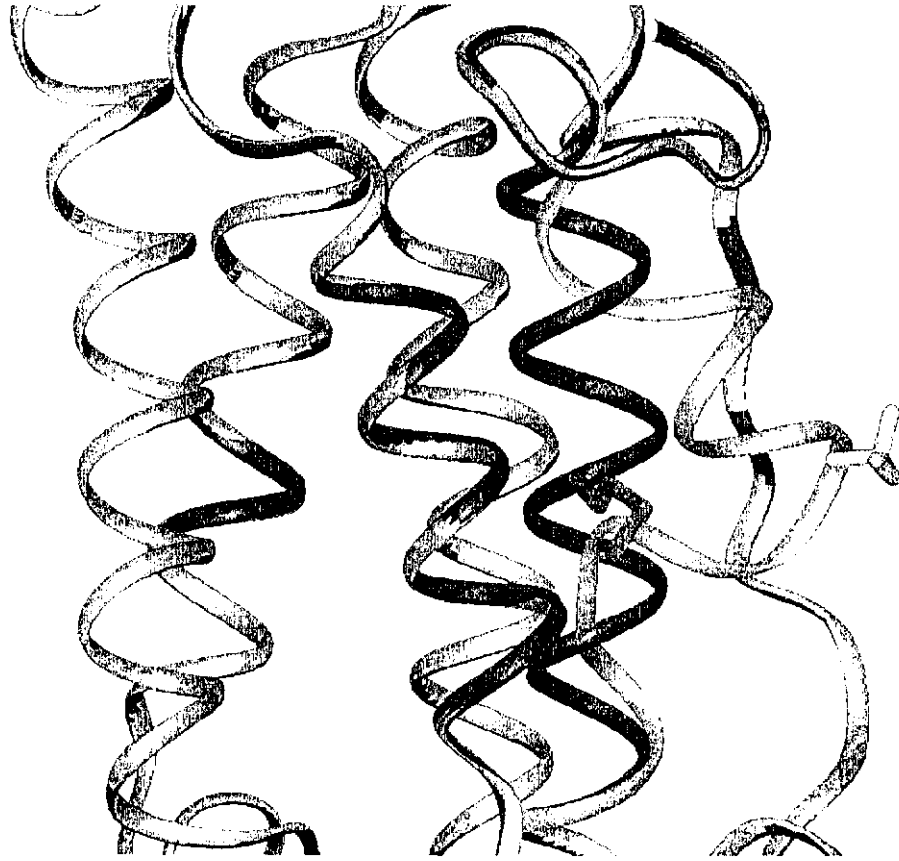


FIGURE 2



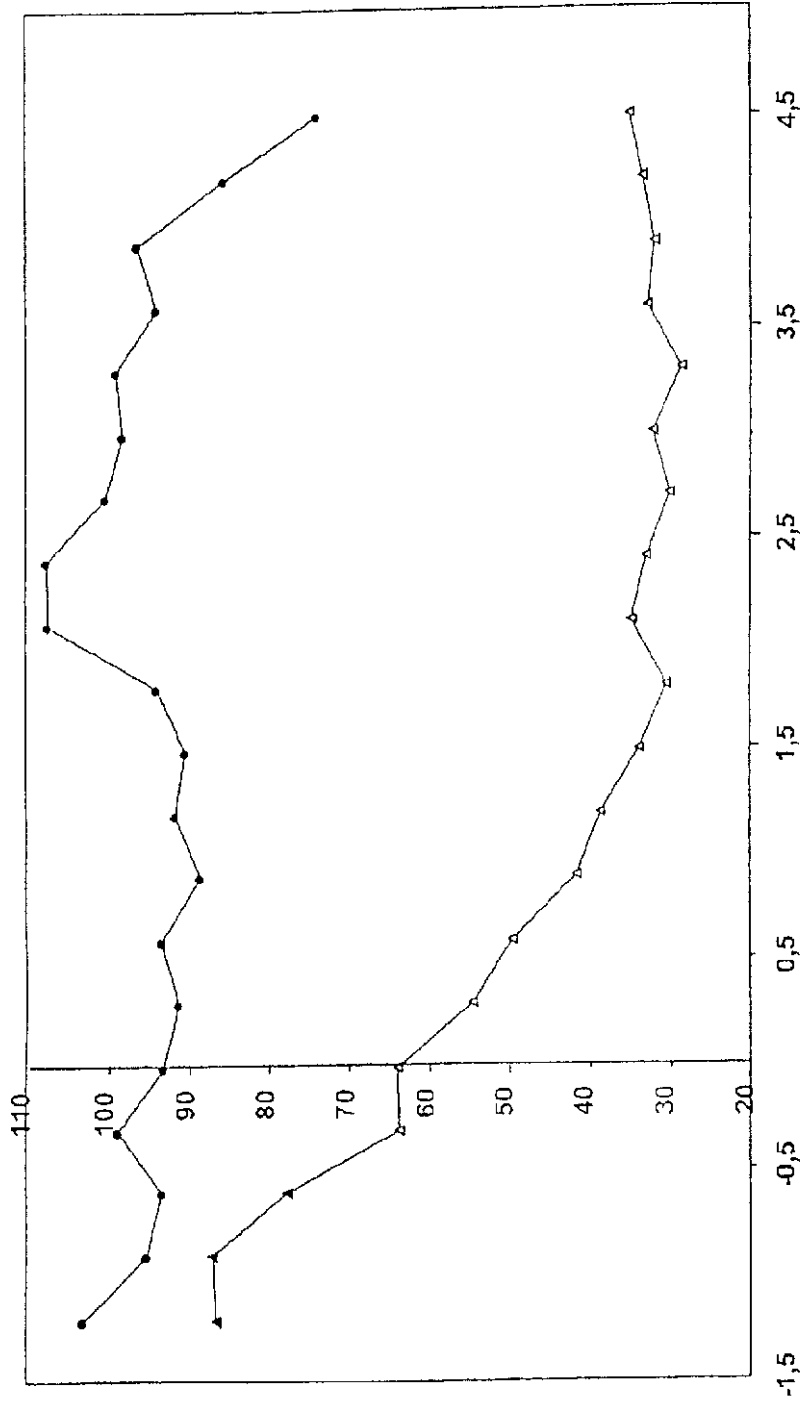


FIGURE 3

## 1. Abstract

The present invention relates to new polynucleotides deriving from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -2 gene and comprising new SNP(s). The present invention also concerns new polypeptides derived from the natural wild-type protein IFN $\alpha$ -2 and comprising a mutation caused by the SNP(s) of the invention. The present invention is also directed to the therapeutic uses of said new polynucleotides and polypeptides.

专利名称(译)	IFN $\alpha$ 2基因的新多核苷酸和多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003000281A</a>	公开(公告)日	2003-01-07
申请号	JP2002053157	申请日	2002-02-28
申请(专利权)人(译)	Jen'odise		
[标]发明人	ジャンルイ エスカリ		
发明人	ジャン-ルイ エスカリ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/711 A61K38/21 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/04 A61P9/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 C07H21/00 C07K14/56 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/21 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/212 A61P1/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 C07K14/56 C12Q1/6883 C12Q2600/156		
FI分类号	A61K31/711 A61K39/395.F A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P3/04 A61P9/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00.101 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 C07H21/00 C07K14/56 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/66.F A61K38/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA23 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ47 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG09 4B064/AG26 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA03 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BB15 4B065/CA24 4B065/CA44 4C057/BB02 4C057/DD01 4C057/MM02 4C057/MM04 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA35 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/DA22 4C084/MA35 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA06 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA121 4C084/ZA161 4C084/ZA181 4C084/ZA361 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA701 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB071 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZC551 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA12 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA70 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB07 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZC55 4C086/ZC78 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA16 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	2001002843 2001-03-01 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

(经修改) 要解决的问题: 提供新的多肽和新的多核苷酸, 其具有不同于天然野生型IFN $\alpha$ -2蛋白的功能。本发明涉及衍生自IFN $\alpha$ -2基因的核苷酸序列并包含新SNP的新多核苷酸。本发明还涉及衍生自天然野生型蛋白IFN $\alpha$ -2的新多肽, 其包含由本发明的SNP引起的突变。本发明进一步涉及新型多核苷酸和多肽在治疗上的用途, 例如在癌症和肿瘤, 感染, 中枢神经系统疾病等中的用途。

系統群		特異的民族群		合計	%
アフリカ系アメリカ人	アフリカ系アメリカ人	小計	50	100.0	18.7
			50		
アメリカインディアン	南アメリカアンデス		10	86.7	
	南西アメリカインディアン		5	33.3	
	小計		15	5.6	
カリブ人	カリブ人	小計	10	100.0	
			10	3.7	
ヨーロッパ系コーカソイド	北アメリカカカフカス人		79	79.8	
	イベリア人		10	10.1	
	イタリア人		10	10.1	
	小計		99	36.9	
メキシコ人	メキシコ人	小計	10	100.0	
			10	3.7	
北東アジア人	中国人		10	50.0	
	日本人		10	50.0	
	小計		20	7.5	
非ヨーロッパ系コーカソイド	ギリシア人		8	21.6	
	インドーパキスタン人		9	24.3	
	中東の人		20	54.1	
	小計		37	13.8	
東南アジア人	太平洋諸島の人		7	41.2	
	南アジア人		10	58.8	
	小計		17	6.3	
南アメリカ人	南アメリカ人	小計	10	100.0	
			10	3.7	
合計				288	100