

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500029

(P2005-500029A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 35/12</b>	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 35/72</b>	A 6 1 K 35/72	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 35/74</b>	A 6 1 K 35/74 Z	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 157 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-503798 (P2003-503798)	(71) 出願人	502073278 ジェンオディセ
(86) (22) 出願日	平成14年6月11日 (2002.6.11)		フランス国, 9 1 9 7 4 クールタブーフ
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月11日 (2003.12.11)		, レ ユリ, ベ. ペ. 8 1 0, バ アルフ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/007456		ア, アブニユ デュ カナダ 3, パルク
(87) 国際公開番号	W02002/101048		ダフェーレ テクノポリ
(87) 国際公開日	平成14年12月19日 (2002.12.19)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	01/07588		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成13年6月11日 (2001.6.11)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I F N  $\alpha$ -7 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】

本発明は、新規 S N P を含んで成る、I F N  $\alpha$ -7 遺伝子のヌクレオチド配列に由来する新規ポリヌクレオチド、及びこれらの S N P によって生じた突然変異を含んで成る、天然の野生型 I F N  $\alpha$ -7 タンパク質に由来する新規ポリペプチド、並びにそれらの治療上の使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a)ヌクレオチド配列である配列番号 1 の全部又は一部であって、但し、そのようなヌクレオチド配列、又は配列の一部が、a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, 及びa1212gから成る群から選択される少なくとも 1 つの SNP を含んで成るもの、あるいは

b) a) の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】

配列番号 1 のヌクレオチド 751 ~ 1320 を含んで成る、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、但し、当該配列が、t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, 及びg1181aから成る群から選択される、少なくとも 1 つのコード SNP を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが、少なくとも 10 個のヌクレオチドから構成される、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

アミノ酸配列である配列番号 2 の全部又は一部を含んで成り、且つ V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, 及びR144K から成る群から選択される少なくとも 1 つのコード SNP を有す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。

## 【請求項 5】

アミノ酸配列である配列番号 2 の全部又は一部を含んで成り、且つコード SNP D95N を有す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。

## 【請求項 6】

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の全部又は一部を同定し、あるいは増幅する方法であって、適当なハイブリダイゼーション条件下で、前記ポリヌクレオチドを請求項 1 に記載のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含んで成る方法。

## 【請求項 7】

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の全部又は一部を遺伝子型判定するための方法であって、対象者又は対象者群のゲノム DNA の注目の領域を増幅し、そして 559, 580, 667, 682, 779, 1033, 1084, 1125, 1135, 1161, 1166, 1181, 及び 1212 から成る群から選択される、ヌクレオチド配列である配列番号 1 中の少なくとも 1 つの位置の対立遺伝子を決定する段階、を含んで成る方法。

## 【請求項 8】

遺伝子型判定がミニシーケンスによって実施される、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含んでなる組換えベクター。

## 【請求項 10】

請求項 9 に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞。

## 【請求項 11】

ポリペプチドを分離するための方法であって、請求項 10 に記載の宿主細胞を培養液中で培養し、そして前記ポリペプチドを培養液から分離することを含んで成る方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

## 【請求項 13】

アミノ酸配列である配列番号 2 の全部又は一部を含んで成り、且つ V10A, D95N, 50

10

20

30

40

50

L 1 1 2 I , V 1 2 9 L , F 1 3 9 S , 及び R 1 4 4 K から成る群から選択される少なくとも1つのコード SNP を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 1 4】

アミノ酸配列である配列番号 2 のアミノ酸 2 4 ~ 1 8 9 を含んで成り、且つ V 1 0 A , D 9 5 N , L 1 1 2 I , V 1 2 9 L , F 1 3 9 S , 及び R 1 4 4 K から成る群から選択される少なくとも1つのコード SNP を有する、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 5】

アミノ酸配列である配列番号 2 の 2 4 ~ 1 8 9 のアミノ酸を含んで成り、且つコード SNP D 9 5 N を有する、請求項 1 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 6】

免疫特異的抗体を得るための方法であって、動物を請求項 1 2 に記載のポリペプチドで免疫化し、そして前記抗体を前記動物から回収すること、を含んで成る方法。

10

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の方法から生じる免疫特異的抗体。

【請求項 1 8】

試験される 1 又は複数の化合物の中から、アミノ酸配列である配列番号 2 の全部又は一部を含んで成り、且つ V 1 0 A , D 9 5 N , L 1 1 2 I , V 1 2 9 L , F 1 3 9 S , 及び R 1 4 4 K から成る群から選択される少なくとも1つのコード SNP を有する単離されたポリペプチドの活性を活性化し、又は阻害する物質を同定するための方法であって、

a) 請求項 9 に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞を提供し、

b) 前記宿主細胞を試験される前記化合物と接触させ、

c) 前記ポリペプチドの活性に対する活性又は阻害作用を決定し、それにより前記活性又は阻害物質を同定すること、

を含んで成る方法。

20

【請求項 1 9】

試験される 1 又は複数の化合物の中から、アミノ酸配列である配列番号 2 の全部又は一部を含んで成り、且つ V 1 0 A , D 9 5 N , L 1 1 2 I , V 1 2 9 L , F 1 3 9 S , 及び R 1 4 4 K から成る群から選択される少なくとも1つのコード SNP を有する単離されたポリペプチドによって活性が増強され又は阻害される物質を同定するための方法であって、

a) 請求項 9 に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞を提供し、

b) 前記宿主細胞を試験される前記化合物と接触させ、

c) 前記物質の活性に対する増強又は阻害作用を決定し、それにより前記の増強され又は阻害された物質を同定すること、

を含んで成る方法。

30

【請求項 2 0】

対象者の生物学的特性を解析するための方法であって、以下の段階：

a) 対象者のゲノムにおける、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの有無を決定し、

b) 対象者における、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを決定し、

c) 対象者における、請求項 1 2 に記載のポリペプチドの有無を決定し、

d) 対象者における、請求項 1 2 に記載のポリペプチドの濃度を決定し；あるいは

e) 対象者における、請求項 1 2 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つを実施すること、を含んで成る方法。

40

【請求項 2 1】

ヌクレオチド配列、又はヌクレオチド配列の一部が、a 5 5 9 c , g 5 8 0 a , c 6 6 7 t , c 6 8 2 t , t 7 7 9 c , g 1 0 3 3 a , c 1 0 8 4 a , g 1 1 2 5 a , g 1 1 3 5 t , g 1 1 6 1 a , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , 及び a 1 2 1 2 g , から成る群から選択される少なくとも1つの SNP を含んで成る、ヌクレオチド配列である配列番号 1、あるいは前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、の全部又は一部を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター；前記組換えベクターを含んで成る宿主細胞；アミノ酸配列である配列番号 2 の全部又は一部を含んで成り、且つ V 1 0

50

A, D 9 5 N, L 1 1 2 I, V 1 2 9 L, F 1 3 9 S, 及び R 1 4 4 K から成る群から選択される少なくとも1つのコードSNPを有する、単離されたポリペプチド；前記ポリペプチドに特異的な抗体、から成る群から選択される、1又は複数の化合物を含んで成る治療物質。

【請求項22】

個体における、ガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及びノ又は自己免疫疾患及び障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法に関連する障害から成る群から選択される疾患を予防又は処置する方法であって、前記個体に対し、有効量の請求項21に記載の物質、及び医薬として許容される賦形剤を投与することを含んで成る方法。

10

【請求項23】

前記ガン及び腫瘍が、転移型腎ガン、黒色腫を含んで成るガン腫、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞性リンパ腫を含んで成るリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含んで成る白血病、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であってエイズの場合にはカポジ肉腫を含んで成るもの、を含んで成る、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記代謝病が肥満のような非免疫関連疾患を含んで成る、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記感染症が、慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズを含んで成るウイルス感染、感染性肺炎、及び性病、例えば生殖器疣、を含んで成る、請求項22に記載の方法。

20

【請求項26】

前記の中枢神経系の疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含んで成る、請求項22に記載の方法。

【請求項27】

前記免疫関連疾患及び自己免疫疾患が、組織又は器官の移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含んで成る、請求項22に記載の方法。

【請求項28】

個体における、創傷治癒、透析患者の貧血、及び骨粗鬆症から成る群から選択される疾患を予防又は処置するための方法であって、前記個体に対し、有効量の請求項21に記載の物質、及び医薬として許容される賦形剤を投与することを含んで成る方法。

30

【請求項29】

対象者における、請求項12に記載のポリペプチドの活性を増大又は低下させるための方法であって、治療的に有効な量の1又は複数の：ヌクレオチド配列、又はヌクレオチド配列の一部が、a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, 及びa1212g, から成る群から選択される少なくとも1つのSNPを含んで成るヌクレオチド配列である配列番号1、あるいは前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、の全部又は一部を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター；前記組換えベクターを含んで成る宿主細胞であって、処置される前記対象者から得られうる宿主細胞；アミノ酸配列である配列番号2の全部又は一部を含んで成り、且つV10A, D95N, L112I, V129L, F139S, 及びR144Kから成る群から選択される少なくとも1つのコードSNPを有する、単離されたポリペプチド；前記ポリペプチドに特異的な抗体；及び医薬として許容される賦形剤、を投与することを含んで成る方法。

40

【請求項30】

個体における、請求項1に記載のポリヌクレオチドの前記個体のゲノムの存在に関連する障害又は疾患を予防又は処置するための方法であって、治療的に有効な量の1又は複数の：ヌクレオチド配列である配列番号1の全部又は一部を含んで成り、且つa559c, g5

50

80a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, 及びa1212gから成る群から選択される少なくとも1つのSNPを有する、単離されたポリヌクレオチド、あるいは前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列の全部又は一部を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター；前記組換えベクターを含んで成る宿主細胞であって、処置される前記対象者から得られうる宿主細胞；アミノ酸配列である配列番号2の全部又は一部を含んで成り、且つV10A, D95N, L112I, V129L, F139S, 及びR144Kから成る群から選択される少なくとも1つのコードSNPを有する、単離されたポリペプチド；前記ポリペプチドに特異的な抗体；及び医薬として許容される賦形剤、を投与することを含んで成る方法。

10

【請求項31】

IFN - 7 遺伝子内の、a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, 及びa1212gから成る群から選択される少なくとも1つのSNPと、疾患又は疾患に対する抵抗性、との間の統計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疾患又は疾患に対する抵抗性の分布を決定し、
  - c) 遺伝子型のデータと、前記疾患又は疾患に対する抵抗性とを比較し、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、
- を含んで成る方法。

20

【請求項32】

疾患の予後又は疾患に対する抵抗性を診断し、又は決定するための方法であって、IFN - 7 遺伝子内の、a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, 及びa1212gから成る群から選択される少なくとも1つのSNPを検出することを含んで成る方法。

【請求項33】

試験される1又は複数の化合物の中から、D95N突然変異型IFN - 7の遺伝子産物と実質的に同程度の生物学的活性を有する化合物を同定するための方法であって、

- a) 試験される化合物の生物活性、例えば、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、CD4+又はCD8+Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、in vitro又はin vivoでの抗ウイルス活性、悪性フレンド赤白血病細胞をあらかじめ接種されたマウスにおける抗腫瘍活性、Daudi Burkitt's細胞系に対する細胞性の抗増殖活性、TF-1細胞系に対する細胞性の抗増殖活性を決定し；
- b) 前記化合物の段階a)で決定した活性を、D95N突然変異型IFN - 7の遺伝子産物の活性と比較し、
- c) 段階b)で実施した比較に基づき、前記化合物が、D95N突然変異型IFN - 7の遺伝子産物と比較して、実質的に同程度又はそれより低い、又はそれより高い活性を有するか否かを決定すること、を含んで成る方法。

30

【請求項34】

試験される化合物が、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、アミノ酸配列である配列番号2のポリペプチド、又はアミノ酸配列である配列番号2の24から189位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列のポリペプチド、であって、但し、アミノ酸配列がD95N SNPを含んで成るもの、と同一の三次元構造及び/又は化学作用を有する、請求項33に記載の方法。

40

【請求項35】

請求項33に記載の方法によって同定される化合物。

【請求項36】

個体における、ガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患及び

50

障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法に関連する障害から成る群から選択される疾患を予防又は処置する方法であって、前記個体に対し、有効量の請求項 3 5 に記載の化合物、及び医薬として許容される賦形剤を投与することを含んで成る方法。

【請求項 3 7】

前記ガン及び腫瘍が、転移型腎ガン、黒色腫を含んで成るガン腫、濾胞性リンパ腫及び皮膚 T 細胞性リンパ腫を含んで成るリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含んで成る白血病、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であってエイズの場合にはカポジ肉腫を含んで成るもの、を含んで成る、請求項 3 6 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記感染症が、慢性 B 型及び C 型肝炎並びに HIV / エイズを含んで成るウイルス感染、感染性肺炎、及び性病、例えば生殖器疣、を含んで成る、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記免疫関連疾患及び自己免疫疾患が、組織又は器官の移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含んで成る、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記の中枢神経系の疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含んで成る、請求項 3 6 に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

前記代謝病が肥満のような非免疫関連疾患を含んで成る、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

個体における、創傷治癒、透析患者の貧血、及び骨粗鬆症から成る群から選択される疾患を予防又は処置するための方法であって、前記個体に対し、有効量の請求項 3 5 に記載の化合物、及び医薬として許容される賦形剤を投与することを含んで成る方法。

【請求項 4 3】

1 又は複数の：ヌクレオチド配列である配列番号 1 の全部又は一部を含んで成り、且つ a 5 5 9 c , g 5 8 0 a , c 6 6 7 t , c 6 8 2 t , t 7 7 9 c , g 1 0 3 3 a , c 1 0 8 4 a , g 1 1 2 5 a , g 1 1 3 5 t , g 1 1 6 1 a , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , 及び a 1 2 1 2 g から成る群から選択される少なくとも 1 つの SNP を有する、単離されたポリヌクレオチド、あるいは前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列の全部又は一部、を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター；前記組換えベクターを含んで成る宿主細胞；アミノ酸配列である配列番号 2 の全部又は一部を含んで成り、且つ V 1 0 A , D 9 5 N , L 1 1 2 I , V 1 2 9 L , F 1 3 9 S , 及び R 1 4 4 K から成る群から選択される少なくとも 1 つのコード SNP を有する、単離されたポリペプチド；前記ポリペプチドに特異的な抗体、を含んで成る診断キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、2 0 0 1 年 6 月 1 1 日に出願された、表題「Nouveaux polynucleotides et polipeptides de l'IFN alpha 7」のフランス国特許出願番号第 0 1 0 7 5 8 8 号に対し優先権を主張するものである。

40

【0 0 0 2】

本発明は、新規 SNP を含んで成る、IFN - 7 遺伝子のヌクレオチド配列に由来する新規ポリヌクレオチド、及びこれらの SNP によって生じた突然変異を含んで成る、天然の野生型 IFN - 7 タンパク質に由来する新規ポリペプチド、並びにそれらの治療上の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

50

以降 I F N - 7 と称する、インターフェロンアルファ 7 遺伝子は、以下の刊行物に記載されている：

- Olopade, O. I. ;Bohlander, S. K.; Pomykala, H.; Maltepe, E.; Van Melle, E.; Le Beau, M. M.; Diaz, M.O. : "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia." ; Genomics 14:437- 443,1992.

- Henco K, Brosius J, Fujisawa A, Fujisawa JI, Haynes JR, Hochstadt J, Kovacic T, Pasek M, Schambock A, Schmid J, et al. : "Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes." ; J Mol Biol 1985 Sep 20; 185 (2): 227-60.

- Ullrich A, Gray A, Goeddel DV, Dull TJ: "Nucleotide sequence of a portion of human chromosome 9 containing a leukocyte interferon gene cluster." ; J Mol. Biol. 1982 Apr 15; 156 (3): 467-86. 10

【 0 0 0 4 】

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 X 0 2 9 6 0 のもとアクセス可能である。

【 0 0 0 5 】

I F N 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。

【 0 0 0 6 】

I F N 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。 20

【 0 0 0 7 】

I F N はまた、腎ガンにおける E G F 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 *i n v i t r o* 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。

【 0 0 0 8 】

I F N 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 I S R E 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 I S R E 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。 30

【 0 0 0 9 】

I F N が異なる障害及び / 又はヒトの疾患、例えば、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 A I D S、感染性肺炎、潰瘍性大腸炎、中枢神経系等の疾患、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、又は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。

【 0 0 1 0 】

I F N 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 A I D S の場合にはカポジ肉腫に特に使用される。 I F N 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。 I F N はまた、生殖器のイボ又は性病の処置について F D A ( 食品医薬品局 ) によって承認されている。 40

【 0 0 1 1 】

しかしながら、I F N 、特に I F N - 7 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。

【 0 0 1 2 】

更に、IFN で処置された患者は、これらの分子を中和する抗体を産生することができ、その結果それらの有効性が低下する。

【0013】

本発明者は、天然の野生型IFN-7タンパク質と異なる機能性を有しうる、IFN-7遺伝子に対する新規ポリペプチド及び新規ポリヌクレオチド類似体、を発見した。

【0014】

これらの新規ポリペプチド及びポリヌクレオチドは、前文で言及した障害又は疾患を処置又は予防し、そしてそれらに縛られている欠点の全部又は一部を回避するために特に使用されうる。

【0015】

本発明の簡単な要約

本発明は、第一の目的として、参照野生型IFN-7遺伝子のヌクレオチド配列と異なる、すなわち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を有する。

【0016】

ヒト参照野生型IFN-7遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1は、1983ヌクレオチドから成り、そしてヌクレオチド751(開始コドン)からヌクレオチド1320(終止コドン)の、570ヌクレオチドのコード配列を含んで成る。

【0017】

本出願人は、参照野生型IFN-7遺伝子のヌクレオチド配列において14個のSNPを同定してきた。これらの14個のSNPは以下の通りである：a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294c。

【0018】

当然のことながら、本発明の意味においては、前文で限定したSNPの位置に相当する番号付けは、ヌクレオチド配列である配列番号1の番号付けと関連している。

【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相当する。

【0020】

最初の文字は野生型のヌクレオチドに相当し、一方、最後の文字は変異型ヌクレオチドに相当する。

【0021】

したがって、例えばSNP g1033aは、参照野生型IFN-7遺伝子のヌクレオチド配列である配列番号1の、1033位のヌクレオチドであるグアニン(g)が、ヌクレオチドであるアデニン(a)に変異したことに相当する。

【0022】

これらのSNPは、表題「Process for the determination of one or several functional polymorphism(s) in the nucleotide sequence of a preselected functional candidate gene and its applications」の、2000年12月6日に出願された出願人の特許出願FR0022894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、例えば、コード配列を含んで成る、IFN-7遺伝子のヌクレオチド配列のフラグメントが、無作為に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、DHP LC(「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IF

10

20

30

40

50

N - 7 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は、続いて参照野生型 I F N - 7 遺伝子のフラグメントのヌクレオチド配列と比較され、そして本発明に基づく S N P が同定された。

【0027】

この様に S N P 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 I F N - 7 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 166 アミノ酸の成熟タンパク質に変換される、アミノ酸配列である配列番号 2 に相当する、189 アミノ酸の未成熟タンパク質をコードする。 10

【0029】

本発明のコード S N P のそれぞれ、すなわち、t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, a1294c は、アミノ酸配列のレベルで、I F N - 7 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：

【0031】

S N P t779c は、アミノ酸配列である配列番号 2 に相当する、I F N - 7 遺伝子によってコードされる未成熟タンパク質の 10 位にあるアミノ酸であるバリン (V) をアラニン (A) に変異させる。この S N P は、タンパク質成熟の過程の間に開裂するシグナル配列に位置するアミノ酸に影響を与え、そして、それ故にこの S N P は、当該成熟タンパク質上に見られない。本発明の記載において、この S N P によってコードされる突然変異は、V10A と称されることもある。 20

【0032】

S N P g1033a は、アミノ酸配列である配列番号 2 に相当する、I F N - 7 遺伝子の未成熟タンパク質の 95 位にあるアミノ酸、アスパラギン酸 (D) の、アスパラギン (N) への突然変異、そして成熟タンパク質の 72 位にあるものの突然変異をもたらす。本発明の記載において、D72N 及び D95N は、それぞれ成熟タンパク質と、又は未成熟タンパク質と言及されるかどうかにより区別することなくこの S N P によってコードされる突然変異と称される。 30

【0033】

S N P c1084a は、アミノ酸配列である配列番号 2 に相当する、I F N - 7 遺伝子の未成熟タンパク質の 112 位にあるアミノ酸、ロイシン (L) の、イソロイシン (I) への突然変異、そして成熟タンパク質の 89 位にあるものの突然変異をもたらす。本発明の記載において、L89I 及び L112I は、それぞれ成熟タンパク質と、又は未成熟タンパク質と言及されるかどうかにより区別されることなくこの S N P によってコードされる突然変異と称される。

【0034】

S N P g1135t は、アミノ酸配列である配列番号 2 に相当する、I F N - 7 遺伝子の未成熟タンパク質の 129 位にあるアミノ酸、バリン (V) の、ロイシン (L) への突然変異、そして成熟タンパク質の 106 位にあるものの突然変異をもたらす。本発明の記載において、V106L 及び V129L は、それぞれ成熟タンパク質と、又は未成熟タンパク質と言及されるかどうかにより区別されることなくこの S N P によってコードされる突然変異と称される。 40

【0035】

S N P t1166c は、アミノ酸配列である配列番号 2 に相当する、I F N - 7 遺伝子の未成熟タンパク質の 139 位にあるアミノ酸、フェニルアラニン (F) の、セリン (S) への突然変異、そして成熟タンパク質の 116 位にあるものの突然変異をもたらす。 50

本発明の記載においては、F 1 1 6 S 及び F 1 3 9 S は、それぞれ成熟タンパク質と、又は未成熟タンパク質と言及されるかどうかにより区別されることなくこのSNPによってコードされる突然変異と称される。

【0036】

SNP g1181aは、アミノ酸配列である配列番号2に相当する、IFN - 7 遺伝子の未成熟タンパク質の144位にあるアミノ酸、アルギニン(R)の、リジン(K)への突然変異、そして成熟タンパク質の121位にあるものの突然変異をもたらす。本発明の記載においては、R121K及びR144Kは、それぞれ成熟タンパク質と、又は未成熟タンパク質と言及されるかどうかにより区別されることなくこのSNPによってコードされる突然変異と称される。

10

【0037】

SNP a1294cは、アミノ酸配列である配列番号2に相当する、IFN - 7 遺伝子の未成熟タンパク質の182位にあるアミノ酸、リジン(K)の、グルタミン(Q)への突然変異、そして成熟タンパク質の159位にあるものの突然変異をもたらす。本発明の記載においては、K159Q及びK182Qは、それぞれ成熟タンパク質と、又は未成熟タンパク質と言及されるかどうかにより区別されることなくこのSNPによってコードされる突然変異と称される。

【0038】

SNP g1033a(D95N), t1166c(F139S), g1181a(R144K), a1294c(K182Q)は、野生型参照IFN - 7 遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされた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な高次構造の修飾をもたらす。

20

【0039】

これらの修飾は、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。

【0040】

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。

【0041】

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D72Nが、72位のアスパラギン酸を担持するショートヘリックス(T70-A75)の構造的修飾をもたらすことを示す。136位のチロシン残基を有し、72位のアスパラギン酸に面しているヘリックスDとEとの間のループも修飾される。

30

【0042】

したがって、当該変異タンパク質は、天然の野生型IFN - 7 タンパク質と異なる三次元の高次構造を有する。

【0043】

更に、突然変異D72Nはまた、アスパラギン酸の持っていた負電荷の損失をもたらす。最終的に、72位のアスパラギン酸残基の、アスパラギン残基への突然変異は、受容体に結合するIFN - 7 部分の近傍において、タンパク質機能を変えるにちがいない。

40

【0044】

それ故に、コンピューターによる分子モデリングは、72位のアスパラギンの存在が、天然の野生型IFN - 7 タンパク質の構造及び機能の重大な修飾に關与していることを推測する。特に、この突然変異は、IFN - 7 の、その受容体に対する親和性を変化させるようである。

【0045】

コンピューターによる分子モデリングは、成熟突然変異タンパク質上の突然変異F116Sが、ヘリックスDの若干の摂動をもたらすが、ショートヘリックス(E40-D44)のレベルでのABループの構造的修飾ももたらすことを示す。このショートヘリックス内

50

に位置する42位のグルタミン酸の配向は、当該突然変異に起因して修飾される。

【0046】

F116Sの最も重要な効果は、IFN-7構造の内側にあるフェニルアラニンのネットワークによって生じるスタック効果が弱いことであり、これは恐らく、タンパク質構造のより高い柔軟性をもたらす。

【0047】

116位のフェニルアラニンのペプチド骨格の窒素原子と、114位のグルタミン酸のカルボニル基の酸素原子との間の水素結合は保存される。

【0048】

その結果、当該突然変異タンパク質は、天然の野生型IFN-7タンパク質と異なる三次元の高次構造を有する。 10

【0049】

したがって、コンピューターによる分子モデリングは、116位のセリンの存在が、天然の野生型IFN-7の構造及び機能の重大な修飾に関与すると推測する。

【0050】

コンピューターによる分子モデリングは、成熟突然変異タンパク質上のR121Kの突然変異が、ヘリックスDの高次構造の若干の摂動をもたらすことを示す。

【0051】

アミノ酸L118, K122, Q125及びF124の側鎖の配向は、当該突然変異によって修飾される。 20

【0052】

更に、IFN-2のR121残基(IFN-7のR120に等しい)は、インターフェロンの抗ウイルス活性にとって重要であることが証明されてきた(Weber H, Valenzuela D, Lujber G, Gubler M, Weissmann C.; "Single amino acid changes that render human IFN alpha 2 biologically active on mouse cells". (1987) EMBO J. 6:591-598)。

【0053】

このように、当該突然変異タンパク質は、天然の野生型IFN-7と異なる三次元の高次構造を有する。

【0054】

したがって、コンピューターによる分子モデリングは、121位にあるリジンの存在が、天然の野生型IFN-7タンパク質の構造及び機能の重大な修飾に関与すると推測する。 30

【0055】

コンピューターによる分子モデリングは、成熟突然変異タンパク質上のK159Qの突然変異が、ヘリックスEの後ろにあるループの障害をもたらし、この効果は、当該タンパク質のC末端まで続くことを示す。ヘリックスBの直前に位置するループも、Q149残基のレベルで修飾される。

【0056】

リジン159の窒素原子とスレオニン156のカルボニル基の酸素原子との間の水素架橋(C末端のループを有するヘリックスEの末端)も抑制される。 40

【0057】

159位にあるリジン(K)が、インターフェロンのC末端部分の抗ウイルス活性に影響を及ぼしうると考えられている(Chang NT, Kung HF, Pestka S.; "Synthesis of a human leukocyte interferon with a modified carboxy terminus in Escherichia coli." Arch. Biochem. Biophys. (1983) 221:585-589)。

【0058】

このように、当該突然変異タンパク質は、天然の野生型IFN-7タンパク質と異なる三次元の高次構造を有する。

【0059】

したがって、コンピューターによる分子モデリングは、159位にあるグルタミンの存在が、天然の野生型IFN-7タンパク質の構造及び機能の重大な修飾に関与すると推測する。

【0060】

本発明に従う他のSNP、すなわち、a559c, g580a, c667t, c682t, g1125a, g1161a, 及びa1212gは、アミノ酸配列である配列番号2のレベルで、IFN-7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。

【0061】

SNP g1125a, g1161a, a1212gはサイレントであり、そしてSNP a559c, g580a, c667t, c682tは非コード領域である。 10

【0062】

事実、サイレントSNP g1125aは、アミノ酸配列である配列番号2上の125位にあるアミノ酸、グルタミン(Q)を修飾しない。サイレントSNP g1161aは、アミノ酸配列である配列番号2上の137位にあるアミノ酸、グルタミン酸(E)を修飾しない。同様に、サイレントSNP a1212gは、アミノ酸配列である配列番号2上の154位にあるアミノ酸、ロイシン(L)を修飾しない。

【0063】

本発明に従うポリヌクレオチドの遺伝子型判定は、個体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ように実施されうる。遺伝子型判定の例は、以後の実験 20 的な項目において示す。

【0064】

本発明のポリペプチドの機能性の決定は、それらの生物学的活性の試験によって等しく実施されうる。

【0065】

これに関して、例えば、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、CD4+又はCD8+Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、in vitro又はin vivoでの抗ウイルス活性、悪性フレンド赤白血病細胞をあらかじめ接種されたマウスにおける抗腫瘍活性、Daudi Burkitt's細胞系に対する細胞性の抗増殖活性、本発明に従うポリペプチドのTF-1細胞系に対する細胞性の抗増殖活性を測定し、そして野生型IFN-7、又は市販品の代表として選択された野生型IFN-2と比較することが可能である。 30

【0066】

本発明はまた、特に、あるヒトの障害及び/又は疾患の予防及び治療のための、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/あるいは同定された治療用分子の使用、という目的を有する。

【0067】

定義

「参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列」とは、ヒトIFN-7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。 40

【0068】

この配列は、GenBankにおいて、アクセッション番号X02960のもとアクセス可能であり、そして

- Olopade, O. I.; Bohlander, S. K.; Pomykala, H.; Maltepe, E.; Van Melle, E.; Le Beau, M. M.; Diaz, M.O. : "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia." ; Genomics 14: 437443, 1992.

- Henco K, Brosius J, Fujisawa A, Fujisawa JI, Haynes JR, Hochstadt J, Kovacic T, Pasek M, Schambock A, Schmid J, et al. : "Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes." ; J Mol Biol 1985 Sep 20; 185 (2): 227-60. 50

- Ullrich A, Gray A, Goeddel DV, Dull TJ: "Nucleotide sequence of a portion of human chromosome 9 containing a leukocyte interferon gene cluster." ; J Mol. Biol. 1982 Apr 15 ; 156 (3): 467-86.

に記載されている。

【 0 0 6 9 】

「天然野生型 I F N - 7 タンパク質」又は「野生型 I F N - 7 タンパク質」とは、参照野生型 I F N - 7 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。天然野生型未成熟タンパク質 I F N - 7 は、配列番号 2 で示されるペプチド配列に相当する。

【 0 0 7 0 】

「ポリヌクレオチド」とは、修飾型又は非修飾型 D N A 又は R N A 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。

【 0 0 7 1 】

用語ポリヌクレオチドは、例えば一本鎖又は二本鎖 D N A、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 D N A、一本鎖又は二本鎖 R N A 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 R N A 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 R N A 及び / 又は D N A 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 D N A 及び R N A 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。

【 0 0 7 2 】

「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。

【 0 0 7 3 】

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る。ポリペプチドはまた、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。

【 0 0 7 4 】

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。

【 0 0 7 5 】

例えば、ポリペプチドの修飾は、アセチル化、アシル化、A D P 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、G P I 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 ( s e n e l o y l a t i o n )、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 Rat tan et al. " Protein Synthesis : Post-translational Modifications and Aging ", An n NY Acad Sci (1992) 663 : 48-62、において十分に詳述されている。

10

20

30

40

50

## 【0076】

「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、例えば上文で限定した様な、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。

## 【0077】

「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。

## 【0078】

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。

10

## 【0079】

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。

## 【0080】

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。

20

## 【0081】

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。

## 【0082】

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。

30

## 【0083】

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。

## 【0084】

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、これらの配列の変異体とみなされる。

## 【0085】

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。

40

## 【0086】

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。

## 【0087】

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。

## 【0088】

「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。

## 【0089】

50

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。

【0090】

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。

【0091】

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。

10

【0092】

「機能的SNP」とは、上文で限定した様な、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。

【0093】

「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。

【0094】

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、野生型参照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、減少又は抑制に存することもある。

【0095】

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。

20

【0096】

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。

【0097】

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751~ヌクレオチド1320)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: t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, a1294cのうち少なくとも1つを含んで成ると解されるヌクレオチド配列、あるいは

30

b) a)のヌクレオチド配列に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配列を第一の目的とする。

【0098】

当然のことながら、本発明の意味において、番号付けは、ヌクレオチド配列である配列番号1のSNPの位置に相当している。

40

【0099】

本発明は同様に、

a) 配列番号1の配列又はそのコード配列であって、それぞれが以下のコードSNP: t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, a1294cのうち少なくとも1つを含んで成ると解されるもの、あるいは

b) a)のヌクレオチド配列に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。

【0100】

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: t779c, g1033a, c108

50

4 a , g 1 1 3 5 t , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , a 1 2 9 4 c 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。

【0101】

本発明によると、前文で限定したポリヌクレオチドは、t 7 7 9 c , g 1 0 3 3 a , c 1 0 8 4 a , g 1 1 3 5 t , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , 及び a 1 2 9 4 c 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。

【0102】

更に好ましくは、前文で限定したポリヌクレオチドは、コード SNP g 1 0 3 3 a を含んで成る。

【0103】

前文で限定したようなポリヌクレオチドは、同様に、以下の非コード及びサイレント SNP : a 5 5 9 c , g 5 8 0 a , c 6 6 7 t , c 6 8 2 t , g 1 1 2 5 a , g 1 1 6 1 a , 及び a 1 2 1 2 g、のうちの少なくとも1つを含むことがある。

【0104】

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、それぞれ以下の非コード又はサイレント SNP : a 5 5 9 c , g 5 8 0 a , c 6 6 7 t , c 6 8 2 t , g 1 1 2 5 a , g 1 1 6 1 a , 及び a 1 2 1 2 g、のうちの少なくとも1つを含んで成ると解されるもの；あるいは

b) a) の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、又はそれらから成る、単離されたポリヌクレオチドを第一の目的とする。

【0105】

当然ながら、以下のサイレント SNP g 1 1 2 5 a , g 1 1 6 1 a , a 1 2 1 2 g のみがヌクレオチド配列である配列番号1のコード配列中に位置する。

【0106】

本発明はまた、a)ヌクレオチド配列である配列番号1又はそのコード配列であって、それぞれ以下の SNP : a 5 5 9 c , g 5 8 0 a , c 6 6 7 t , c 6 8 2 t , t 7 7 9 c , g 1 0 3 3 a , c 1 0 8 4 a , g 1 1 2 5 a , g 1 1 3 5 t , g 1 1 6 1 a , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , a 1 2 1 2 g , 及び a 1 2 9 4 c、のうちの少なくとも1つを含んで成ると解されるもの、あるいは

b) a) の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、に関する。

【0107】

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。

【0108】

本発明はまた、

a)ヌクレオチド配列である配列番号1の全部又は一部であって、但し、そのようなヌクレオチド配列、又は配列の一部が、a 5 5 9 c , g 5 8 0 a , c 6 6 7 t , c 6 8 2 t , t 7 7 9 c , g 1 0 3 3 a , c 1 0 8 4 a , g 1 1 2 5 a , g 1 1 3 5 t , g 1 1 6 1 a , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , 及び a 1 2 1 2 g から成る群から選択される少なくとも1つの SNP を含んで成るもの、あるいは

b) a) の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。

【0109】

上文で限定したような、単離されたヌクレオチド配列は、少なくとも10個のヌクレオチド、そして好ましくは10~40個のヌクレオチドから構成される。

【0110】

本発明によると、前文で限定したポリヌクレオチドは、t 7 7 9 c , g 1 0 3 3 a , c 1 0 8 4 a , g 1 1 3 5 t , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , 及び a 1 2 9 4 c から成る群から選択される

10

20

30

40

50

単一のコードSNPを含んで成る。

【0111】

更に好ましくは、前文で限定したポリヌクレオチドは、コードSNP g 1 0 3 3 aを含んで成る。

【0112】

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24～189位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列、

の全部又は一部を含んで成るポリペプチドであって、

以下のコードSNP：V 1 0 A，D 9 5 N，L 1 1 2 I，V 1 2 9 L，F 1 3 9 S，R 1 4 4 K，及びK 1 8 2 Qのうちの少なくとも1つを含んで成るアミノ酸配列を有すると解されるもの、をコードする、単離されたポリヌクレオチドをその目的とする。

【0113】

当然ながら、本発明の意味においては、V 1 0 A，D 9 5 N，L 1 1 2 I，V 1 2 9 L，F 1 3 9 S，R 1 4 4 K，及びK 1 8 2 Qの位置に相当する番号付けは、アミノ酸配列である配列番号2の番号付けに相当する。

【0114】

本発明の好ましい目的よると、前文で限定したポリペプチドは、上文で限定したような単一のコードSNPを含んで成る。

【0115】

更に好ましくは、本発明に従う単離されたポリヌクレオチドは、アミノ酸配列である配列番号2の全部又は一部を含んで成り、そしてコードSNP D 9 5 Nを有するポリペプチドをコードする。

【0116】

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。

【0117】

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。

【0118】

本発明に従うポリヌクレオチドはまた、ヌクレオチド配列である配列番号1上の各SNPにつき変異した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-7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。

【0119】

例えば、SNP g 1 0 3 3 a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1033位にあるヌクレオチド、グアニンをアデニンによって修飾することによって、IFN-7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。

【0120】

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. USA」82: 488を参照のこと。

【0121】

単離されたポリヌクレオチドはまた、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。

【0122】

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。

。

10

20

30

40

50

## 【0123】

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。

## 【0124】

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、ストリンジエ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。

## 【0125】

「ストリンジエ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。

## 【0126】

ストリンジエントな条件は、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°C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°Cでのフィルターの洗浄によって得ることができる。

## 【0127】

本発明の範囲において、ストリンジエ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。

## 【0128】

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。

## 【0129】

従って、例えば、前記ヌクレオチド配列がSNP g1033aを含んで成る場合、その相補ヌクレオチド配列は、1033位と同等の位置にチミン(t)を含んで成る。

## 【0130】

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(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、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751~ヌクレオチド1320)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であって、これらの配列のそれぞれが以下のSNP: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294c、のうちの少なくとも1つを含むと解される、使用、をその目的とする。

## 【0131】

本発明はまた、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の全部又は一部を同定し、あるいは増幅する方法であって、適当なハイブリダイゼーション条件下で、前記ポリヌクレオチドを本発明に従うポリヌクレオチドとハ

10

20

30

40

50

イブリダイズさせることを含んで成る方法、に関する。

【0132】

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751～ヌクレオチド1320)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の遺伝子型判定のための使用であって、これらの配列のそれぞれが、以下のSNP：a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294c、のうちの少なくとも1つを含んで成ると解される、使用をその目的とする。

【0133】

本発明はまた、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の全部又は一部を遺伝子型判定するための方法であって、対象者又は対象者群のゲノムDNAの注目の領域を増幅し、そして559, 580, 667, 682, 779, 1033, 1084, 1125, 1135, 1161, 1166, 1181, 及び1212から成る群から選択される、ヌクレオチド配列である配列番号1中の少なくとも1つの位置の対立遺伝子を決定する段階、を含んで成る方法に関する。

【0134】

本発明によれば、遺伝子型判定は、個体又は個体群で行われうる。

【0135】

本発明の意義の範囲内で、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。

【0136】

「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、個体の一群であると解される。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。

【0137】

通常、個体群は少なくとも10の個体、好ましくは100～300の個体含んで成る。

【0138】

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、例えば非免疫関連疾患、例えば肥満、感染症、特にウイルス感染、例えばB型及びC型肝炎並びにエイズ、感染性肺炎、潰瘍性大腸炎、中枢神経系の疾患、例えばアルツハイマー病、統合失調症及びうつ病、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、喘息、多発性硬化症、骨粗しょう症、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、胃腸疾患又は化学療法と関連した疾患。

【0139】

本発明に従う機能的SNPは、好ましくは個体群において遺伝子型判定される。

【0140】

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

10

20

30

40

50

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が一つが、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。

【0141】

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) を用いたミニシークエンス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シークエンスのプロトコール (FP-TDI 技術又は蛍光偏光誘導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。

10

【0142】

それは、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 サーマ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。

【0143】

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。

20

【0144】

例えば、IFN-7 のコード配列を含んで成るヌクレオチド配列の PCR 増幅に使用されるプライマーに相当するセンス及びアンチセンスのヌクレオチド配列は、それぞれ：  
配列番号3：センスプライマー：T A C C C A C C T C A G G T A G C C  
配列番号4：アンチセンスプライマー：C A T G A A A G T G T G A G A T G A T G C  
であってもよい。

【0145】

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におけるヌクレオチド711からヌクレオチド1379の、669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。

30

【0146】

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、異なる亜集団、そして特に、必要によりこの個体群を構成する多様な民族集団、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。

【0147】

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 SPLUS (商標) (Math Soft) 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ぶ本発明の 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。

40

【0148】

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 は疾患の感受性又は抵抗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) がこれらの疾患の状態に関与する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、これらの疾患の状態と間接

50

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)。

【0149】

この様に、本発明はまた、IFN - 7 遺伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP : a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294c、のうちの少なくとも1つを含んで成るデータバンクに関する。

【0150】

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。 10

【0151】

このデータバンクは、

(i) IFN - 7 遺伝子のポリヌクレオチド内の、以下のSNP : a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294cのうちの少なくとも1つと、

(ii) 疾患又は疾患に対する抵抗性、

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解析されうる。

【0152】

本発明はまた、疾患又は疾患に対する抵抗性のための診断/予後のキットを開発するための、IFN - 7 遺伝子のポリヌクレオチドにおける以下のSNP : a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294cのうちの少なくとも1つの使用に関する。 20

【0153】

本発明のSNP、例えば上述したものは、疾患又は疾患に対する抵抗性と直接又は間接的に関連することがある。

【0154】

好ましくは、これらの疾患は上文で言及した様に定義されるものであってもよい。 30

【0155】

本発明はまた、IFN - 7 遺伝子内の、a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294cから成る群から選択される少なくとも1つのSNPと、疾患又は疾患に対する抵抗性、との間の統計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疾患又は疾患に対する抵抗性の分布を決定し、

c) 遺伝子型のデータと、前記疾患又は疾患に対する抵抗性とを比較し、そして

d) 前記比較を統計的に関連している関係について解析すること、 40

を含んで成る方法に関する。

【0156】

本発明はまた、疾患の予後又は疾患に対する抵抗性を診断し、又は決定するための方法であって、IFN - 7 遺伝子内の、a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294cから成る群から選択される少なくとも1つのSNPを検出することを含んで成る方法に関する。

【0157】

本発明のSNPの検出は、下文に記載するような当業者に周知の方法によって実施される。

## 【0158】

本発明の少なくとも1つのSNPの検出は、研究される対象者由来の生体試料、例えば細胞、血液、尿、唾液から出発して、あるいは研究される対象者の生検又は部検から出発して実施されうる。ゲノムDNAは、例えば、直接的に又はPCR増幅後に検出に使用されうる。RNA又はcDNAも同様に使用されうる。

## 【0159】

その結果、対象者から単離されたポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、本発明の少なくとも1つのSNPを含んで成るポリヌクレオチドのヌクレオチド配列と比較することができる。

## 【0160】

上記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、電気泳動ゲル上での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うる。Myers et al., Science (1985) 230:1242を参照のこと。正確な点での当該ヌクレオチド配列構造のそのような修飾も、ヌクレアーゼ保護試験、例えばリボヌクレアーゼ及びS1ヌクレアーゼによって、又は化学開裂剤によっても明らかとなりうる。Cotton et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397-4401を参照のこと。DNAハイブリダイゼーション法と酵素消化の組み合わせも、インベダーアッセイの場合のように使用されうる。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も、当該スクリーニングを実施するために使用されうる。

10

20

## 【0161】

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をその目的とする。

## 【0162】

多くの発現系、例えば、限定しないが染色体、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、例えばパキキュロウイルス、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。

30

## 【0163】

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, Sambrook et al., 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001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。

## 【0164】

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。

40

## 【0165】

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。

## 【0166】

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をその目的とする。

## 【0167】

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

50

MANUAL (上記) 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。

【0168】

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。

10

【0169】

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。

【0170】

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 ~ 189 位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列、  
の全部又は一部と少なくとも 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であって、以下のコード SNP: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, 及び K182Q のうちの少なくとも 1 つを含むと解されるポリペプチド、をその目的とする。

20

【0171】

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 ~ 189 位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列、  
の全部又は一部を含んで成り、前記ポリペプチドは、以下のコード SNP: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, K182Q のうちの少なくとも 1 つを含むと解される。

30

【0172】

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 ~ 189 位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列、  
の全部又は一部から成り、前記ポリペプチドは、以下のコード SNP: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, K182Q のうちの少なくとも 1 つを含むと解される。

40

【0173】

好ましくは、本発明に従うポリペプチドは、V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, K182Q から成る群から選択される単一のコード SNP を含む。

【0174】

更に好ましくは、本発明に従うポリペプチドは、アミノ酸配列である配列番号 2 の 24 ~

50

189のアミノ酸を含んで成り、且つコードSNP, D95Nを有する。

【0175】

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、上文で限定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。

【0176】

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；ヒ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。

10

【0177】

「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。

【0178】

#### 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。

【0179】

「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。

20

【0180】

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。

【0181】

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

【0182】

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。

30

【0183】

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。

【0184】

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。

【0185】

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., "The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer", Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Vol. 27, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series) (eds. R.A. Reisfeld and S.Sell), pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc. N.Y., 1985, pp. 77-96)が、細胞系から出発して使用され得る。

40

【0186】

一本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

50

れ得る。

【0187】

トランスジェニックな動物、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。

【0188】

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、試験される1又は複数の化合物の中から、本発明に従うポリペプチドの活性を活性化し、又は阻害する物質を同定する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を含んで成る宿主細胞を提供し、

b) 前記宿主細胞を試験される前記化合物と接触させ、

c) 前記ポリペプチドの活性に対する活性又は阻害作用を決定し、それにより前記活性又は阻害物質を同定すること、

を含んで成る方法をその目的とする。

【0189】

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。

【0190】

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物質(アゴニスト)又は阻害する物質(アンタゴニスト)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。

【0191】

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。

【0192】

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。

【0193】

本発明のポリペプチドとの、試験される化合物の結合能、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。

【0194】

上述の方法の段階c)は、直接又は間接的に標識された、試験され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。

【0195】

試験される物質が、検出され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。

【0196】

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。

【0197】

本発明はまた、試験される1又は複数の化合物の中から、本発明に従うポリペプチドによって増強され又は阻害される物質を同定する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を含んで成る宿主細胞を提供し、

b) 前記宿主細胞を試験される前記化合物と接触させ、

c) 前記物質の活性に対する増強又は阻害作用を決定し、それによって前記増強又は阻害作用物質を同定すること、を含んで成る方法をその目的とする。

10

20

30

40

50

## 【0198】

本発明のポリペプチドによって増強され、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。

## 【0199】

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。

## 【0200】

疾患の検出

本発明はまた、対象者における、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有無を決定し、
- b) 対象者における、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) 対象者における、本発明に従うポリペプチドの有無を決定し、
- d) 対象者における、本発明に従うポリペプチドの濃度を決定し、そして/あるいは
- e) 対象者における、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その目的とする。

## 【0201】

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。

## 【0202】

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疾患、軽い疾病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。

## 【0203】

これらの疾患は、障害及び/又はヒトの疾患、例えばガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患及び障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法に関連する障害、であってよい。

## 【0204】

前記ガン及び腫瘍は、転移型腎ガン、黒色腫を含んで成るガン腫、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞性リンパ腫を含んで成るリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含んで成る白血病、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であってエイズの場合にはカポジ肉腫を含んで成るもの、を含む。

## 【0205】

前記感染症は、慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズを含んで成るウイルス感染、感染性肺炎、及び性病、例えば生殖器疣、を含む。

## 【0206】

前記免疫関連疾患及び自己免疫疾患は、組織又は器官の移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含むことがある。

## 【0207】

前記代謝病は、肥満のような非免疫関連疾患を含むことがある。

## 【0208】

前記の中枢神経系の疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含むことがある。

## 【0209】

前記疾患及び障害はまた、創傷治癒、透析患者の貧血、及び骨粗鬆症を含むことがある。

## 【0210】

10

20

30

40

50

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疾患又は疾患に対する抵抗性の遺伝子診断を可能にする。

【0211】

好ましくは、段階a)において、既に限定した様な、少なくとも1つのコードSNPを含むポリヌクレオチドの有無が検出され得る。

【0212】

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。

10

【0213】

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。

【0214】

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ような修飾も、ヌクレアーゼ保護試験によって、例えばリボヌクレアーゼ及び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。

20

【0215】

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。)

【0216】

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、リボヌクレアーゼ保護、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。

30

【0217】

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有無及び濃度が、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。

【0218】

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。

【0219】

当業者は、上文の様に起こる疾患、軽い疾病又は障害に対する感受性又は、反対に抵抗性が現れる、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。

40

【0220】

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。

【0221】

本発明はまた、1又は複数の：本発明に従う、単離されたポリヌクレオチド；上文で限定した組換えベクター；上文で限定した宿主細胞；本発明に従うポリペプチド；上文で限定

50

した抗体、を含んで成る診断キットをその目的とする。

【0222】

#### 薬物及び疾患の処置

本発明は、活性物質の目的で、本発明に従うポリペプチドを含む治療化合物をその目的とする。

【0223】

本発明はまた、異なるヒトの障害及び/又は疾患の予防又は処置のための治療用化合物の製造のための、本発明に従うポリペプチドの使用にも関する。これらの疾患は、障害及び/又はヒトの疾患、例えばガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患及び障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法に関連する障害、であってもよい。

10

【0224】

前記ガン及び腫瘍は、転移型腎ガン、黒色腫を含んで成るガン腫、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞性リンパ腫を含んで成るリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含んで成る白血病、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であってエイズの場合にはカポジ肉腫を含んで成るもの、を含む。

【0225】

前記感染症は、慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズを含んで成るウイルス感染、感染性肺炎、及び性病、例えば生殖器疣、を含む。

20

【0226】

前記免疫関連疾患及び自己免疫疾患は、組織又は器官の移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含むことがある。

【0227】

前記代謝病は、肥満のような非免疫関連疾患を含むことがある。

【0228】

前記の中枢神経系の疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含むことがある。

【0229】

前記疾患及び障害はまた、創傷治癒、透析患者の貧血、及び骨粗鬆症を含むことがある。

30

【0230】

好ましくは、本発明に従うポリペプチドはまた、異なるヒトの障害及び/又は疾患、例えば、あるウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎、白血病、例えばヘアリー細胞白血病及び慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド性腫瘍、悪性黒色腫、転移型腎ガン、アルツハイマー病、パーキンソン病、免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合にはカポジ肉腫、並びに生殖器疣又は性病、の予防又は処置を目的とする治療化合物の製造に使用されうる。

【0231】

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、すなわち治療化合物として使用され得る。

40

【0232】

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つの上文で限定したコードSNP、上文で限定した組換えベクター、上文で限定した宿主細胞、及び/又は上文で限定した抗体を含む、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。

【0233】

本発明はまた、異なるヒトの障害及び/又は疾患の予防又は処置を目的とする薬物の製造のための、少なくとも1つの上文で限定したコードSNP、上文で限定した組換えベクター、上文で限定した宿主細胞、及び/又は上文で限定した抗体を含む、本発明に従うポリ

50

ヌクレオチドの使用にも関する。これらの疾患は、障害及び／又はヒトの疾患、例えばガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び／又は自己免疫疾患及び障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法に関連する障害、であってもよい。

【0234】

前記ガン及び腫瘍は、転移型腎ガン、黒色腫を含んで成るガン腫、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞性リンパ腫を含んで成るリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含んで成る白血病、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であってエイズの場合にはカポジ肉腫を含んで成るもの、を含む。

【0235】

前記感染症は、慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズを含んで成るウイルス感染、感染性肺炎、及び性病、例えば生殖器疣、を含む。

【0236】

前記免疫関連疾患及び自己免疫疾患は、組織又は器官の移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含むことがある。

【0237】

前記代謝病は、肥満のような非免疫関連疾患を含むことがある。

【0238】

前記の中枢神経系の疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含むことがある。

【0239】

前記疾患及び障害はまた、創傷治癒、透析患者の貧血、及び骨粗鬆症を含むことがある。

【0240】

好ましくは、本発明は、異なるヒトの障害及び／又は疾患の予防又は処置を目的とする薬物の製造のための、少なくとも1つの上文で限定したコードSNP、上文で限定した組換えベクター、上文で限定した宿主細胞、及び／又は上文で限定した抗体を含む、本発明に従うポリヌクレオチドの使用であって、異なるヒトの障害及び／又は疾患、例えば、あるウイルス感染、例えば慢性B型及びC型肝炎、白血病、例えばヘアリー細胞白血病及び慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド性腫瘍、悪性黒色腫、転移型腎ガン、アルツハイマー病、パーキンソン病、免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合にはカポジ肉腫、並びに生殖器疣又は性病、の予防又は処置を目的とする薬物の製造のための使用に関する。

【0241】

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。

【0242】

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。

【0243】

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つの上文で限定したSNPを含む本発明に従うポリヌクレオチド、上文で限定した組換えベクター、上文で限定した宿主細胞、及び／又は上文で限定した抗体、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する。

【0244】

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。

【0245】

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

10

20

30

40

50

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。

【0246】

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。

【0247】

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。

10

【0248】

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。

【0249】

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。

【0250】

本発明はまた、個体における、ガン及び腫瘍、感染症、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患及び障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法の処置に関連する障害、から成る群から選択される疾患を予防し、又は処置する方法であって、前記個体に対し、治療として有効な量の上文で限定した物質、及び医薬として許容される賦形剤を投与することを含んで成る方法、に関する。

20

【0251】

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、上文で限定した組換えベクター、上文で限定した宿主細胞、及び/又は上文で限定した抗体、並びに適当な医薬として許容される賦形剤を含む診断組成物を目的とする。

【0252】

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。

【0253】

本発明はまた：

30

- a) 治療として有効な量の本発明に従うポリペプチド、及び/又は
  - b) 本発明に従うポリヌクレオチド、及び/又は
  - c) 上文で限定した、処置される対象者由来の宿主細胞、
- の使用であって、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目的とする治療用化合物を調製するための使用を目的とする。

【0254】

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。

【0255】

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。

40

【0256】

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。Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, B10

50

S Scientifics Publishers Ltd (1996)を参照のこと。

【0257】

本発明に従い、少なくとも1つのコードSNP、例えば上文で限定したものを含むポリヌクレオチドが好ましくは使用される。

【0258】

更に、対象者に対して、その者に属する宿主細胞であって、あらかじめ採取され、そし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修飾された宿主細胞を投与することが可能である。

【0259】

本発明はまた：

a) 治療として有効な量の、上文で限定した免疫特異的抗体、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、  
の使用であって、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目的とする薬物の調製のための使用に関する。

【0260】

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、例えば上文で限定したものを、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。

【0261】

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。

【0262】

好ましくは、少なくとも1つのコードSNP、例えば上文で限定したものを含む相補的なポリヌクレオチドが使用され得る。

【0263】

本発明はまた、対象者において、本発明に従うポリペプチドの活性を増大又は低下させるための方法であって、治療的に有効な量の：a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294cから成る群から選択される少なくとも1つのSNPを含んで成るヌクレオチド配列である配列番号1、又は前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、の全部又は一部を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター；前記組換えベクターを含んで成る宿主細胞であって、処置される前記対象者から得られうる宿主細胞；アミノ酸配列である配列番号2の全部又は一部を含んで成り、且つV10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, 及びK182Qから成る群から選択される少なくとも1つのコードSNPを有する、単離されたポリペプチド；前記ポリペプチドに特異的な抗体；及び医薬として許容される賦形剤、を投与することを含んで成る方法に関する。

【0264】

本発明はまた、ヌクレオチド配列である配列番号1であって、但し、以下のSNP：a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294cのうちの一つを含んで成るヌクレオチド配列と、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）を有するヌクレオチド配列の、個体のゲノムにおける存在と関連しているIFN-7変異体によって生じる障害又は疾患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-7タンパク質の使用に関する。

【0265】

好ましくは、前記薬物は、ガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患及び障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法に関連する

10

20

30

40

50

障害、から成る群から選択される疾患の予防又は処置のために使用される。

【0266】

前記ガン及び腫瘍は、転移型腎ガン、黒色腫を含んで成るガン腫、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞性リンパ腫を含んで成るリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含んで成る白血病、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であってエイズの場合にはカポジ肉腫を含んで成るもの、を含む。

【0267】

前記感染病は、慢性B型及びC型肝炎並びにHIV/エイズを含んで成るウイルス感染、感染性肺炎、及び性病、例えば生殖器疣、を含む。

10

【0268】

前記免疫関連疾患及び自己免疫疾患は、組織又は器官の移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含むことがある。

【0269】

前記代謝病は、肥満のような非免疫関連疾患を含むことがある。

【0270】

前記の中樞神経系の疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含むことがある。

【0271】

前記疾患及び障害はまた、創傷治癒、透析患者の貧血、及び骨粗鬆症を含むことがある。

20

【0272】

本発明はまた、個体において、本発明に従うポリヌクレオチドの前記個体のゲノムの存在に関連する障害又は疾患を予防又は処置するための方法であって、治療的に有効な量の1又は複数の：ヌクレオチド配列である配列番号1の全部又は一部を含んで成り、且つa559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, 及びa1294cから成る群から選択される少なくとも1つのSNPを有する、単離されたポリヌクレオチド、あるいは前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列の全部又は一部を含んで成る、単離されたポリヌクレオチド；前記ポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクター；前記組換えベクターを含んで成る宿主細胞；アミノ酸配列である配列番号2の全部又は一部を含んで成り、且つV10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, 及びK182Qから成る群から選択される少なくとも1つのコードSNPを有する、単離されたポリペプチド；前記ポリペプチドに特異的な抗体；及び医薬として許容される賦形剤、を投与することを含んで成る方法に関する。

30

【0273】

本発明のSNP D95Nを含んで成るIFN-7ポリペプチドのミメティック化合物

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24~189位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列、

40

のポリペプチドであって、但し、a)及びb)の前記アミノ酸配列がSNP D95Nを含んで成るポリペプチド、と実質的に同程度の生物活性を有する新規化合物に関する。

【0274】

前記生物活性は、例えば、下文の実験の項目に記載のように、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、CD4+又はCD8+Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、in vitro又はin vivoでの抗ウイルス活性、悪性フレンド赤白血病細胞をあらかじめ接種されたマウスにおける抗腫瘍活性、Daudi Burkitt's細胞系に対する細胞性の抗増殖活性、TF-1細胞系に対する細胞性の抗増殖活性を測定することによって評価される。

50

## 【0275】

実験の項目で言及するように、D95N突然変異IFN-7は、

- 樹状細胞の成熟を刺激するのが弱い能力
  - SEB抗原によってあらかじめ活性化された、CD4+Tリンパ球及びCD8+Tリンパ球によってサイトカインの放出(IFNガンマ及びIL-10)を刺激するのが高い能力
  - Dauidi細胞の増殖を阻害する能力
  - TF-1細胞に対する弱い抗増殖活性
  - VSVに感染した細胞培養液中でのin vivoでの高い抗ウイルス活性
  - EMCVに感染したマウスにおけるin vivoでの抗ウイルス活性
  - FCL接種マウスにおける抗腫瘍活性、
- を示す。

10

## 【0276】

また、実験の項目において言及するように、野生型のIFN-2と比較して、D95N突然変異IFN-7タンパク質は：

- シグナル伝達を同程度活性化する能力
- 樹状細胞の成熟を刺激することがより低い能力
- SEB抗原によってあらかじめ活性化された、CD4+Tリンパ球及びCD8+Tリンパ球によってIFNガンマの放出を刺激することがより高い能力
- 単球によってIL-10及びTNF- $\alpha$ を刺激することがより高い能力
- TF-1細胞に対する同程度の抗増殖活性
- VSVに感染した細胞培養液中でのin vitroでのより低い抗ウイルス活性
- EMCVに感染したマウスにおけるin vivoでのより高い抗ウイルス活性
- FCL接種マウスにおける若干低い抗腫瘍活性、

20

を有する。

## 【0277】

また、実験の項目において言及するように、野生型のIFN-7と比較して、D95N突然変異IFN-7タンパク質は：

- シグナル伝達を活性化する同程度の能力
- Dauidi細胞の成熟を刺激することが若干高い能力

30

を有する。

## 【0278】

上文で限定したような本発明の新規化合物は、D95N突然変異IFN-7のものと実質的に同程度の生物活性を有することがある。

## 【0279】

前記化合物はまた、Tリンパ球によるIFN-ガンマの放出、単球によるIL-10及びTNF- $\alpha$ の放出、EMCVに感染したマウスにおけるin vivoでの抗ウイルス活性、及び/又はFCL接種マウスにおける抗腫瘍活性のような生物活性を有することがあり、これらはD95N突然変異IFN-7のものよりもはるかに高い。

40

## 【0280】

前記化合物はまた、樹状細胞の成熟のような生物活性を有することがあり、これはD95N突然変異IFN-7のものよりもはるかに低い。

## 【0281】

前記化合物は、例えばポリペプチド又はペプチドのような生化学的化合物、又は、例えば合成ペプチドミメティックのような有機化学的化合物、であってもよい。

## 【0282】

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、D95N SNPを含む本発明のポリペプチドの使用に関する。

## 【0283】

本発明は、本発明の化合物の同定のための方法であって、以下の段階：

50

a) 試験される化合物の生物活性、例えば、下文の実験の項目に記載のように、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、CD4+又はCD8+ Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、in vitro又はin vivoでの抗ウイルス活性、悪性フレンド赤白血病細胞をあらかじめ接種されたマウスにおける抗腫瘍活性、Daudi Burkitt's細胞系に対する細胞性の抗増殖活性、本発明に従うポリペプチドのTF-1細胞系に対する細胞性の抗増殖活性を決定し；

b) i) 試験される化合物の、段階a)で決定した活性と、

ii) アミノ酸配列である配列番号2のポリペプチド、又はアミノ酸配列である配列番号2の24から189位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列のポリペプチド、であって、但し、アミノ酸配列がD95N SNPを含んで成るものの活性、

10

とを比較し；そして  
c) 段階b)で実施した比較に基づき、試験される化合物が、アミノ酸配列である配列番号2のポリペプチド、又はアミノ酸配列である配列番号2の24から189位の間に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列のポリペプチド、であって、但し、前記アミノ酸配列がD95N SNPを含んで成るポリペプチド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、を含んで成る方法に関する。

#### 【0284】

好ましくは、試験される化合物は、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ていることがあり、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、アミノ酸配列である配列番号2のポリペプチド、

20

#### 【0285】

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。

#### 【0286】

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.

30

- 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、であってよい。

#### 【0287】

本発明の化合物は、ガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫関連疾患及び/又は自己免疫疾患及び障害、心臓血管疾患、代謝病、中枢神経系の疾患、並びに化学療法に関連する障害、から成る群から選択される疾患のうちの1つの予防又は処置を目的とする薬物の調製に使用されう。

40

#### 【0288】

前記ガン及び腫瘍は、転移型腎ガン、黒色腫を含んで成るガン腫、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞性リンパ腫を含んで成るリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含んで成る白血病、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であってエイズの場合にはカポジ肉腫を含んで成るもの、を含む。

#### 【0289】

50

前記感染病は、慢性 B 型及び C 型肝炎並びに HIV / エイズを含んで成るウイルス感染、感染性肺炎、及び性病、例えば生殖器疣、を含む。

【0290】

前記免疫関連疾患及び自己免疫疾患は、組織又は器官の移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含むことがある。

【0291】

前記代謝病は、肥満のような非免疫関連疾患を含むことがある。

【0292】

前記の中樞神経系の疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含むことがある。 10

【0293】

前記疾患及び障害はまた、創傷治癒、透析患者の貧血、及び骨粗鬆症を含むことがある。

【0294】

好ましくは、本発明は、異なるヒトの障害及び/又は疾患、例えば、あるウイルス感染、例えば慢性 B 型及び C 型肝炎、白血病、例えばヘアリー細胞白血病及び慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド性腫瘍、悪性黒色腫、転移型腎ガン、アルツハイマー病、パーキンソン病、免疫欠損後に出現する腫瘍、例えばエイズの場合にはカポジ肉腫、並びに生殖器疣又は性病、から成る群から選択される疾患のうちの 1 つの予防又は処置を目的とする薬物の調製に使用されうる。 20

【実施例】

【0295】

実験の項目

実施例 1 : g 1 0 2 3 a , t 1 1 6 6 c , g 1 1 8 1 a , 又は a 1 2 9 4 c の S N P 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野生型参照  
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 - 7 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 1 I T F ) 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。

【0296】

続いて、成熟ポリペプチドフラグメントが、突然変異 D 7 2 N , F 1 1 6 S , R 1 2 1 K , K 1 5 9 Q を再現する様な方法で修飾される。 30

【0297】

1 0 0 0 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に対して行われた。

【0298】

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。

【0299】

それぞれの場合において、5 0 , 0 0 0 回の段階が 3 0 0 ° K で計算され、3 0 0 回の平衡段階によって終了した。 40

【0300】

このモデリングの結果を図 1、2、3 及び 4 に表す。

【0301】

例 2 : 個体群における t 7 7 9 c , g 1 0 3 3 a , c 1 0 8 4 a , g 1 1 3 5 t , t 1 1 6 6 c , g  
1 1 8 1 a , 又は a 1 2 9 4 c の S N P の遺伝子判定

S N P 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、ミニシークエンスの原理に基づいている。当該技術は蛍光ミニシークエンス ( F P - T D I 技術又は Fluorescence Polarization Template-direct Dye-Terminator Incorporation ) から成る。

## 【0302】

ミニシーケンスは、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、ミニシーケンスは行われる。

## 【0303】

ミニシーケンスは、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。

10

## 【0304】

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。

## 【0305】

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。

20

## 【0306】

遺伝子型判定の段階1及び2は、t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, 又はa1294cのSNPのそれぞれについては同一の条件で実施される。段階3、4及び5は、これらの多型のそれぞれに特異的である。

## 【0307】

- 1) IFN-7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。

## 【0308】

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

30

## 【0309】

268人の個体は以下の様に分布される：

## 【表1】

系統群	具体的な民族群	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

10

20

30

40

50

## 【0310】

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。

## 【0311】

全てのSNPについて、PCR増幅が以下のプライマー：

配列番号3：センスプライマー：TACCCACCTCAGGTAGCC

配列番号4：アンチセンスプライマー：CATGAAAGTG TGAGATGATGC

から出発して実施される。

## 【0312】

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711からヌクレオチド1379の、669個のヌクレオチドを有するフラグメントの増幅を

可能にする。

【0313】

それぞれのSNPについて、PCR生成物はミニシーケンスのための鋳型を果たすであろう。

【0314】

当該PCR反応の合計の反応液量は各試料当たり5 $\mu$ lである。

【0315】

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によって供給	緩衝液 (X)	10	0.5	1
Life Technology	Taqによって供給	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/反応液
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	1.98	
		DNA (試料)	2.5ng/ $\mu$ l	2	5ng/反応液
		合計量		5 $\mu$ l	

10

20

30

40

【0316】

これらの試薬は、ABGene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。

【0317】

2) PCR増幅生成物は、続いて2つの酵素：シュリンプアルカリホスファターゼ(SAP)及びエキソヌクラーゼ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。

【0318】

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。この反応混合物は以下の試薬から構成される：

50

【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/反応液
AP Biotech	070073Z	Exo I	10U/ $\mu$ l	0.1	1/反応液
AP Biotech	SAPI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	

10

## 【0319】

充填したら、プレートシーリングし、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。

20

## 【0320】

続いて、伸長又はミニシークエンス段階が、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。

## 【0321】

ミニシークエンス3)及び読み込み段階4)及び読み込みの解釈5)は、t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, 及びa1294cに特異的である。

## 【0322】

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。

30

## 【0323】

## 3)ミニシークエンス

遺伝子型判定に必要な2つのミニシークエンス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相当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。

## 【0324】

次の表は、各SNPについての、試験したミニシークエンス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。

40

## 【表 4】

SNP	試験したプライマー	遺伝子型判定のために 保護される最適条件
t779c	SEQ ID NO. 5:センスプライマー:gtccttttctttactgatgg SEQ ID NO. 6:アンチセンスプライマー:tgtagctgagtaccagcacg	センスプライマー+ ddCTP-R110+ddTTP-Tamra
g1033a	SEQ ID NO. 7:センスプライマー:tcaatctcttcagcacagag SEQ ID NO. 8:アンチセンスプライマー:ttccaagcagcagatgagt	アンチセンスプライマー+ ddCTP-R110+ddTTP-Tamra
c1084a	SEQ ID NO. 9:センスプライマー:tagaaaaattttccactgaa SEQ ID NO. 10:アンチセンスプライマー:gtcattcagttgctggtaaa	アンチセンスプライマー+ ddTTP-R110+ddGTP-Tamra
g1135t	SEQ ID NO. 11:センスプライマー:gtgtgatcacaggagggttggg SEQ ID NO. 12:アンチセンスプライマー:catcaggggagtcctctcca	アンチセンスプライマー+ ddATP-R110+ddCTP-Tamra
t1166c	SEQ ID NO. 13:センスプライマー:tcccctgatgaatgaggact SEQ ID NO. 14:アンチセンスプライマー:atttcctcacagccaggatg	アンチセンスプライマー+ dGTP-R110+ddATP-Tamra
g1181a	SEQ ID NO. 15:センスプライマー:ggacttcactcctggctgtga SEQ ID NO. 16:アンチセンスプライマー:tgattcctttggaagtatttc	センスプライマー+ ddATP-R110+ddGTP-Tamra
a1294c	SEQ ID NO. 17:センスプライマー:tctctttttcaacaaacttg SEQ ID NO. 18:アンチセンスプライマー:cttcctcottaatcctttt	センスプライマー+ ddCTP-R110+ddATP-Tamra

10

20

## 【 0 3 2 5 】

SNPのミニシーケンスは、最初に16個の試料全てで確認され、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全てを遺伝子型判定した。

## 【 0 3 2 6 】

次に、伸長又はミニシーケンス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>†</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-sequenase	3.2U/ $\mu$ l	0.125	0.4U/反応液
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 $\mu$ l	3.125	
		消化したPCR 生成物		10	
		合計量		15	

10

20

40

50

<sup>1</sup> 5 x 伸長緩衝液は、250 mM Tris-HCl pH9, 250 mM KCl, 25 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 及び40%グリセロールから構成される。

<sup>2</sup> 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。例えば、SNP g1033a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 ddGTP、
- 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 ddCTP (1.875  $\mu$ M の非標識 ddCTP 及び 0.625  $\mu$ M の R110 標識 ddCTP)、

から構成される。

【0327】

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Tetra)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。

【0328】

サーモサイクラーにおける最後の段階の後、LJL Biosystems Inc. のAnalyst(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、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。

【0329】

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:

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

【0330】

この計算において、値は係数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の係数である。

【0331】

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。

【0332】

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。

【0333】

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。

【0334】

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。

【0335】

SNP g1033aの場合、例えば、アンチセンスで読まれる対立遺伝子cは、センスで読まれる対立遺伝子gに相当し、そして未成熟IFN-7タンパク質配列の95位にあるアスパラギン酸(D)の存在に関連していること、そしてそれ故に、アンチセンスで読まれる対立遺伝子tが、センスで読まれる対立遺伝子aに相当し、相当するタンパク質の配列のこの位置につきアスパラギン(N)に相当することを述べる必要がある。

【0336】

SNP t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, 及びa1294cのミニシーケンスの結果

遺伝子型判定の過程の完了後、本明細書で研究したSNP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。

【0337】

SNP t779c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、以下に

10

20

30

40

50

示す様に、ホモ接合体の遺伝子型 C C は個体群において検出されていない。

【0338】

SNP g1033a 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 G G、又はヘテロ接合体 G A、又はホモ接合体 A A のいずれかである。実際には、以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型 A A は個体群において検出されていない。

【0339】

SNP g1135t 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 G G、又はヘテロ接合体 G T、又はホモ接合体 T T のいずれかである。実際には、以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型 T T は個体群において検出されていない。

【0340】

SNP c1084a 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 C C、又はヘテロ接合体 C A、又はホモ接合体 A A のいずれかである。実際には、以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型 A A は個体群において検出されていない。

【0341】

SNP t1166c 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 T T、又はヘテロ接合体 T C、又はホモ接合体 C C のいずれかである。実際には、以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型 C C は個体群において検出されていない。

【0342】

SNP g1181a 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 G G、又はヘテロ接合体 G A、又はホモ接合体 A A のいずれかである。実際には、以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型 A A は個体群において検出されていない。

【0343】

SNP a1294c 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 A A、又はヘテロ接合体 A C、又はホモ接合体 C C のいずれかである。実際には、以下に示す様に、ホモ接合体の遺伝子型 C C は個体群において検出されていない。

【0344】

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 7 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】

10

20

系統群	合計	t779c (V10A)							合計	
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC		%
アフリカ系アメリカ人	50			50	100					50
アメリカインディアン	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			97	100					97
メキシコ人	10			9	100					9
非ヨーロッパ系コーカソイド	37	2, 7	(0, 6. 4)	35	94, 6	2	5, 41			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			16	100					16
合計	268	0, 4	(0, 0. 9)	262	99, 2	2	0, 76			264

10

系統群	合計	g1033a (D95N)							合計	
		f	(95% CI)	GG	%	GA	%	AA		%
アフリカ系アメリカ人	50	4, 1	(0, 2, 8. 0)	45	91, 8	4	8, 16			49
アメリカインディアン	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			98	100					98
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			16	100					16
合計	268	0, 8	(0, 1. 5)	261	98, 5	4	1, 51			265

20

系統群	合計	c1084a (L112I)							合計	
		f	(95% CI)	CC	%	CA	%	AA		%
アフリカ系アメリカ人	50	2, 1	(0, 5. 0)	45	95, 7	2	4, 26			47
アメリカインディアン	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			92	100					92
メキシコ人	10			6	100					6
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, 4	(0, 0. 9)	252	99, 2	2	0, 79			254

30

40

【表 7】

系統群	合計	g1135t (V129L)							合計
		f	(95% CI)	GG	%	GT	%	TT	
アフリカ系アメリカ人	50	2,0	(0, 4.8)	47	95,9	2	4,1		47
アメリカインディアン	15			15	100				15
カリブ人	10	10,0	(0, 23.1)	8	80,0	2	20,0		10
ヨーロッパ系コーカソイド	99			98	100				98
メキシコ人	10	5,6	(0, 16.1)	8	88,9	1	11,1		9
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	0,9	(0, 1, 1.8)	260	98,1	5	1,9		263

10

系統群	合計	t1166c (F139S)							合計
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC	
アフリカ系アメリカ人	50			45	100				45
アメリカインディアン	15			15	100				15
カリブ人	10	5	(0, 14.6)	9	90,0	1	10,0		10
ヨーロッパ系コーカソイド	99	1,5	(0, 3.2)	96	97,0	3	3,0		99
メキシコ人	10			9	100				9
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	2,9	(0, 8.6)	16	94,1	1	5,9		17
合計	268	1	(0, 1, 1.8)	257	98,1	5	1,9		262

20

系統群	合計	g1181a (R144K)							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			10	100				10
東南アジア人	17	2,9	(0, 8.6)	16	94,1	1	5,9		17
合計	268	0,2	(0, 0.6)	267	99,6	1	0,4		268

30

40

【表 8】

系統群	合計	a1294c (K182Q)								
		f	(95% CI)	AA	%	AC	%	CC	%	合計
アフリカ系アメリカ人	50	2,0	(0, 4.7)	48	96,0	2	4,0			50
アメリカインディアン	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			7	100					7
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	94,1					17
合計	268	0,4	(0, 0.9)	265	99,3	2	0,7			265

10

## 【0345】

上記の表において、

20

- 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% ICは、95%における信頼性の最小値と最大値の間隔を表す。

## 【0346】

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 t779cの場合、2人のヘテロ接合体の個体TCが、非ヨーロッパ系コーカソイドの亜集団出身である。
- SNP g1033aの場合、4人のヘテロ接合体の個体GAが、アフリカ系アメリカ人の亜集団出身である。
- SNP c1084aの場合、2人ヘテロ接合体の個体CAが、アフリカ系アメリカ人の亜集団出身である。
- SNP g1135tの場合、5人のヘテロ接合体の個体GTが、アフリカ系アメリカ人、カリブ人、及びメキシコ人の亜集団出身である。
- SNP t1166cの場合、5人のヘテロ接合体の個体TCが、カリブ人、ヨーロッパ系のコーカソイド、及び東南アジア人の亜集団出身である。
- SNP g1181aの場合、唯一のヘテロ接合体の個体GAが、東南アジア人の亜集団出身である。
- SNP a1294cの場合、2人のヘテロ接合体の個体ACが、アフリカ系アメリカ人の亜集団出身である。

30

40

## 【0347】

例3：酵母における天然野生型IFN-7及び変異型IFN-7のタンパク質の発現

a) 真核生物発現ベクターpPicZ-topoにおける天然野生型IFN-7及び変異型IFN-7のクローニング

天然野生型IFN-7、D27N突然変異型IFN-7、V106L突然変異型IFN-7、K159Q突然変異型IFN-7の成熟部分をコードするヌクレオチド配列は、前記SNPのうちの一つについてヘテロ接合体である個体由来のゲノムDNAを鋳型として用いるPCRによって増幅される。

## 【0348】

50

その様な増幅を可能にするPCRプライマーは：

配列番号19：センスプライマー：TGTGATCTGCCTCAGACCCAC

配列番号20：アンチセンスプライマー：TCAATCCTTCTCCTTAATCCTTTT

である。

【0349】

PCR生成物は、メタノールによって誘導可能なハイブリッドプロモーターAOX1の支配下にある真核生物発現ベクターpPicZ-topo(TOPO(商標)-クローニング; Invitrogen Corp.)内に挿入される。

【0350】

このベクターは、酵母ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)における真核生物タンパク質の異種発現を可能にする。

【0351】

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、ベクターはPme1の制限酵素によって直線化され、そしてP.パストリスの酵母株(*In vitro*rogen)がこれらの組換え発現ベクターを用いて形質転換される。

b) 天然野生型IFN-7及び突然変異型IFN-7のP.パストリスにおける異種発現及び精製

天然野生型IFN-7をコードするクローン、又はD27N突然変異型IFN-7、V106L突然変異型IFN-7、又はK159Q突然変異型IFN-7をコードするクローンを含む50mLのBMGY培地(2%ペプトン、1%酵母抽出物、1.34%YNB, 1%グリセロール、100mMリン酸カリウム、0.4mg/Lピオチン、pH6.0)の2つの飽和前培養が、200回転/分(rpm)の振盪で、30で24~48時間行われた。

【0352】

培養が細胞密度に達した場合(600nmの波長で測定すると、1.2の光学密度に相当する)、それは、50OD/mLで、250mLのBMMY培地(2%ペプトン、1%酵母抽出物、1.34%YNB, 0.5%メタノール、100mMリン酸カリウム、0.4mg/Lピオチン、pH6.0)を接種するために使用される。

【0353】

タンパク質の発現は、続いて、180rpmでの培養フラスコの振とうで、30で24時間、1%の終濃度のメタノールによって誘導される。

【0354】

コード配列の上流にある、「アルファ因子」のシグナルペプチド配列の存在により、とは培養液中で酵母によって分泌される。アルファ因子はプロセッシングの間に自然に開裂する。

【0355】

懸濁液を遠心し、そしてタンパク質は、HPLCによって、得られた上清から出発して精製される。

【0356】

予備的な開始段階において、限外ろ過(Lab scale, カットオフ値5000Da, Millipore)、続いて透析は、50mM Tris-Cl pH9.0, 25mM NaClの緩衝液中の酵母の上清の10倍の濃縮を可能にする。

【0357】

最初のクロマトグラフィー段階は、ブルーセファロースカラム(Amersham Pharmacia)上での、親和性によるタンパク質の回収を可能にする。回収された画分中のタンパク質の存在は、一方ではSDS-PAGE電気泳動によって、他方ではIFN-7タンパク質に対して特異的な抗体による免疫検出によって証明される。この段階で、注目のタンパク質の純度は75%超である。

【0358】

10

20

30

40

50

第二の精製段階において、ゲル濾過は、50 mM Tris - Cl pH 9.0, 25 mM NaCl に対する IFN - 7 に相当する回収画分の緩衝液の交換を可能にする。

【0359】

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。組換えタンパク質を含む画分は、50 mM Tris - Cl pH 9.0, 25 mM NaCl 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 (Resource Q 6.0 mL, Pharmacia) に注入される。タンパク質の溶出は、50 mM Tris pH 9 の緩衝液中の、0.025 ~ 1 M の間のグラジエントの通過によって行われる。あるいは、当該精製はブルーシバクロンを用いて実施されうる。

【0360】

注目のタンパク質の純度は SDS / PAGE 上で推定され、そしてタンパク質濃度はデンスシトメトリー (Quantity One, Biorad) 及び BCA アッセイ (ピシニコニン酸及び硫酸銅、Sigma) によって測定された。

【0361】

このプロトコールに従い得られた、精製された天然野生型 IFN - 7、D27N 突然変異型 IFN - 7、V106L 突然変異型 IFN - 7、K159Q 突然変異型 IFN - 7 のタンパク質は、最終的にはより大量のタンパク質を得るためにスケールアップされ、後述する機能的試験に使用される。

【0362】

実施例 4 : シグナル伝達を活性化する野生型及び D72N 突然変異型 IFN - 7 の能力

の評価  
インターフェロンは、JAK (Janus キナーゼ) 及び STAT (シグナルトランスド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。

【0363】

インターフェロン応答性のキメラプロモーターの支配下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定的にトランスフェクションされたヒト細胞系の使用は、この in vitro でのアッセイのための基礎を提供する。したがって、検出されたルシフェラーゼ活性は、核のレベルでシグナルを誘導する IFN の能力を反映する。

【0364】

このレポーター遺伝子アッセイを用いて、D27N 突然変異型 IFN - 7、野生型 IFN - 7、及び野生型 IFN - 2 によって示された用量応答曲線が解析され、そして、IFN タンパク質 1 mg あたりの Introna (インターフェロンアルファ 2b に相当する市販品) を参照して、国際単位で結果が表される。

【0365】

このアッセイは以下の結果をもたらす：

- D72N 突然変異型 IFN - 7 の場合 581 IU / mg
- 野生型 IFN - 7 の場合 489 IU / mg
- 野生型 IFN - 2 の場合 698 IU / mg。

【0366】

これらの結果は、シグナル伝達を活性化する D72N 突然変異型 IFN - 7 の能力が、野生型 IFN - 7 のもの及び野生型 IFN - 2 のものとかかなり類似していることを示す。

【0367】

実施例 5 : D72N 突然変異型 IFN - 7 の免疫調節活性の評価

10

20

30

40

50

IFNのI型(IFNアルファ及びIFNベータ)は、免疫系のある機能を調節することができる。それらは、樹状細胞(DC)の成熟を増大させること：MHCクラスI(HLA-ABC)及びII(HLA-DR)分子の発現の増大、Tリンパ球、CD80、CD86及びCD83の同時刺激に關与する分子の発現の増大、及びTリンパ球の機能の刺激の増大、が証明されている。

【0368】

a) 樹状細胞の成熟に対するD72N突然変異型IFN-7の作用

D72N突然変異型IFN-7の免疫調節活性は、樹状細胞の成熟に対して最初に研究され、そして市販のIntronA製品の代表として選択された野生型IFN-2のものと比較された。

【0369】

それらを実施するために、樹状細胞は、GM-CSF及びIL-4サイトカインの存在下で培養された成人の末梢血単球から最初に生成された。CD14+細胞精製キットを用いての精製の後、これらの樹状細胞は、100ng/mlのD72N突然変異型IFN-7、又は野生型IFN-2の存在下に据えられ、そしてそれらの表現型が、MHCクラスI及びII分子並びにCD40、CD80、CD86、CD83及びCD1aマーカーの発現を探る目的で、FACS解析によって決定された。これらの樹状細胞の突然変異状態も、コントロールを提供するためにIFN処理無しで刺激されていない樹状細胞を用いて得られたもの、及び樹状細胞の成熟を誘導することが知られている1µg/mlのLPS又は2.5ng/mlのTNFを用いて得られたものと比較された。

【0370】

任意の単位で表した、各マーカー及び5つの実験条件についての蛍光強度の測定値の中央値を以下の表に表す：

【表9】

	HLA ABC	HLA DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD1a
IFN $\alpha$ 無し	64	133	24	25	14	15	26
LPS	188	325	567	151	67	17	126
TNF $\alpha$	72	209	355	49	9	13	181
D72N IFN $\alpha$ -7	62	172	200	40	16	7	153
野生型IFN $\alpha$ -2	87	281	331	76	45	15	155

この試験結果は、D72N突然変異型IFN-7が、樹状細胞を刺激することが弱い能力を有することを示す。特に、野生型IFN-2と比較して、D72N突然変異型IFN-7タンパク質は、免疫抑制活性を示す。

【0371】

b) Tリンパ球によるサイトカイン放出に対するD72N突然変異型IFN-7の作用  
D72N突然変異型IFN-7の免疫調節活性も、突然変異型IFN-7の存在下に据えられ、且つ凝集に対する免疫応答を模倣するために強力な抗原(SEB)を用いた、又は用いずに、Tリンパ球によるサイトカイン放出を測定することによって研究された。この試験はまた、コントロールとして使用され、且つIntronAの市販品の代表として選択された野生型IFN-2の存在下で実施された。

【0372】

それらを実施するために、末梢血単球(PBMC)が健康なドナーから単離され、そして

、抗CD3及び抗CD28抗体又はSEBを含む適切な培地中で16時間刺激された。各培地に4µg/mLのD72N突然変異型IFN-7又は野生型IFN-2が添加された。刺激後、Tリンパ球は、抗CD3、抗CD4及び抗CD69抗体を用いて細胞外から、そしてTh1型サイトカイン(IFN-ガンマ)又はTh2型サイトカイン(IL10)に対する特異的な抗体で細胞内から標識された。蛍光細胞は、FACScalibur及びCellQuestソフトウェアを用いて解析された。

【0373】

得られた結果は、D72N突然変異型IFN-7及び野生型IFN-2が、IL-10及びIFN-ガンマの放出を刺激せず、そして、それ故にSEBの不在下でTリンパ球を活性化しないことを示す。対照的に、D72N突然変異型IFN-7及び野生型IFN-2タンパク質は、以下の表に示すように、SEB活性型Tリンパ球によるサイトカイン(IL-10及びIFN-ガンマ)の放出を刺激する。この表は、それぞれCD4+Tリンパ球及びCD8+Tリンパ球についてのCD4+CD69+細胞又はCD8+CD69+細胞のパーセンテージとして表した、SEBの存在下でのTリンパ球によるサイトカイン放出、及び全細胞に対するCD69+細胞のパーセンテージを表す。

10

【表10】

T-リンパ球		IFN $\gamma$	IL-10	CD69+細胞/合計
CD4+CD69+	IFN $\alpha$ 無し	11.9	7.5	1.26
	D72N IFN $\alpha$ -7	38.54	24.16	2.37
	野生型IFN $\alpha$ -2	19.6	24.68	2.7
CD8+CD69+	IFN $\alpha$ 無し	8.73	0.65	4.69
	D72N IFN $\alpha$ -7	35.91	6.06	7.97
	野生型IFN $\alpha$ -2	16.37	4.26	10.02

20

【0374】

これらの結果は、D72N突然変異型IFN-7が、SEB抗原によってあらかじめ活性化されたCD4+Tリンパ球及びCD8+Tリンパ球によるサイトカイン放出(IFNガンマ及びIL-10)を刺激する高い能力を有することを示す。特に、CD4+又はCD8+Tリンパ球によるインターフェロンガンマの賛成は、野生型IFN-2の存在下よりもD72N突然変異型IFN-7の存在下の方が高い。

30

【0375】

c) 単球によるサイトカイン放出に対するD72N突然変異型IFN-7の作用  
最後に、D72N突然変異型IFN-7の免疫調節活性が、細菌の毒性物質(LPS)の不在下又は存在下で、単球によるサイトカイン放出を測定することによって研究された。この試験はまた、コントロールとして使用され、且つIntronAの市販品の代表として選択された野生型IFN-2の存在下で実施された。

40

【0376】

それらを実施するために、末梢血単球(PBMC)が健康なドナーから単離され、そしてそれらの表現型が、CD64+CD4dim細胞(CD64+CD4dimは血液の単球のマーカーである)の相対量を決定するために解析された。一晚の培養の後、これらのPBMCは培養液のみ(刺激されていない細胞)の中で、又はLPS(刺激された細胞)の存在下でインキュベートされた。各培養において、4µg/mLのD72N突然変異型IFN-7又は野生型IFN-2が添加された。培養後、細胞は抗CD64及び抗CD4dimを用いて細胞外から、そしてTh1型サイトカイン(TNFアルファ)、IL-12及び

50

IL-10に対して特異的な抗体を用いて細胞内から標識された。

【0377】

蛍光細胞は、FACScalibur及びCellQuestソフトウェアを用いて解析された。

【0378】

得られた結果は、D72N突然変異型IFN-7及び野生型IFN-2が、LPSの存在下でサイトカイン(IL-10、IL-12及びTNF-アルファ)の放出を刺激しないことを示す。

【0379】

対照的に、LPSの存在下で、単球はサイトカイン(IL-10、IL-12及びTNF-)を放出し、この放出は、以下の表に示すように、D72N突然変異型IFN-7タンパク質又は野生型IFN-2の存在下で更に増大する。この表は、CD64+CD4dim細胞のパーセンテージとして表した、LPSの存在下での単球によるサイトカインの放出、及び全細胞に対するCD64+CD4dim細胞のパーセンテージを表す。

【表11】

	IL-10	IL-12	TNF- $\alpha$	CD4dim CD64+ 細胞/合計
IFN $\alpha$ 無し	16.21	8.52	13.88	3.1
D72N IFN $\alpha$ -7	57.4	27.31	54.92	3.43
野生型IFN $\alpha$ -2	49.34	34.48	50.87	2.71

【0380】

これらの結果は、LPSの存在下、D72N突然変異型IFN-7タンパク質が、単球によるサイトカイン放出を刺激することができることを示す。特に、単球によるIL-10及びTNFの放出の刺激は、野生型IFN-2の存在下よりもD72N突然変異型IFN-7の存在下のほうが高い。

【0381】

実施例6：D72N突然変異型IFN-7のin vitroでの抗増殖活性の評価

a) Daudi Burkitt細胞系のヒトリンパ芽球に対するもの

これらの試験は、4つの異なるIFN-7の型、すなわち野生型IFN-7、V106L突然変異型IFN-7、及びK159Q突然変異型IFN-7で実施される。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。

【0382】

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。

【0383】

Daudi細胞は、続いて、Uptibluе試薬(Uptima)を培養液に添加した後に、5%CO<sub>2</sub>のもと、37°Cで66時間培養される。細胞増殖の速度は、4時間の追加のインキュベーション期間の後に590nm(励起560nm)で放射された蛍光を測定することによって定量される。

【0384】

突然変異型IFN-7タンパク質又は野生型IFN-7の抗増殖活性は、細胞増殖を

50%阻害するIFN $\alpha$ -7の濃度に相当するIC50の測定に基づいている。

【0385】

少なくとも3つの実験が、3回繰り返して両タンパク質及び各濃度について実施された。

【0386】

試験したIFN $\alpha$ -7のそれぞれについて測定される平均IC50値、同様に野生型タンパク質で測定したIC50値以上の、突然変異タンパク質を用いて測定されたIC50値に相当する平均の比率を以下の表に表す。

【0387】

イオン交換クロマトグラフィーによって精製したタンパク質で得られた結果：

【表12】

10

	IC50 (pM)	変異体/野生型比 (標準偏差)
野生型IFN $\alpha$ -7	4.90	—
V106L変異IFN $\alpha$ -7	3.46	0.70 (0.37)
K159Q変異IFN $\alpha$ -7	2.30	0.40 (0.20)

20

【0388】

ブルーシバクロンを用いて精製したタンパク質で得られた結果：

【表13】

	IC50 (pM)	野生型/変異体比 (標準偏差)
野生型IFN $\alpha$ -7	2.40	—
D72N変異IFN $\alpha$ -7	1.10	0.47 (0.17)

30

【0389】

この試験は、3つの突然変異したIFN $\alpha$ -7タンパク質が、Dauidi細胞の増殖を阻害することを示す。更に、細胞の抗増殖活性は、D72N変異型IFN $\alpha$ -7及びK159Q突然変異型タンパク質の場合、野生型IFN $\alpha$ -2と比較して若干増大する。

【0390】

40

b) TF-1赤白血病細胞系に対するもの

D72N突然変異型IFN $\alpha$ -7の作用はまた、TF-1赤白血病細胞系に対しても評価された。この試験はまた、コントロールとして使用され、且つIntron Aの市販品の代表として選択された野生型IFN $\alpha$ -2の存在下で実施された。

【0391】

それらを実施するために、TF-1細胞は、D72N突然変異型IFN $\alpha$ -7又は野生型IFN $\alpha$ -2の濃度を増大させつつ静置し(0.001~1000 ng/mL)、そして当該細胞の増殖を測定した。

【0392】

この実験は3回繰り返し、そして1つの代表的な実験結果を図5に表す。

50

## 【0393】

これらのデータは、D72N突然変異型IFN-7がTF-1細胞に対する弱い抗増殖作用を有することを示す。特に、TF-1赤白血球細胞に対するD72N突然変異型IFN-7の抗増殖作用は、野生型IFN-2のものに類似している。

## 【0394】

実施例7：D72N突然変異型IFN-7の抗ウイルス活性の評価

IFNは、抗ウイルス性の防御において重要な役割を果たしている。IFNの抗ウイルス活性は、IFNが誘導する酵素系に部分的に起因しており、例えば：

- アデノシンオリゴマー合成を触媒する、2'5'オリゴアデニル酸合成酵素。これらのオリゴマーは、一旦活性化したウイルスRNAを破壊するエンドリボヌクレアーゼである

10

- ウイルスの転写物の合成及び/又は成熟を阻害するMxタンパク質(GTPアーゼ)。この活性は主にインフルエンザウイルスに働く。

- 二本鎖RNAによって活性化されるPKRタンパク質。活性化されたPKRはタンパク質合成を阻害する。

## 【0395】

IFNの抗ウイルス活性はまた、他の機構、例えばレトロウイルスの場合、ウイルス粒子の細胞内への侵入、複製、結合、粒子の出口及びウイルス粒子の感染力、の阻害によっても誘導される。

## 【0396】

最終的に、IFNは、免疫系のある機能を調節することによって、特に細胞の媒介に対する応答(特に、MHCクラスI及びII分子の増大、IL-12及びIFN-ガンマの産生の増大、CTL活性の増大、を含む)を支持することによって、間接的な抗ウイルス活性を発揮する。

20

## 【0397】

D72N突然変異型IFN-7の抗ウイルス活性は、in vitroでは細胞培養液中において、そしてin vivoではマウスモデルにおいて、その両方で評価されている。両試験は、コントロールとして使用され、且つIntron Aの市販品の代表として選択された野生型IFN-2と平行して実施された。

## 【0398】

a) in vitroでの細胞培養液における抗ウイルス活性

このアッセイは、水泡性口内炎ウイルス(VSV)を用いての細胞培養液中でのD72N突然変異型IFN-7の抗ウイルス活性の評価を可能にする。

30

## 【0399】

それを実施するために、WISHヒト表皮細胞が、濃度が低下するD72N突然変異型IFN-7、又は野生型IFN-2の存在下で24時間培養された。続いて、当該細胞は水泡性口内炎ウイルス(VSV)にさらに24~48時間感染させられ、そして細胞溶解が測定された。

## 【0400】

試験した異なるIFNの抗ウイルス活性は、VSVによって誘導される細胞溶解の50%を阻害するIFN-7の量に相当する比活性(IU/μg)と比較することによって決定される。IU/μgの単位は、IFNタンパク質1μgあたりIntron A活性を言及する国際単位を表す。

40

## 【0401】

同様の実験が3回実施され、そして1つの代表的な実験で測定された比活性の値は以下の通りである：

- D72N突然変異型IFN-7の場合：53 IU/μg

- 野生型IFN-2の場合：330 IU/μg

## 【0402】

この実験結果は、D72N突然変異型IFN-7タンパク質が、in vitroでの細胞培養

50

液中で弱い抗ウイルス活性を有することを示す。特に、VSVに感染した細胞培養液中で、D72N突然変異型IFN- $\gamma$ は、野生型IFN- $\gamma$ よりも低い抗ウイルス活性を有する。

【0403】

b) *in vivo*でのマウスモデルにおける抗ウイルス活性

この*in vivo*での試験は、EMCV(脳心筋炎ウイルス)マウスモデルにおいて実施される。

【0404】

ヒトIFNは、同量のマウスIFNによって示されるものよりも通常100~1,000倍低い、マウスにおける用量依存性の抗ウイルス活性を示す(Meister et al. (1986). J. Gen. Virol. 67, 1633-1644)。 10

【0405】

脳心筋炎ウイルス(EMCV)を用いるマウスの腹腔内注射は、中枢神経系の関与及び脳炎を特徴とする、急速に進行する致死性疾患をもたらす(Finter NB (1973). Front Biol. 2:295-360)。マウス及びヒトインターフェロン- $\alpha$ は共に、致死性EMCVの感染からマウスを守ることに有効であることが示されている(Tovey and Maury (1999). J. IFN Cytokine Res. 19:145-155)。

【0406】

20匹の6週齢のスィスマウスの群が100 $\times$ LD<sub>50</sub> EMCVに腹腔内から感染させられ、そして1時間後に、そしてそれから3日間1日1回、2 $\mu$ gのD72N突然変異型IFN- $\gamma$ 又は野生型IFN- $\gamma$ の調製物で処理された。コントロール群は、賦形剤のみで処理された動物で実施された。当該動物は、21日間、生存について毎日観察された。 20

【0407】

結果が図6に提示され、そして、D72N突然変異型IFN- $\gamma$ で処理されているマウスの相対的生存率が、未処理マウスの生存率よりもはるかに高いことを示し、このことは、*in vivo*のマウスモデルにおけるD72N突然変異型IFN- $\gamma$ の抗ウイルス活性を証明している。更に、14日後、D72N突然変異型IFN- $\gamma$ で処理したマウスの45%が生存し、一方、野生型IFN- $\gamma$ で処理したマウスの30%が生存している。したがって、*in vivo*のマウスモデルにおけるD72N突然変異型IFN- $\gamma$ の抗ウイルス活性は、野生型IFN- $\gamma$ で処理されているマウスについて観察されたものよりも高い。 30

【0408】

実施例8：悪性フレンド赤白血病細胞をあらかじめ接種したマウスにおけるD72N突然変異型IFN- $\gamma$ の抗腫瘍活性の評価

IFNは、IFN感受性の親のフレンド赤白血病細胞と比べて、IFNの直接的な抗増殖活性に対し耐性があるフレンド赤白血病細胞のクローンの増殖からのマウスの保護に有効であることが示されており(Belardelli et al., Int. J. Cancer, 30, 813-820, 1982; Belardelli et al., Int. J. Cancer, 30, 821-825, 1982)、これは、IFNの抗腫瘍活性における間接的な免疫媒介機構の重要性を反映している。 40

【0409】

以下の実験は、フレンド赤白血病細胞をあらかじめ接種されたマウスにおけるD72N突然変異型IFN- $\gamma$ の抗腫瘍活性の評価、及び市販のIntron A製品の代表として選択された野生型IFN- $\gamma$ のものとの比較を可能にする。

【0410】

それらを実施するために、12匹の6週齢のDBA/2マウスの群が100,000個のIFN耐性フレンド赤白血病細胞(3C18)(20,000LD<sub>50</sub>)を腹腔内から接種され、そして、1時間後、そしてそれから21日間1日1回、2.0 $\mu$ gの野生型IFN- $\gamma$ 又は2.0 $\mu$ gのD72N突然変異型IFN- $\gamma$ 又は等量の賦形剤単独で処理された。当該動物は、続いて、生存について毎日観察され、そして初頭効果解析はその賦 50

形剤単独の群との比較における各処置群の相対的生存とされた。

【0411】

図7に提示した、この実験結果は、IFN $\gamma$ で処理されているマウスと比較して、D72N突然変異型IFN $\gamma$ -7によるマウスの処理が、非常に悪性のフレンド赤白血病細胞(FLC)の接種後に生存しているマウスの数の増大をもたらす。45日後、D72N突然変異型IFN $\gamma$ -7で処理したマウスの34%が生存し、一方、野生型IFN $\gamma$ -2で処理したマウスの50%が生存している。したがって、FLC接種マウスの生存率は、野生型IFN $\gamma$ -2による処理後よりも、D72N突然変異型IFN $\gamma$ -7による処理後の方が若干低い。

【0412】

これらの結果は全て、D72N突然変異型IFN $\gamma$ -7が独特な生物学的特性を有することを示す。

【図面の簡単な説明】

【0413】

【図1】図1Aは、SNP D72Nを含んで成る、本発明に従うコードタンパク質及び天然野生型IFN $\gamma$ -7タンパク質のモデルを表す。図1Bは、図1Aで表したタンパク質の各自の下部のモデルのクローズアップを表す。図1A及び図1Bにおいて、黒いリボンは天然野生型IFN $\gamma$ -7の構造を表し、そして白いリボンはD72N突然変異型IFN $\gamma$ -7タンパク質の構造を表す。

【図2】図2Aは、SNP F116Sを含んで成る、本発明に従うコードタンパク質及び天然野生型IFN $\gamma$ -7タンパク質のモデルを表す。図2Bは、図2Aで表したタンパク質の各自の上部のモデルのクローズアップを表す。図2A及び図2Bにおいて、黒いリボンは天然野生型IFN $\gamma$ -7の構造を表し、そして白いリボンはF116S突然変異型IFN $\gamma$ -7タンパク質の構造を表す。

【図3】図3Aは、SNP R121Kを含んで成る、本発明に従うコードタンパク質及び天然野生型IFN $\gamma$ -7タンパク質のモデルを表す。図3Bは、図3Aで表したタンパク質の各自の中央部のモデルのクローズアップを表す。図3A及び図3Bにおいて、黒いリボンは天然野生型IFN $\gamma$ -7の構造を表し、そして白いリボンはR121K突然変異型IFN $\gamma$ -7タンパク質の構造を表す。

【図4】図4Aは、SNP K159Qを含んで成る、本発明に従うコードタンパク質及び天然野生型IFN $\gamma$ -7タンパク質のモデルを表す。図4Bは、図4Aで表したタンパク質の各自の上部のモデルのクローズアップを表す。図4A及び図4Bにおいて、黒いリボンは天然野生型IFN $\gamma$ -7の構造を表し、そして白いリボンはK159Q突然変異型IFN $\gamma$ -7タンパク質の構造を表す。

【図5】図5は、TF-1細胞系へのD72N突然変異型IFN $\gamma$ -7の抗増殖作用の測定についての試験結果を表す。この図において、横座標はIFN $\gamma$ の濃度(ng/ml)に相当し、そして縦座標は細胞増殖の阻害(%)に相当する。D72N突然変異型IFN $\gamma$ -7(黒いひし形)の抗増殖作用は、野生型IFN $\gamma$ -2(白い四角)のものと比較される。

【図6】図6は、VSVウイルスによってあらかじめ感染させられ、そしてD72N突然変異型IFN $\gamma$ -7タンパク質で処理したマウスの生存率を、野生型IFN $\gamma$ -2で処理したもの、又は処置されてないものと比較して表す。この図において、横座標は生存時間(日数)に相当し、そして縦座標はVSV感染マウスの相対的生存率に相当する。黒いひし形は、D72N突然変異型IFN $\gamma$ -7で処理した、VSV感染マウスについてのデータを表し、そして白い三角は、処理されていない、VSV感染マウスについてのデータを表す。

【図7】図7は、悪性フレンド赤白血病細胞(FLC)をあらかじめ接種し、そしてD72N突然変異型IFN $\gamma$ -7タンパク質で処理したマウスの生存率を、野生型IFN $\gamma$ -2で処理したもの、又は処理してないものと比較して表す。この図において、横座標は生存時間(日数)に相当し、そして縦座標は、FLCを接種したマウスの相対的生存率に相

10

20

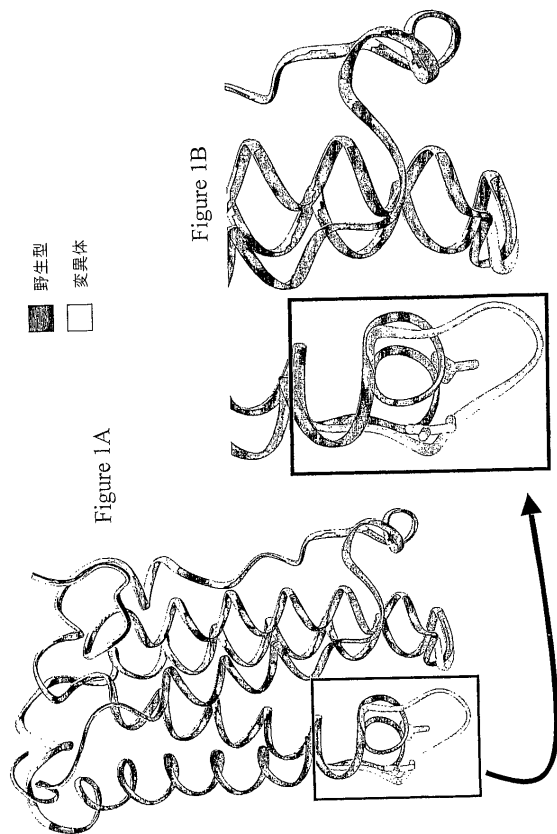
30

40

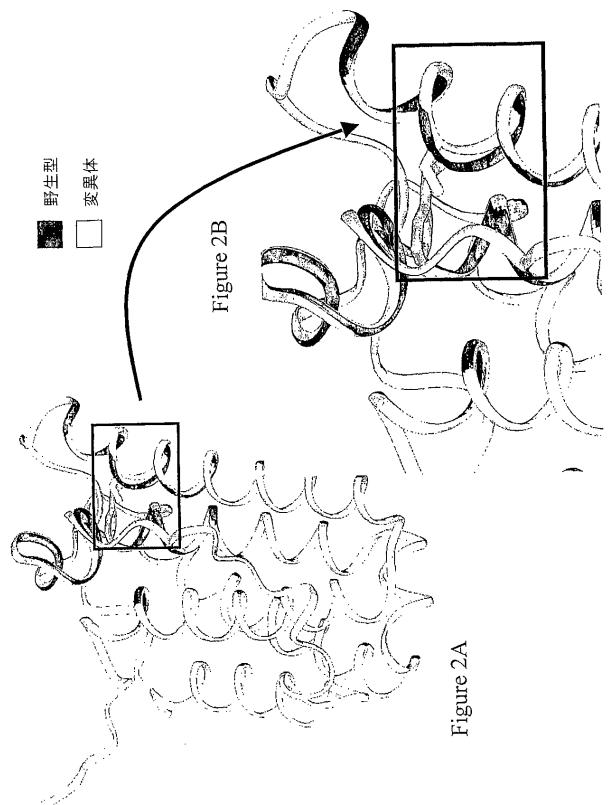
50

当する。黒い四角は、D72N突然変異型IFN- $\gamma$ で処理した、FLC接種マウスについてのデータを表し、そして白い三角は、処理していないFLC接種マウスについてのデータを表す。

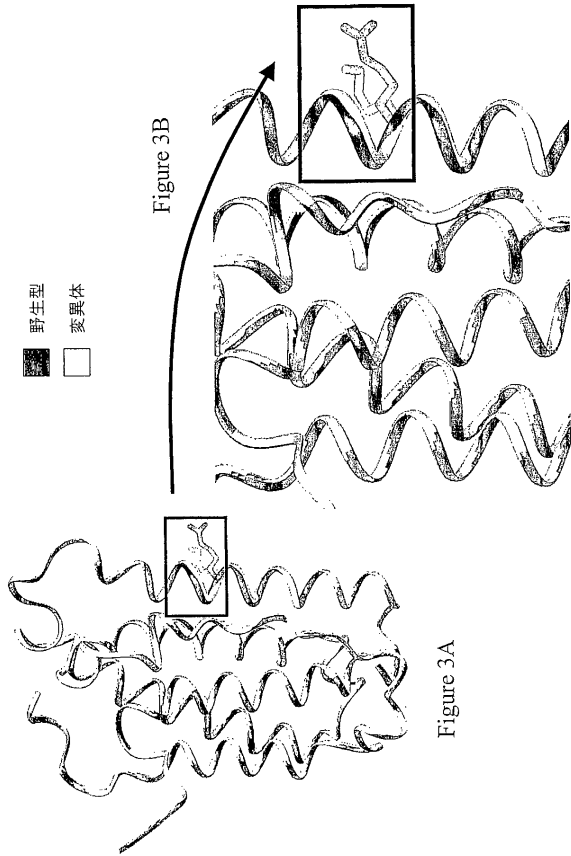
【図1】



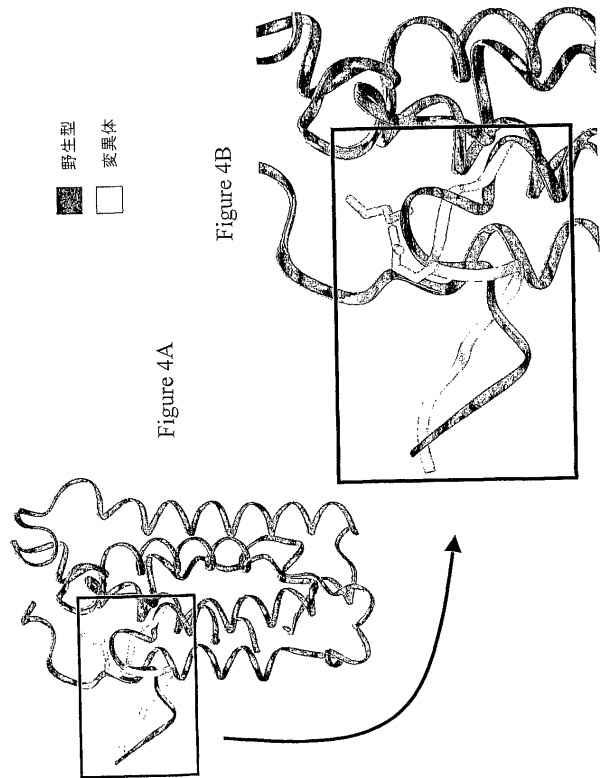
【図2】



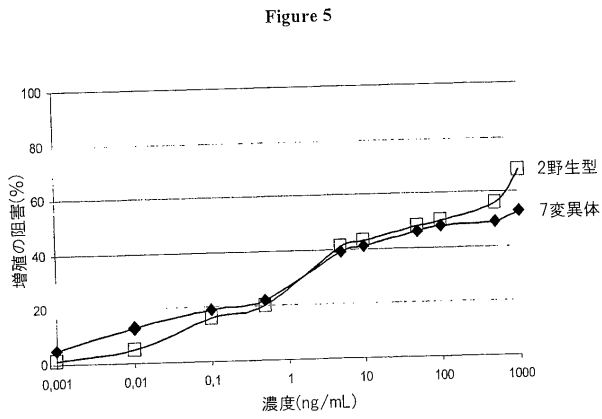
【 図 3 】



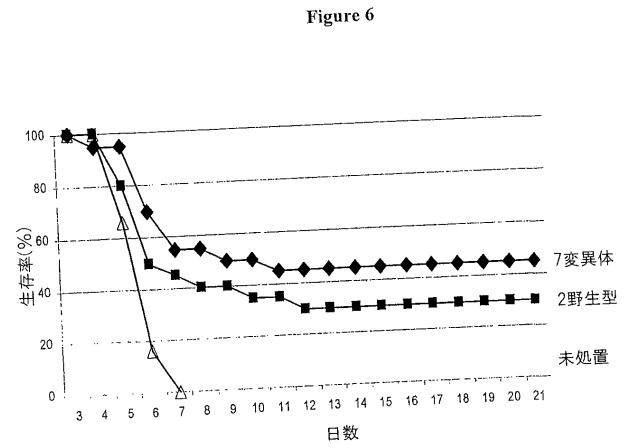
【 図 4 】



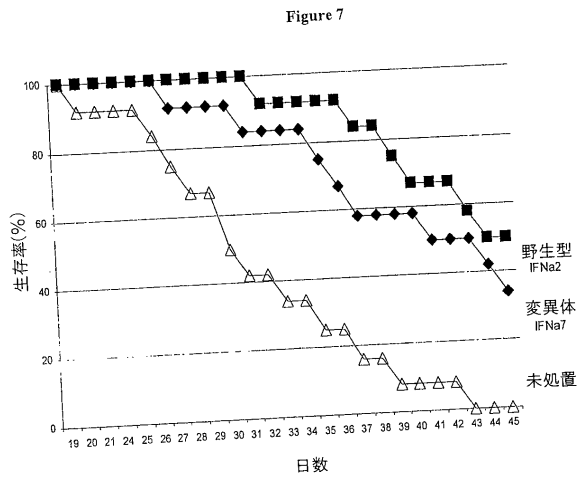
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/101048 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/21
- (21) International Application Number: PCT/EP02/07456
- (22) International Filing Date: 11 June 2002 (11.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01/07588 11 June 2001 (11.06.2001) FR
- (71) Applicant (for all designated States except US): GEN-ODYSSEE (FR/FR); Parc d'Alliages Technopolis, 3, avenue du Canada, Bat Alpha, B.P. 810 Les Ulis, F-91974 Courtabouff (FR).
- (72) Inventor: and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): ESCARY, Jean-Louis [FR/FR]; 4, rue Moxouris, F-78150 Le Chesnay (FR).
- (74) Agent: RINUÿ, SANTARELLI; 14, avenue de la Grande Armée, BP 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/101048 A2

(54) Title: NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN $\alpha$ -7 GENE(57) Abstract: The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene comprising new SNPs, and new polypeptides derived from the wild-type IFN $\alpha$ -7 protein comprising at least one mutation caused by at least one SNP of the invention as well as their therapeutic uses.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN $\alpha$ -7 GENE

## RELATED APPLICATIONS:

The present invention claims priority to French Patent Application 0107588 filed on 11 June 2001 titled << Nouveaux polynucléotides et polypeptides de l'IFN alpha 7 >>.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

*Field of the Invention.*

The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene comprising new SNPs, and new polypeptides derived from the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein comprising mutations caused by these SNPs, as well as their therapeutic uses.

*Related Art.*

The interferon alpha 7 gene, hereinafter referred to as IFN $\alpha$ -7, is described in the following publications:

- Olopade, O. I.; Bohlander, S. K.; Pomykala, H.; Maltepe, E.; Van Melle, E.; Le Beau, M. M.; Diaz, M. O. : "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia."; *Genomics* 14 : 437-443, 1992.
- Henco K, Brosius J, Fujisawa A, Fujisawa JI, Haynes JR, Hochstadt J, Kovacic T, Pasek M, Schambock A, Schmid J, *et al.* : "Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes."; *J Mol Biol* 1985 Sep 20; 185(2) : 227-60.
- Ulrich A, Gray A, Goeddel DV, Dull TJ : "Nucleotide sequence of a portion of human chromosome 9 containing a leukocyte interferon gene cluster."; *J Mol. Biol.* 1982 Apr 15; 156(3) : 467-86.

The nucleotide sequence of this gene is accessible under accession number X02960 in the GenBank database.

The IFN $\alpha$  are known for their cellular antiproliferative effects and their involvements in antiviral and antiparasitic responses.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

2

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 the receptors to the EGF 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 tumor 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, such as the different cancers like for example, 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 or even disorders connected with chemotherapy treatments.

The IFN $\alpha$  are particularly used for the treatment of certain leukemias, metastasizing 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 $\alpha$ -7, have numerous side effects when they are used in pharmaceutical compositions, such as reactions of acute hypersensitivity (urticaria, bronchoconstriction, anaphylactic shock etc.), cardiac

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

3

arrhythmias, low blood pressure, epileptic seizures, problems with thyroid functions, flu-like syndromes (fevers, sweats, myalgias), etc.

Furthermore, the patients treated with IFN $\alpha$  can develop antibodies neutralizing these molecules, thus decreasing their effectiveness.

The inventors have found new polypeptide and new polynucleotide analogs to the IFN $\alpha$ -7 gene capable of having a different functionality from the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

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.

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The invention has as its first object new polynucleotides that differ from the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN $\alpha$ -7 gene, in that they comprise one or several SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

The nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the human reference wild-type IFN $\alpha$ -7 gene is composed of 1983 nucleotides and comprises a coding sequence of 570 nucleotides, from nucleotide 751 (start codon) to nucleotide 1320 (stop codon).

The applicant has identified 14 SNPs in the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN $\alpha$ -7 gene. These 14 SNPs are the following: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c.

It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponding to the positioning of the SNP previously defined is relative to the numbering of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 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 g1033a corresponds to a mutation of the nucleotide guanine (g) at position 1033 of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the reference wild-type IFN $\alpha$ -7 gene, into nucleotide adenine (a).

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

4

These SNPs were identified by the applicant using the determination process described in applicant's patent application FR 00 22894, entitled "Process for the determination of one or several functional polymorphism(s) in the nucleotide sequence of a preselected functional candidate gene and its applications" and filed December 6, 2000, cited here by way of reference.

The process described in this patent application 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, a fragment of the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene, comprising, for example, the coding sequence, was 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 $\alpha$ -7 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 $\alpha$ -7 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 $\alpha$ -7 gene codes for an immature protein of 189 amino acids, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, that will be converted to a mature protein of 166 amino acids, by cleavage of the signal peptide that includes the first 23 amino acids.

Each of the coding SNPs of the invention, namely: t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, a1294c, causes modifications, at the level of the amino acid sequence, of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene.

These modifications in the amino acid sequence are the following:

The SNP t779c causes a mutation of the amino acid valine (V) at position 10 in the immature protein of the IFN $\alpha$ -7 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in alanine (A). This SNP affects an amino acid located in the signal

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

5

sequence that will be cleaved during the process of protein maturation and, thus, this SNP is not found on the mature protein. In the description of the present invention, one will call V10A the mutation encoded by this SNP by reference to the immature protein.

The SNP g1033a causes a mutation of the amino acid aspartic acid (D) at position 95 in the immature protein of the IFN $\alpha$ -7 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in asparagine (N) and at position 72 of the mature protein. In the description of the present invention, one will indifferently call D72N and D95N the mutation encoded by this SNP according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNP c1084a causes a mutation of the amino acid leucine (L) at position 112 in the immature protein of the IFN $\alpha$ -7 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in isoleucine (I) and at position 89 of the mature protein. In the description of the present invention, one will indifferently call L89I and L112I the mutation encoded by this SNP according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNP g1135t causes a mutation of the amino acid valine (V) at position 129 in the immature protein of the IFN $\alpha$ -7 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in leucine (L) and at position 106 of the mature protein. In the description of the present invention, one will indifferently call V106L and V129L the mutation encoded by this SNP according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNP t1166c causes a mutation of the amino acid phenylalanine (F) at position 139 in the immature protein of the IFN $\alpha$ -7 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in serine (S) and at position 116 of the mature protein. In the description of the present invention, one will indifferently call F116S and F139S the mutation encoded by this SNP according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNP g1181a causes a mutation of the amino acid arginine (R) at position 144 in the immature protein of the IFN $\alpha$ -7 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in lysine (K) and at position 121 of the mature protein. In the description of the present invention, one will indifferently call R121K and R144K the

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

6

mutation encoded by this SNP according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNP a1294c causes a mutation of the amino acid lysine (K) at position 182 in the immature protein of the IFN $\alpha$ -7 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in glutamine (Q) and at position 159 of the mature protein. In the description of the present invention, one will indifferently call K159Q and K182Q the mutation encoded by this SNP according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNPs g1033a (D95N), t1166c (F139S), g1181a (R144K), a1294c (K182Q), cause modifications of the spatial conformation of the polypeptides in conformity with the invention compared to the polypeptide encoded by the nucleotide sequence of the wild-type reference IFN $\alpha$ -7 gene.

These modifications 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 fold recognition (for example, SEQFOLD/MSI), homology (for example, MODELER/MSI), electrostatic fields (DELPHI/MSI), and/or molecular simulation (using force field to determine minimum energy conformations as well as dynamic trajectories of molecular systems, for example DISCOVER/MSI).

Examples of such models are given hereinafter in the experimental section.

Computational molecular modeling shows that the mutation D72N on the mature mutated protein causes a structural modification of the short helix (T70-A75) carrying the aspartic acid of position 72. The loop between helices D and E having the tyrosine residue at position 136, facing the aspartic acid of position 72, is also modified.

Thus, the mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

Moreover, the mutation D72N also causes the loss of the negative charge carried by the aspartic acid. Finally, the mutation of the aspartic acid residue of position 72 into an asparagine residue, in the vicinity of the IFN $\alpha$ -7 part that binds to its receptor, must alter the protein function.

Therefore, computational molecular modeling predicts that the presence of the asparagine at position 72 involves a significant modification of the structure and of the

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

7

function of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein. In particular, it is likely that this mutation changes the affinity of the IFN $\alpha$ -7 protein to its receptor.

Computational molecular modeling shows that the mutation F116S on the mature mutated protein causes a slight perturbation of helix D but also a structural modification of the AB-loop at the level of the short helix (E40-D44). The orientation of the glutamate of position 42 located in this short helix is modified due to the mutation.

The most important effect of the F116S mutation is a weakening of the pi-staking effect caused by the network of phenylalanines in the inside of the IFN $\alpha$ -7 structure, which probably causes a higher flexibility in the protein structure.

The hydrogen bond between the nitrogen atom of the phenylalanine peptidic skeleton of position 116 with the oxygen atom of the glutamate carbonyl group of position 114 is conserved.

Thus, the mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

Therefore, computational molecular modeling predicts that the presence of the serine at position 116 involves a significant modification of the structure and of the function of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

Computational molecular modeling shows that the R121K mutation on the mature mutated protein causes a slight perturbation of helix D conformation.

The orientation of the side chains of the amino acids L118, K122, Q125 and F124 is modified by the mutation.

Moreover, it has been demonstrated that the R121 residue of IFN $\alpha$ -2 (equivalent to R120 in the IFN $\alpha$ -7 sequence) may be important for the antiviral activity of interferons (Weber H, Valenzuela D, Lujber G, Gubler M, Weissmann C.; "Single amino acid changes that render human IFN alpha 2 biologically active on mouse cells". (1987) EMBO J. 6 : 591-598.).

Thus, the mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

Therefore, computational molecular modeling predicts that the presence of the lysine at position 121 involves a significant modification of the structure and of the function of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

8

Computational molecular modeling shows that the K159Q mutation on the mature mutated protein causes a disturbance in the loop located after helix E, which effect probably continues till the C-terminal end of the protein. The loop located just before helix B is also modified at the level of the Q149 residue.

The hydrogen bridge between the nitrogen atom of lysine 159 and the oxygen atom of the carbonyl group of threonine 156 (end of helix E with C-terminal loop) is suppressed.

It is believed that the lysine (K) at position 159 may affect the antiviral activity of the interferons C-terminal part (Chang NT, Kung HF, Pestka S.; "Synthesis of a human leukocyte interferon with a modified carboxy terminus in *Escherichia coli*." Arch. Biochem. Biophys. (1983) 221 : 585-589).

Thus, the mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

Therefore, computational molecular modeling predicts that the presence of the glutamine at position 159 involves a significant modification of the structure and of the function of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein.

Other SNPs in conformity with the invention, namely: a559c, g580a, c667t, c682t, g1125a, g1161a, and a1212g, do not involve modification of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene at the level of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2.

The SNPs g1125a, g1161a, a1212g, are silent and the SNPs a559c, g580a, c667t, c682t, are non-coding.

Indeed, the silent SNP g1125a does not modify the amino acid glutamine (Q) at position 125 on the amino acid sequence SEQ ID NO. 2. The silent SNP g1161a does not modify the amino acid glutamic acid (E) at position 137 on the amino acid sequence SEQ ID NO. 2. Similarly, the silent SNP a1212g does not modify the amino acid leucine (L) at position 154 on the amino acid sequence SEQ ID NO. 2.

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. Examples of genotyping are given, hereinafter, in the experimental section.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

9

The determination of the functionality of the polypeptides of the invention can equally be carried out by a test of their biological activity.

In this regard, it is possible to measure, for example, signal transduction, dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, *in vitro* or *in vivo* antiviral activity, anti-tumoral activity in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line of polypeptides in conformity with the invention and compare with the wild-type IFN $\alpha$ -7, or the wild-type IFN $\alpha$ -2 chosen as a representative of a commercial product.

The invention also has for an object 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.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1A represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP D72N and the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein. Figure 1B represents a close up of the model of the inferior part of each one of the proteins represented in Figure 1A.

In Figures 1A and 1B, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein and the white ribbon represents the structure of the D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein.

Figure 2A represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP F116S and the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein. Figure 2B represents a close up of the model of the superior part of each of the proteins represented in Figure 2A.

In Figures 2A and 2B, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein and the white ribbon represents the structure of the F116S mutated IFN $\alpha$ -7 protein.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

10

Figure 3A represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP R121K and the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein. Figure 3B represents a close up of the model of the central part of each of the proteins represented in Figure 3A.

In Figures 3A and 3B, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein and the white ribbon represents the structure of the R121K mutated IFN $\alpha$ -7 protein.

Figure 4A represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP K159Q and the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein. Figure 4B represents a close up of the model of the superior part of each of the proteins represented in Figure 4A.

In Figures 4A and 4B, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein and the white ribbon represents the structure of the K159Q mutated IFN $\alpha$ -7 protein.

Figure 5 represents the results of the test for measuring the antiproliferative effect of D72N mutated IFN $\alpha$ -7, on the TF-1 cell line. In this figure, the abscissas correspond to the concentration of IFN $\alpha$  (ng/mL) and the ordinates correspond to the inhibition of cell proliferation (%). The antiproliferative effect of the D72N mutated IFN $\alpha$ -7 (black diamonds) is compared to that of wild-type IFN $\alpha$ -2 (white squares).

Figure 6 represents the survival rate of mice previously infected by VSV virus and treated with D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein, in comparison to those treated with wild-type IFN $\alpha$ -2, or those which have not been treated. In this figure, the abscissas correspond to the time of survival (days) and the ordinates correspond to the relative survival rate of VSV infected mice. The black diamonds represent the data for VSV infected mice treated with D72N mutated IFN $\alpha$ -7. The black squares represent the data for VSV infected mice treated with wild-type IFN $\alpha$ -2, and the open triangles represent the data for VSV infected mice which have not been treated.

Figure 7 represents the survival rate of mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells (FLC) and treated with D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein, in comparison to those treated with wild-type IFN $\alpha$ -2, or those which have not

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

11

been treated. In this figure, the abscissas correspond to the time of survival (days) and the ordinates correspond to the relative survival rate of FLC inoculated mice. The black diamonds represent the data for FLC inoculated mice treated with D72N mutated IFN $\alpha$ -7. The black squares represent the data for FLC inoculated mice treated with wild-type IFN $\alpha$ -2, and the open triangles represent the data for FLC inoculated mice which have not been treated.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

##### *Definitions.*

"Nucleotide sequence of the reference wild-type gene" is understood as the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the human IFN $\alpha$ -7 gene.

This sequence is accessible in GenBank under accession number X02960 and it is described in the following publications:

- Olopade, O. I.; Bohlander, S. K.; Pomykala, H.; Maltepe, E.; Van Melle, E.; Le Beau, M. M.; Diaz, M. O. : "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia."; *Genomics* 14 : 437-443, 1992.
- Henco K, Brosius J, Fujisawa A, Fujisawa JI, Haynes JR, Hochstadt J, Kovacic T, Pasek M, Schambeck A, Schmid J, *et al.* : "Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes."; *J Mol Biol* 1985 Sep 20; 185(2) : 227-60.
- Ullrich A, Gray A, Goeddel DV, Dull TJ : "Nucleotide sequence of a portion of human chromosome 9 containing a leukocyte interferon gene cluster."; *J Mol. Biol.* 1982 Apr 15; 156(3) : 467-86.

"Natural wild-type IFN $\alpha$ -7 protein" or "wild-type IFN $\alpha$ -7 protein" are understood as the mature protein encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN $\alpha$ -7 gene. The natural wild-type immature protein IFN $\alpha$ -7 corresponds to the peptide sequence shown in SEQ ID NO. 2.

"Polynucleotide" is understood as 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.

"Polypeptide" is understood as 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 can be composed of amino acids other than the 20 amino acids defined by the genetic code. A polypeptide 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 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.

For example, polypeptide modifications is understood to include 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, PEGylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodization, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processes, phosphorylation, prenylation, racemization, seneloylation, 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.

"Isolated polynucleotide" or "isolated polypeptide" are understood as a polynucleotide or a polypeptide respectively such as previously defined which is isolated from the human body or otherwise produced by a technical process.

"Identity" is understood as 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 NO. 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 NO. 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 NO. 1 or the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, it being understood that these sequences contains at least one of the SNPs of the invention, are considered as variants of these sequences.

Usually a polynucleotide according to the invention possesses the same or practically the same biological activity as the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 comprising at least one of the SNPs of the invention.

In similar fashion, usually a polypeptide according to the invention possesses the same or practically the same biological activity as the amino acid sequence SEQ ID NO. 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, on a nucleotide sequence, can be coding, silent or non-coding.

A coding SNP is a polymorphism included in the coding sequence of a nucleotide sequence that involves a modification of an amino acid 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 included in the coding sequence of a nucleotide sequence that does not involve a modification of an amino acid in the amino acid sequence encoded by this nucleotide sequence.

A non-coding SNP is a polymorphism included 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 a site enhancer sequence.

By "functional SNP" is understood a SNP, such as previously defined, which is included in a nucleotide sequence or an amino acid sequence, having a functionality.

By "functionality" is understood the biological activity of a polypeptide or of a polynucleotide.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

15

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 wild-type reference gene or of this latter nucleotide sequence.

The functionality of a polypeptide or of a polynucleotide according to the invention can equally consist in 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 has for its first object 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 NO. 1 or its coding sequence (from nucleotide 751 to nucleotide 1320), it being understood that this nucleotide sequence comprises at least one of the following coding SNPs t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, a1294c, or
- b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponds to the positioning of the SNPs in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

The present invention relates equally to an isolated polynucleotide comprising:

- a) a nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following coding SNPs: t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, a1294c; or
- b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

Preferably, the polynucleotide of the invention consists of the sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

16

comprises at least one of the following coding SNPs: t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, a1294c.

According to the invention, the polynucleotide previously defined comprises a single coding SNP selected from the group consisting of: t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, and a1294c.

More preferably, the polynucleotide previously defined comprises the coding SNP g1033a.

A polynucleotide such as previously defined can equally include at least one of the following non-coding and silent SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, g1125a, g1161a, and a1212g.

The present invention equally has for its object an isolated polynucleotide comprising or consisting of:

a) a nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or if necessary its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following non coding or silent SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, g1125a, g1161a, and a1212g; or

b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

It is well understood that only the following silent SNPs g1125a, g1161a, a1212g, are located in the coding sequence of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

The present invention also concerns an isolated polynucleotide consisting of a part of:

a) a nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c, 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 also concerns an isolated polynucleotide comprising:

a) all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, provided that such nucleotide sequence, or part of sequence, comprises at least one SNP selected from the group

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

17

consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g; or

- b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

The isolated polynucleotide as defined above is composed of at least 10 nucleotides, and preferably from 10 to 40 nucleotides.

According to the invention, the polynucleotide previously defined comprises a single coding SNP selected from the group consisting of: t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a, and a1294c.

More preferably, the polynucleotide previously defined comprises the coding SNP g1033a.

The present invention also has for its object an isolated polynucleotide coding for a polypeptide comprising all or part of:

- a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; or  
b) the amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 in the sequence of amino acids SEQ ID NO. 2;

it being understood that said polypeptide has an amino acid sequence comprising at least one of the following coding SNPs: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, and K182Q.

It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponding to the positioning of the V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, and K182Q SNPs is relative to the numbering of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2.

According to a preferred object of the invention, the previously defined polypeptide comprises a single coding SNP such as defined above.

More preferably, an isolated polynucleotide according to the invention codes for a polypeptide comprising all or part of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having the coding SNP D95N.

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.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

18

A polynucleotide according to the invention can equally be obtained by site-directed mutagenesis starting from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene by modifying the wild-type nucleotide by the mutated nucleotide for each SNP on the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

For example, a polynucleotide according to the invention, comprising SNP g1033a can be obtained by site-directed mutagenesis starting from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene by modifying the nucleotide guanine by the nucleotide adenine at position 1033 on the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

The processes of site-directed mutagenesis that can be implemented in this way are well known to a person skilled in the art. The publication of TA Kunkel in 1985 in "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82:488 can notably be mentioned.

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 conditions.

"Stringent hybridization conditions" is generally but not necessarily understood as the chemical conditions that permit a hybridization 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 %.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

19

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 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 g1033a, its complementary nucleotide sequence comprises the nucleotide thymine (t) at the equivalent of position 1033.

Identification, hybridization and/or amplification of a polynucleotide comprising a SNP

The present invention also 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 NO. 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 (preferably at least 90 % identity, more preferably 95 % identity and particularly 100 % identity) with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or if necessary its coding sequence (from nucleotide 751 to nucleotide 1320),

it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

20

The present invention also concerns a method for identifying or amplifying all or part of a polynucleotide having 80 to 100% identity with nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 comprising hybridizing, under appropriate hybridization conditions, said polynucleotide with the polynucleotide according to the invention.

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 NO. 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 NO. 1 or if necessary its coding sequence (from nucleotide 751 to nucleotide 1320),

it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c.

The present invention also concerns a method for genotyping all or part of a polynucleotide having 80 to 100% identity with nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 comprising the steps of amplifying a region of interest in the genomic DNA of a subject or a population of subjects, and determining the allele of at least one position in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 chosen from the group consisting of 559, 580, 667, 682, 779, 1033, 1084, 1125, 1135, 1161, 1166, 1181, and 1212.

According to the invention, the genotyping may be carried out on an individual or a population of individuals.

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.

"Population of individuals" is understood as a group of 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 individuals, preferably from 100 to 300 individuals.

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: 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 in particular viral infections like 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 or even disorders connected with chemotherapy treatments.

A functional SNP according to the invention is preferably genotyped in a population of individuals.

Multiple technologies exist which can be implemented in order to genotype SNPs (see notably Kwok *Pharmacogenomics*, 2000, vol 1, pp 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.

It can be carried out on a product obtained after amplification by polymerase

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

22

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.

For example, the sense and antisense nucleotide sequences corresponding to the primers used for the PCR amplification of a nucleotide sequence comprising the IFN $\alpha$ -7 coding sequence can be, respectively:

SEQ ID NO. 3: Sense primer: TACCCACCTCAGGTAGCC

SEQ ID NO. 4: Antisense primer: CATGAAAGTGTGAGATGATGC

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment having a length of 669 nucleotides, from nucleotide 711 to nucleotide 1379 in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 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 and notably, if necessary, 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 the software 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

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

23

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: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -7 gene.

It is well understood that said SNPs are numbered in accordance with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

This databank may be analyzed for determining statistically relevant associations between:

- (i) at least one of the following SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -7 gene, and
- (ii) a disease or a resistance to a disease.

The present invention also concerns the use of at least one of the following SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c, in a polynucleotide of the IFN $\alpha$ -7 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 hereinafter.

The present invention concerns also a method for determining statistically relevant associations between at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c, in the IFN $\alpha$ -7 gene, and a disease or resistance to disease comprising:

- a) Genotyping a group of individuals;

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

24

- 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 equally concerns a method for diagnosing or determining a prognosis of a disease or a resistance to a disease comprising detecting at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c, in the IFN $\gamma$ -7 gene.

Detection of the SNPs of the invention may be carried out by methods well known to a person skilled in the art such as those described below.

The detection of at least one SNP of the invention 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 the polynucleotide isolated from the subject with the nucleotide sequence of a polynucleotide comprising at least one SNP of the invention.

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. A combination of DNA hybridization methods and enzymatic digestion may also be used as in the Invader assay. Oligonucleotide probes comprising a polynucleotide fragment of the invention can equally be used to conduct the screening.

Expression vector and host cells.

The present invention also has for its object a recombinant vector comprising at least one polynucleotide according to the invention.

Numerous expression systems can be used, including without limitation chromosomes, episomes, and derived viruses. More particularly, the recombinant vectors used can be derived from bacterial plasmids, transposons, yeast episomes, 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*, Sambrook *et al.*, 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

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 also has for its object 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.*, 2nd ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995, and *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, *supra*, such as transfection by calcium phosphate,

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

26

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 active product in pharmaceutical compositions, as will be seen hereinafter.

#### Polypeptide.

The present invention also has for its object 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 all or part of:

- a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or
  - b) the amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2,
- it being understood that said polypeptide contains at least one of the following coding SNPs: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, K182Q.

The polypeptide of the invention can equally comprise all or part of:

- a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or
- b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2,

it being understood that said polypeptide contains at least one of the following coding SNPs: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, K182Q.

The polypeptide of the invention can more particularly consist of all or part of:

- a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or
- b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2,

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

27

it being understood that said polypeptide contains at least one of the following coding SNPs: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, K182Q.

Preferably, a polypeptide according to the invention contains a single coding SNP selected from the group consisting of: V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K, K182Q.

More preferably, the polypeptide according to the invention comprises amino acids 24 through 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and has the coding SNP D95N.

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 the help of 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.

"Culture medium" is understood as 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 equally permit the latter to give back 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 has for its object a process for obtaining an immunospecific antibody.

"Antibody" is understood as the monoclonal, polyclonal, chimeric, simple chain, 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.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

28

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.*, "The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer," in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Vol. 27, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series) (eds. R.A. Reisfeld and S.Sell), pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc. N.Y., 1985, pp. 77-96).

The techniques of single chain antibody production such as described, for example, in US Patent No. 4,946, 778 can equally be used.

Transgenic animals such as mice, for example, can equally be used to produce humanized antibodies.

#### Agents interacting with the polypeptide of the invention.

The present invention equally has for its object a method for identifying an agent among one or more compounds to be tested which activates or inhibits the activity of a polypeptide according to the invention, comprising:

- a) providing host cells comprising a recombinant vector comprising a polynucleotide according to the invention containing at least one coding SNP;
- b) contacting said host cells with said compounds to be tested,

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

29

c) determining the activating or inhibiting effect upon the activity of said polypeptide whereby said activating or inhibiting agent is identified.

A polypeptide according to the invention can also be employed for a method 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 method, 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 c) of the above method 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 equally 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 has for its object a method for identifying an agent among one or more compounds to be tested whose activity is potentiated or inhibited by a polypeptide according to the invention, comprising:

- a) providing host cells comprising a recombinant vector comprising a polynucleotide according to the invention containing at least one coding SNP;
- b) contacting said host cells with said compounds to be tested,

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

30

- c) determining the potentiating or inhibiting effect upon the activity of said agent whereby said potentiated or inhibited agent is identified.

An agent potentiated 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, potentiated or inhibited directly or indirectly by the polypeptide of the invention, can consist of polypeptides such as, for example, membranal or nuclear receptors, kinases and more preferably tyrosine kinases, transcription factor or polynucleotides.

#### Detection of diseases.

The present invention also has for object a method 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, infectious diseases, venereal diseases, immunologically related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic 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.

Said infectious diseases include viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.

Said immunologically and auto-immunologically related diseases may include the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.

Said metabolic diseases may include such non-immune associated diseases as obesity.

Said diseases of the central nervous system may include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.

Said diseases and disorders may also include healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and osteoporosis.

This method also permits 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, is going to 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 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

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

33

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.

The present invention also has as an object a diagnostic kit comprising one or more of: an isolated polynucleotide according to the invention ; a previously defined recombinant vector ; a previously defined host cell ; a polypeptide according to the invention ; a previously defined antibody.

#### Therapeutic compounds and treatments of diseases.

The present invention also has for its object a therapeutic compound 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 therapeutic compound intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases. These diseases can be disorders and/or human diseases, such as cancers and tumors, infectious diseases, venereal diseases, immunologically related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic 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.

Said infectious diseases include viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.

Said immunologically and auto-immunologically related diseases may include

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

34

the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.

Said metabolic diseases may include such non-immune associated diseases as obesity.

Said diseases of the central nervous system may include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.

Said diseases and disorders may also include healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and osteoporosis.

Preferably, a polypeptide according to the invention can also be used for the manufacture of a therapeutic compound intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases, such as certain viral infections such as chronic hepatitis B and C, leukemias such as hairy-cell leukemia and chronic myeloid leukemia, multiple myelomas, follicular lymphomas, carcinoid tumors, malignant melanomas, metastasizing renal carcinomas, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, as well as tumors that appear following an immune deficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, and genital warts or venereal diseases.

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 therapeutic compound.

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. These diseases can be disorders and/or human diseases, such as cancers and tumors, infectious diseases, venereal diseases, immunologically

related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic 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.

Said infectious diseases include viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.

Said immunologically and auto-immunologically related diseases may include the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.

Said metabolic diseases may include such non-immune associated diseases as obesity.

Said diseases of the central nervous system may include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.

Said diseases and disorders may also include healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and osteoporosis.

Preferably, the invention concerns the use of 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, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases, such as certain viral infections such as chronic hepatitis B and C, leukemias such as hairy-cell leukemia and chronic myeloid leukemia, multiple myelomas, follicular lymphomas, carcinoid tumors, malignant melanomas, metastasizing renal carcinomas, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, as well as tumors that appear following an immune deficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, and genital warts or venereal diseases.

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, gels, capsules, 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 cytokines such as interleukins or interferons, 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.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

37

The present invention also concerns a method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group consisting of cancers and tumors, infectious diseases, immunologically and auto-immunologically related diseases, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the previously defined agent, plus a pharmaceutically acceptable excipient.

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, 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 therapeutic compound 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,

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

38

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 therapeutic compound 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 also concerns a method for increasing or decreasing the activity in a subject of the polypeptide according to the invention comprising administering a therapeutically effective quantity of one or more of: an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 provided that such nucleotide sequence comprises at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t,

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

39

g1161a, t1166c, g1181a, a1212g and a1294c, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector, wherein said host cell may be obtained from said subject to be treated; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K and K182Q; an antibody specific for said polypeptide; and a pharmaceutically acceptable excipient.

The present invention concerns also the use of a IFN $\alpha$ -7 protein for the preparation of a medicament for the prevention or the treatment of an individual having a disorder or a disease caused by a IFN $\alpha$ -7 variant linked to the presence in the genome of said individual 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 NO. 1, provided that said nucleotide sequence comprises one of the following SNPs: a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g, and a1294c.

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, infectious diseases, venereal diseases, immunologically related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic 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.

Said infectious diseases include viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.

Said immunologically and auto-immunologically related diseases may include the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis,

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

40

multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.

Said metabolic diseases may include such non-immune associated diseases as obesity.

Said diseases of the central nervous system may include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.

Said diseases and disorders may also include healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and osteoporosis.

The present invention concerns also a method for preventing or treating in an individual a disorder or a disease linked to the presence in the genome of said individual of a polynucleotide according to the invention, comprising administering a therapeutically effective amount of one or more of: an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 and having at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, a1212g and a1294c, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, R144K and K182Q; an antibody specific for said polypeptide; and a pharmaceutically acceptable excipient.

Mimetic compounds of an IFN $\alpha$ -7 polypeptide comprising the SNP D95N of the invention.

The present invention also concerns a new compound having a biological activity substantially similar to that of the polypeptide of:

- a) amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or
- b) amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2,

provided that said amino acid sequences under a) and b) comprise the SNP D95N.

Said biological activity may be evaluated, for example, by measuring signal

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

41

transduction, dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, *in vitro* or *in vivo* antiviral activity, anti-tumoral activity in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line, as described in the experimental section.

As mentioned in the experimental section, the D95N mutated IFN $\alpha$ -7 shows:

- a weak capacity to stimulate dendritic cell maturation
- a high capacity to stimulate cytokine release (IFN gamma and IL-10) by CD4+ T-lymphocytes and CD8+ T-lymphocytes preactivated by SEB antigen
- a capacity to stimulate cytokine (IL-10, IL-12, and TNF- $\alpha$ ) release by monocytes
- a capacity to inhibit Daudi cell proliferation
- a weak antiproliferative activity on TF-1 cells
- an antiviral activity *in vitro* in cell culture infected with VSV
- a high antiviral activity *in vivo* in mice infected with EMCV
- an anti-tumoral activity in FLC-inoculated mice

Also as mentioned in the experimental section, in comparison to wild-type IFN $\alpha$ -2, the D95N mutated IFN $\alpha$ -7 protein possesses:

- a similar capacity to activate signal transduction
- a lower capacity to stimulate dendritic cell maturation
- a higher capacity to stimulate IFN gamma release by CD4+ T-lymphocytes and CD8+ T-lymphocytes preactivated by SEB antigen
- a higher capacity to stimulate IL-10 and TNF- $\alpha$  release by monocytes
- a similar antiproliferative activity on TF-1 cells
- a lower antiviral activity *in vitro* in cell culture infected with VSV
- a higher antiviral activity *in vivo* in mice infected with EMCV
- a slightly lower anti-tumoral activity in FLC-inoculated mice

Also as mentioned in the experimental section, in comparison to wild-type IFN $\alpha$ -7, the D95N mutated IFN $\alpha$ -7 protein possesses:

- a similar capacity to activate signal transduction
- a slightly higher capacity to inhibit Daudi cell proliferation.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

42

A new compound of the invention, such as previously defined, may possess a biological activity substantially similar to that of the D95N mutated IFN $\alpha$ -7.

Said compound may also have a biological activity, such as IFN-gamma release by T-lymphocytes, IL-10 and TNF- $\alpha$  release by monocytes, *in vivo* antiviral activity in mice infected with EMCV, and/or an anti-tumoral activity in FLC-inoculated mice, which is even higher than that of the D95N mutated IFN $\alpha$ -7.

Said compound may also have a biological activity, such as dendritic cell maturation, which is even lower than that of the D95N mutated IFN $\alpha$ -7.

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 concerns the use of a polypeptide of the invention containing the D95N SNP, for the identification of a compound such as defined above.

The present invention also concerns a method for the identification of a compound of the invention, comprising the following steps:

- a) Determining the biological activity of the compound to be tested, such as signal transduction, dendritic cell maturation, cytokine release by CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, *in vitro* or *in vivo* antiviral activity, anti-tumoral activity in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line, for example;
- b) Comparing:
  - i) the activity determined in step a) of the compound to be tested, with
  - ii) the activity of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences comprise the D95N SNP; 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 or higher, activity compared to that of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and

189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences comprise the D95N SNP.

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 as that of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences comprise the D95N SNP.

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, infectious diseases, venereal diseases, immunologically related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

44

cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic 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.

Said infectious diseases include viral infections comprising chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.

Said immunologically and auto-immunologically related diseases may include the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.

Said metabolic diseases may include such non-immune associated diseases as obesity.

Said diseases of the central nervous system may include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.

Said diseases and disorders may also include healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and osteoporosis.

Preferably, 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 certain viral infections such as chronic hepatitis B and C, leukemias such as hairy-cell leukemia and chronic myeloid leukemia, multiple myelomas, follicular lymphomas, carcinoid tumors, malignant melanomas, metastasizing renal carcinomas, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, as well as tumors that appear following an immune deficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, and genital warts or venereal diseases.

EXPERIMENTAL SECTION

Example 1: Modeling of a protein encoded by a polynucleotide of nucleotide sequence containing SNP g1033a, t1166c, g1181a, or a1294c, and of the protein encoded by the nucleotide sequence of the wild-type reference gene

In a first step the three-dimensional structure of IFN $\alpha$ -7 was constructed starting from that of IFN $\alpha$ -2 whose structure is available in the PDB database (code 1ITF) and by using the software Modeler (MSI, San Diego, CA).

The mature polypeptide fragment was then modified in such a fashion as to reproduce the mutation D72N, F116S, R121K, or K159Q.

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 results of these modelings are visualized on Figures 1, 2, 3 and 4.

Example 2: Genotyping of the SNPs t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a or a1294c in a population of individuals

The genotyping of SNPs is based on the principle of the minisequencing wherein the product is detected by a reading of 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. This 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

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

46

dideoxynucleotides. The product resulting from this lengthening process is directly analyzed by a reading of 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
- 5) Interpretation of the reading

The genotyping steps 1 and 2 are carried out in the same conditions for each of the SNPs t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a and a1294c. 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 $\alpha$ -7 gene is carried out starting from genomic DNA coming 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:

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

47

Phylogenetic Population	Specific Ethnic Population	Total	%
<b>African American</b>	African American	50	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>50</i>	<i>18.7</i>
<b>Amerind</b>	South American Andes	10	66.7
	South West American Indians	5	33.3
	<i>Subtotal</i>	<i>15</i>	<i>5.6</i>
<b>Caribbean</b>	Caribbean	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>10</i>	<i>3.7</i>
<b>European Caucasoid</b>	North American Caucasian	79	79.8
	Iberian	10	10.1
	Italian	10	10.1
	<i>Subtotal</i>	<i>99</i>	<i>36.9</i>
<b>Mexican</b>	Mexican	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>10</i>	<i>3.7</i>
<b>Northeast Asian</b>	Chinese	10	50.0
	Japanese	10	50.0
	<i>Subtotal</i>	<i>20</i>	<i>7.5</i>
<b>Non-European Caucasoid</b>	Greek	8	21.6
	Indo-Pakistani	9	24.3
	Middle-Eastern	20	54.1
	<i>Subtotal</i>	<i>37</i>	<i>13.8</i>
<b>Southeast Asian</b>	Pacific Islander	7	41.2
	South Asian	10	58.8
	<i>Subtotal</i>	<i>17</i>	<i>6.3</i>
<b>South American</b>	South American	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>10</i>	<i>3.7</i>
<i>Total</i>		<i>268</i>	<i>100</i>

The genomic DNA coming from each one of these individuals constitutes a sample.

For all the SNPs, the PCR amplification is carried out starting from the following primers:

SEQ ID NO. 3: Sense primer: TACCCACCTCAGGTAGCC

SEQ ID NO. 4: Antisense primer: CATGAAAGTGTGAGATGATGC

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment having a length

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

48

of 669 nucleotides, from nucleotide 711 to nucleotide 1379 in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 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  $\mu$ l 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 reaction mixture of 5  $\mu$ l per sample. This reaction mixture is composed of the following reagents:

Supplier	Reference	Reactant	Initial Conc.	Vol. per tube (µl)	Final conc.
AP Biotech	E70092X	SAP	1 U/µl	0.5	0.5/reaction
AP Biotech	070073Z	Exo I	10 U/µl	0.1	1/reaction
AP Biotech	Supplied with SAP	Buffer SAP (X)	10	0.5	1
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 µl	3.9	
		PCR product		5 µl	
		Total vol.		10 µl	

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 reaction mixture of 5 µl per prepared sample.

The minisequencing 3) and the reading steps 4) and interpretation of reading 5) are specific to each of the SNPs t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a and a1294c.

All these steps are described hereinafter precisising the specific conditions used for each one of these polymorphisms.

### 3) Minisequencing

The sequences of the 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:

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

50

SNP	Primers tested	Optimal condition retained for the genotyping
t779c	SEQ ID NO. 5: sense primer: gtcctttcttactgatgg SEQ ID NO. 6: antisense primer: tftagctgagfaccagcagc	sense primer + ddCTP-R110 + ddTTP-Tamra
g1033a	SEQ ID NO. 7: Sense primer: tcaatctctcagcacagag SEQ ID NO. 8: Antisense primer: ttccaagcagcagatgagt	antisense primer + ddCTP-R110 + ddTTP-Tamra
c1084a	SEQ ID NO. 9: sense primer: tagaaaaatttccactgaa SEQ ID NO. 10: antisense primer: gtcattcagttgctgfaaa	antisense primer + ddTTP-R110 + ddGTP-Tamra
g1135t	SEQ ID NO. 11: sense primer: gttgatacagagggttggg SEQ ID NO. 12: antisense primer: catcagggagctctcca	antisense primer + ddATP-R110 + ddCTP-Tamra
t1166c	SEQ ID NO. 13: Sense primer: tccctgatgatgaggact SEQ ID NO. 14: Antisense primer: attctcaccagcaggatg	antisense primer + dGTP-R110 + ddATP-Tamra
g1181a	SEQ ID NO. 15: Sense primer: ggacttcacctggctgtga SEQ ID NO. 16: Antisense primer: tgattctttggaagtatttc	sense primer + ddATP-R110 + ddGTP-Tamra
a1294c	SEQ ID NO. 17: Sense primer: tctcttttcaacaacttg SEQ ID NO. 18: Antisense primer: ctctctcttaactcttttt	sense primer + ddCTP-R110 + ddATP-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 (µl)	Final conc.
Own preparation		Elongation Buffer <sup>1</sup> (X)	5	1	1
Life Technologies	On request	Miniseq Primer (µM) A or B	10	0.5	1
AP Biotech	27-2051 (61,71,81)-01	ddNTPs <sup>2</sup> (µM) 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> (µM) 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/ µl	0.125	0.4 U/ reaction
		H <sub>2</sub> O	Qsp 5 µl	3.125	
		digested PCR product		10	
		Total volume		15	

<sup>1</sup> The 5X 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> 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 functional SNP are labeled, either in Tamra, or in R110. For example, for SNP g1033a, the mixture of ddNTPs is composed of:

- 2.5 µM of ddATP non labeled,
- 2.5 µM of ddGTP non-labeled,
- 2.5 µM of ddTTP (1.875 µM of ddTTP non labeled and 0.625 µM of ddTTP Tamra labeled),
- 2.5 µM of ddCTP (1.875 µM of ddCTP non labeled and 0.625 µM of ddCTP 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

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

52

fluorescence reader of type Analyst® HT of LJL 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 (⊥) according to the following formula:

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

In this calculation, the value ⊥ 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 LJL 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

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

53

genotypes may be obtained.

The use of the Allele Caller® software permits, once the identification of the different groups is carried out, to directly extract the genotype defined for each individual in table form.

It is necessary to specify that for SNP g1033a, for example, the allele c read in antisense corresponds to the allele g read in sense, and is related to the presence of an aspartic acid (D) at position 95 of the immature IFN $\alpha$ -7 protein sequence and therefore that the allele t read in antisense corresponds to the allele a read in sense corresponding to an asparagine (N) for this position in the sequence of the corresponding protein.

Results of the minisequencing for the SNPs t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, g1181a and a1294c

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 t779c, 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 g1033a, 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.

For SNP g1135t, the genotype is in theory either homozygote GG, or heterozygote GT, 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 c1084a, 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 t1166c, 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 g1181a, the genotype is in theory either homozygote GG, or

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

54

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.

For SNP a1294c, the genotype is in theory either homozygote AA, or heterozygote AC, 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.

The results of the distribution of the determined genotypes in the population of individuals and the calculation of the different allelic frequencies for the 7 studied SNPs are presented in the following tables:

Phylogenic Population	Total	t778c (V10A)								
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	CC	%	Total
African American	50			50	100					50
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99			97	100					97
Mexican	10			9	100					9
Non-European Caucasoid	37	2,7	(0, 6.4)	35	94,6	2	5,4			37
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10			10	100					10
Southeast Asian	17			16	100					16
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>0,4</b>	<b>(0, 0.9)</b>	<b>262</b>	<b>99,2</b>	<b>2</b>	<b>0,76</b>			<b>264</b>

Phylogenic Population	Total	g1033a (D95N)								
		f	(95% CI)	GG	%	GA	%	AA	%	Total
African American	50	4,1	(0,2, 8,0)	45	91,8	4	8,18			49
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99			98	100					98
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			16	100					16
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>0,8</b>	<b>(0, 1.5)</b>	<b>261</b>	<b>98,5</b>	<b>4</b>	<b>1,51</b>			<b>265</b>

Phylogenic Population	Total	c1084a (L112I)								
		f	(95% CI)	CC	%	CA	%	AA	%	Total
African American	50	2,1	(0, 5.0)	45	95,7	2	4,26			47
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99			92	100					92
Mexican	10			6	100					6
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>0,4</b>	<b>(0, 0.9)</b>	<b>252</b>	<b>99,2</b>	<b>2</b>	<b>0,79</b>			<b>254</b>

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

55

Phylogenetic Population	Total	g1135t (V129L)						Total
		f	(95% CI)	GG	%	GT	%	
African American	50	2,0	(0, 4.8)	47	95,9	2	4,1	47
Amerind	15			15	100			15
Caribbean	10	10,0	(0, 23.1)	8	80,0	2	20,0	10
European Caucasoid	99			98	100			98
Mexican	10	5,6	(0, 16.1)	8	88,9	1	11,1	9
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>0,9</b>	<b>(0,1, 1,8)</b>	<b>260</b>	<b>98,1</b>	<b>5</b>	<b>1,9</b>	<b>263</b>

Phylogenetic Population	Total	t1166c (F139S)						Total
		f	(95% CI)	TT	%	TC	%	
African American	50			45	100			45
Amerind	15			15	100			15
Caribbean	10	5	(0, 14.6)	9	90,0	1	10,0	10
European Caucasoid	99	1,5	(0, 3.2)	96	97,0	3	3,0	99
Mexican	10			9	100			9
Non-European Caucasoid	37			37	100			37
Northeast Asian	20			20	100			20
South American	10			10	100			10
Southeast Asian	17	2,9	(0, 8.6)	16	94,1	1	5,9	17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>1</b>	<b>(0,1, 1,8)</b>	<b>257</b>	<b>98,1</b>	<b>5</b>	<b>1,9</b>	<b>262</b>

Phylogenetic Population	Total	g1181a (R144K)						Total
		f	(95% CI)	GG	%	GA	%	
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			10	100			10
Southeast Asian	17	2,9	(0, 8.6)	16	94,1	1	5,9	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>

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

56

Phylogenic Population	Total	f	(95% CI)	a1294c (K182Q)				Total
				AA	%	AC	%	
African American	50	2,0	(0, 4,7)	48	96,0	2	4,0	50
Amerind	15			15	100			15
Caribbean	10			10	100			10
European Caucasoid	99			99	100			99
Mexican	10			7	100			7
Non-European Caucasoid	37			37	100			37
Northeast Asian	20			20	100			20
South American	10			10	100			10
Southeast Asian	17			17	94,1			17
<b>Total</b>	<b>268</b>	<b>0,4</b>	<b>(0, 0,9)</b>	<b>265</b>	<b>99,3</b>	<b>2</b>	<b>0,7</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 %.

By examining these results by phylogenic population, and by SNP, it is observed that:

- for SNP t779c, the 2 heterozygote individuals TC come from the sub-population non-European Caucasoid.
- for SNP g1033a, the 4 heterozygote individuals GA come from the sub-population African American.
- for SNP c1084a, the 2 heterozygote individuals CA come from the sub-population African American.
- for SNP g1135t, the 5 heterozygote individuals GT come from the sub-populations African American, Caribbean, and Mexican.
- for SNP t1166c, the 5 heterozygote individuals TC come from the sub-populations Caribbean, European Caucasoid, and Southeast Asian.
- for SNP g1181a, the unique heterozygote individual GA comes from the sub-population Southeast Asian.
- for SNP a1294c, the 2 heterozygote individuals AC come from the sub-population African American.

Example 3. Expression of natural wild-type IFN $\alpha$ -7 and mutated IFN $\alpha$ -7 proteins in yeast

a) Cloning of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 and mutated IFN $\alpha$ -7 in the eukaryote expression vector pPicZ $\alpha$ -topo

The nucleotide sequences coding for the mature part of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7, D72N mutated IFN $\alpha$ -7, V106L mutated IFN $\alpha$ -7, or K159Q mutated IFN $\alpha$ -7 are amplified by PCR using as template genomic DNA from an individual who is heterozygote for one of said SNPs.

The PCR primers permitting such an amplification are:

SEQ ID NO. 19: Sense primer: TGTGATCTGCCTCAGACCCAC

SEQ ID NO. 20: Antisense primer: TCAATCCTTCCTCCTTAATCCTTTTT

The PCR products are inserted in the eukaryote expression vector pPicZ $\alpha$ -TOPO under the control of the hybrid promoter AOX1 inducible by methanol (TOPO<sup>TM</sup>-cloning; Invitrogen Corp.).

This vector permits the heterologous expression of eukaryote proteins in the yeast *Pichia pastoris*.

After checking of the nucleotide sequence of the region of the vector coding for the recombinant proteins, the vector is linearized by the PmeI restriction enzyme, and the *P. pastoris* yeast strain (Invitrogen) is transformed with these recombinant expression vectors.

b) Heterologous expression in *P. pastoris* and purification of the natural wild-type IFN $\alpha$ -7 and mutated IFN $\alpha$ -7 proteins

Two saturated pre-cultures of 50 mL of BMGY medium (2% Peptone, 1% yeast extract, 1.34% YNB, 1% Glycerol, 100 mM potassium phosphate, 0.4 mg/Liter biotin pH 6.0) containing a clone coding for natural wild-type IFN $\alpha$ -7, or that coding for D72N mutated IFN $\alpha$ -7, V106L mutated IFN $\alpha$ -7, or K159Q mutated IFN $\alpha$ -7, were carried out for 24-48 hours at 30°C at an agitation of 200 rotations per minute (rpm).

When the culture reaches a saturating cellular density (corresponding to an optical density of 12 measured at a wavelength of 600 nm), it is used to inoculate, at 5

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

58

OD/mL, 250 mL of BMMY medium (2% Peptone, 1% yeast extract, 1.34% YNB, 0.5% Methanol, 100 mM potassium phosphate, 0.4 mg/Liter biotin pH 6.0).

The expression of the protein is then induced by methanol at a final concentration of 1%, for 24 hours at 30 °C, with an agitation of the culture flask at 180 rpm.

Due to the presence of the signal peptide sequence of the "alpha factor", upstream of the coding sequence, the proteins are secreted by the yeasts in the culture medium. The alpha factor is naturally cleaved during the processing.

The suspension is centrifuged and the protein is purified by HPLC starting from the obtained supernatant.

In a pre-started step, an ultrafiltration (Labscale, cut-off 5000Da, Millipore) followed by a dialysis permits a ten times concentration of the yeast supernatant in a buffer of 50 mM Tris-Cl pH 9.0, 25 mM NaCl.

The first chromatographic step permits protein recovery by affinity on a blue sepharose column (Amersham Pharmacia). The presence of the protein in the collected fractions is verified, on the one hand by electrophoresis of SDS PAGE type and on the other hand by immuno-detection by a specific antibody directed against the IFN $\alpha$ -7 protein. At this step, the purity of the protein of interest is higher than 75%.

In a second purification step, a gel filtration permits buffer exchange of the collected fractions corresponding to IFN $\alpha$ -7 proteins against 50 mM Tris pH 9.0, 25 mM NaCl.

The last step of the purification consists of a separation of the proteins on an ion exchange chromatography column. The fractions containing the recombinant protein are injected on an anion exchange column (ResourceQ 6.0 mL, Pharmacia) equilibrated beforehand in Tris 50 mM pH 9, NaCl 25 mM buffer. The elution of the proteins is carried out by the migration of a gradient between 0,025 and 1 M NaCl in the Tris 50 mM pH 9 buffer. Alternatively, the purification may be performed using blue cibacron.

The purity of the protein of interest is estimated on SDS/PAGE gel and the protein concentrations are measured by densitometry (Quantity one, Biorad) and BCA assay (bicinchoninic acid and copper sulfate, Sigma).

Purified natural wild-type IFN $\alpha$ -7, D72N mutated IFN $\alpha$ -7, V106L mutated IFN $\alpha$ -7, or K159Q mutated IFN $\alpha$ -7 proteins obtained according to this protocol, eventually scaled-up to produce higher amount of proteins, are used for the functional tests described below.

Example 4. Evaluation of the capacity of wild-type and D72N mutated IFN $\alpha$ -7 to activate signal transduction

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 use of a human cell line stably transfected with the luciferase reporter gene under the control of an interferon responsive chimeric promoter provides the basis for this *in vitro* assay. Thus, the luciferase activity detected reflects the ability of the IFNs to induce a signal at the nuclear level.

Using this reporter gene assay, the dose-response curves exhibited by D72N mutated IFN $\alpha$ -7, wild-type IFN $\alpha$ -7, and wild-type IFN $\alpha$ -2 are analyzed and the results are expressed in terms of international units referring to Intron A (commercial product corresponding to interferon alpha 2b) activity per mg of IFN $\alpha$  protein.

This assay gives the following results:

- 581 IU/mg for the D72N mutated IFN $\alpha$ -7
- 489 IU/mg for the wild-type IFN $\alpha$ -7
- 698 IU/mg for the wild-type IFN $\alpha$ -2

These results indicate that the capacity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 to activate signal transduction is sensibly similar to that of wild-type IFN $\alpha$ -7 and to that of wild-type IFN $\alpha$ -2.

Example 5. Evaluation of immunomodulatory activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7

IFNs type I (IFN alpha and IFN beta) are able to modulate certain functions of the immune system. They have been demonstrated to increase the dendritic cells (DC) maturation: increase in the expression of MHC class I (HLA-ABC) and II (HLA-DR) molecules, increase in the expression of the molecules involved in the co-stimulation of the T-lymphocytes, CD80, CD86 and CD83 molecules and increase in the stimulating function of T-lymphocytes.

a) Effect of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 on dendritic cell maturation.

Immunomodulatory activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 was first investigated on dendritic cells maturation and compared to that of wild-type IFN $\alpha$ -2 chosen as a representative of commercial Intron A product.

To do so, dendritic cells were first generated from adult peripheral blood monocytes cultivated in the presence of GM-CSF and IL-4 cytokines. After purification using a CD14+ cells purification kit, these dendritic cells were placed in presence of 100 ng/mL of D72N mutated IFN $\alpha$ -7, or wild-type IFN $\alpha$ -2, and their phenotype was determined by FACS analysis aiming at looking for the expression of the MHC class I and II molecules and the CD40, CD80, CD86, CD83 and CD1a markers. The maturation state of these dendritic cells has also been compared to that obtained without IFN $\alpha$  treatment to provide a control with non-stimulated dendritic cells and to that obtained with 1  $\mu$ g/ml LPS or 2.5 ng/ml TNF $\alpha$ , which are known to induce dendritic cell maturation.

The median value of the measures of fluorescence intensity for each marker and for the five experimental conditions, expressed as arbitrary unit, are presented in the following table:

	HLA ABC	HLA DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD1a
No IFN $\alpha$	64	133	24	25	14	15	26
LPS	188	325	567	151	67	17	126
TNF $\alpha$	72	209	355	49	9	13	181
D72N IFN $\alpha$ -7	62	172	200	40	16	7	153
Wild-type IFN $\alpha$ -2	87	281	331	76	45	15	155

The results of this test demonstrate that D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein possesses a weak capacity to stimulate dendritic cell maturation. In particular, in comparison to wild-type IFN $\alpha$ -2, the D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein shows an immunosuppressive activity.

b) Effect of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 on cytokine release by T-lymphocytes

Immunomodulatory activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 was also investigated by measuring cytokine release by T lymphocytes placed in presence of the mutated IFN $\alpha$ -7 protein and with or without a strong antigen (SEB) in order to mimic an immune response against an aggression. This test was also performed in presence of wild-type IFN $\alpha$ -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

To do so, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors and stimulated for 16 hours in an appropriate medium containing anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or SEB. In each culture was added 4  $\mu$ g/mL of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 or wild-type IFN $\alpha$ -2. After stimulation, T lymphocytes were extracellularly labelled with anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD69 antibodies or anti-CD3, anti-CD8 and anti-CD69 antibodies, and intracellularly labelled with specific antibodies directed against Th1-type cytokines (IFN-gamma) or Th2-type cytokines (IL-10). Fluorescent cells were analysed using FACScalibur and CellQuest software.

The results obtained indicate that D72N mutated IFN $\alpha$ -7 and wild-type IFN $\alpha$ -2

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

62

do not stimulate IL-10 and IFN-gamma release and, thus, do not activate T lymphocytes in absence of SEB. In contrast, D72N mutated IFN $\alpha$ -7 and wild-type IFN $\alpha$ -2 proteins stimulate cytokines (IL-10 and IFN-gamma) release by SEB-activated T-lymphocytes as shown in the table below. This table represents the cytokine release by T-lymphocytes in presence of SEB, expressed as percentage of the CD4+ CD69+ cells or CD8+ CD69+ cells for the CD4+ T-lymphocytes and CD8+ T-lymphocytes, respectively, and the percentage of CD69+ cells on total cells.

T-lymphocytes		IFN gamma	IL-10	CD69+ cells/total
CD4+ CD69+	No IFN $\alpha$	11.9	7.5	1.26
	D72N IFN $\alpha$ -7	38.54	24.16	2.37
	Wild-type IFN $\alpha$ -2	19.6	24.68	2.7
CD8+ CD69+	No IFN $\alpha$	8.73	0.65	4.69
	D72N IFN $\alpha$ -7	35.91	6.06	7.97
	Wild-type IFN $\alpha$ -2	16.37	4.26	10.02

These results clearly demonstrate that D72N mutated IFN $\alpha$ -7 has a high capacity to stimulate cytokine release (IFN gamma and IL-10) by CD4+ T-lymphocytes and CD8+ T-lymphocytes previously activated by SEB antigen. In particular, the interferon gamma production by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes is higher in presence of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 than in presence of wild-type IFN $\alpha$ -2.

c) Effect of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 on cytokine release by monocytes

Finally, immunomodulatory activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 was investigated by measuring cytokine release by monocytes in absence or in presence of a bacterial toxic agent (LPS). This test was also performed in presence of wild-type IFN $\alpha$ -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

To do so, human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors and their phenotype was analyzed to determine the relative amount of CD64+ CD4dim cells (CD64 and CD4dim are markers for blood monocytes). After

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

63

an over-night culture, these PBMC were incubated in the culture medium alone (not stimulated cells) or in presence of LPS (stimulated cells). In each culture, 4 µg/mL of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 or wild-type IFN $\alpha$ -2 was added. After culture, cells were extracellularly labelled with anti-CD64 and anti-CD4dim, and intracellularly labelled with specific antibodies directed against Th1-type cytokines (TNF-alpha), IL-12 and IL-10.

Fluorescent cells were analyzed using FACScalibur and CellQuest software.

The results obtained indicate that D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein and wild-type IFN $\alpha$ -2 do not stimulate cytokines (IL-10, IL-12 and TNF-alpha) release in absence of LPS.

In contrast, in presence of LPS, monocytes release cytokines (IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$ ), this release being additionally increased in presence of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein or wild-type IFN $\alpha$ -2 as shown in the table below. This table represents cytokine release by monocytes in presence of LPS, expressed as percentage of the CD64+ CD4dim cells, and the percentage of CD4dim CD64+ cells on total cells.

	IL-10	IL-12	TNF- $\alpha$	CD4dim CD64+ cells/total
No IFN $\alpha$	16.21	8.52	13.88	3.1
D72N IFN $\alpha$ -7	57.4	27.31	54.92	3.43
Wild-type IFN $\alpha$ -2	49.34	34.48	50.87	2.71

These results demonstrate that, in presence of LPS, D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein is able to stimulate cytokine release by monocytes. In particular, stimulation of IL-10 and TNF- $\alpha$  release by monocytes is higher in presence of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 than in presence of wild-type IFN $\alpha$ -2.

Example 6. Evaluation of *in vitro* antiproliferative activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7

a) on the human lymphoblasts of Daudi Burkitt's cell line

These tests are carried out on four different types of IFN $\alpha$ -7, namely: wild-type IFN $\alpha$ -7, D72N mutated IFN $\alpha$ -7, V106L mutated IFN $\alpha$ -7, and K159Q mutated IFN $\alpha$ -7.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

64

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 IFN $\alpha$ -7, D72N mutated IFN $\alpha$ -7, V106L mutated IFN $\alpha$ -7, or K159Q mutated IFN $\alpha$ -7, ranging from 0.003 pM to 600 nM.

The Daudi cells are then incubated for 66 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> after which the Uptibloc reagent (Uptima) is added to the cultures. The rate of cell proliferation is quantified by measuring the fluorescence emitted at 590nm (excitation 560nm) after an additional period of incubation of 4 hours.

The antiproliferative activity of the mutated IFN $\alpha$ -7 proteins or wild-type IFN $\alpha$ -7 is based on the measurements of the IC50 corresponding to the concentration of IFN $\alpha$ -7 inhibiting 50% of the cell growth.

At least 3 experiments, repeated 3 times were carried out for both proteins and for each concentration.

The average IC50 values measured for each of the tested IFN $\alpha$ -7 proteins appear in the tables below, as well as the average ratio corresponding to the IC50 value measured with the mutant protein over the IC50 value measured with the wild-type protein.

Results obtained with proteins purified by ion exchange chromatography:

	IC50 (pM)	mutant/ wild-type ratio (standard deviation)
Wild-type IFN $\alpha$ -7	4.90	-
V106L mutated IFN $\alpha$ -7	3.46	0.70 (0.37)
K159Q mutated IFN $\alpha$ -7	2.30	0.40 (0.20)

Results obtained with proteins purified using blue cibacron:

	IC50 (pM)	wild-type/mutant ratio (standard deviation)
Wild-type IFN $\alpha$ -7	2.40	-
D72N mutated IFN $\alpha$ -7	1.10	0.47 (0.17)

This test demonstrates that the three mutated IFN $\alpha$ -7 proteins inhibit Daudi cells proliferation. Moreover, the cellular antiproliferative activity is slightly increased in the case of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 and K159Q mutated IFN $\alpha$ -7 proteins by comparison with wild-type IFN $\alpha$ -7.

b) on the TF-1 erythroleukemia cell line

The effect of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 was also evaluated on TF-1 erythroleukemia cell line. This test was also performed in presence of wild-type IFN $\alpha$ -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

To do so, TF-1 cells were placed in contact of increasing concentrations of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 or wild-type IFN $\alpha$ -2 (0.001 to 1000 ng/mL) and the cell proliferation measured.

This experiment was repeated three times, and the results of one representative experiment are presented in Figure 5.

These data indicate that D72N mutated IFN $\alpha$ -7 has a weak antiproliferative effect on TF-1 cells. In particular, the antiproliferative effect of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 on TF-1 erythroleukemia cells is similar to that of wild-type IFN $\alpha$ -2.

#### Example 7. Evaluation of the antiviral activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7

The IFNs play an important role in the antiviral defence. The IFN antiviral activity is partly due to IFNs induced enzymatic systems, such as:

- The 2'5' oligoadenylate synthetase, an enzyme which catalyzes the adenosine oligomere synthesis. These oligomeres activate the RNase L, an endoribonuclease which destroy the viral RNA once activated.
- The Mx proteins (GTPases) which inhibit the synthesis and/or the maturation of viral transcripts. This activity is mainly exerted on the influenza virus.
- The PKR protein (or p68 kinase) which is activated by the double-stranded RNA. The activated PKR inhibits protein synthesis.

The IFNs antiviral activity is also induced by other mechanisms such as, in the case of retroviruses, the inhibition of viral particles entry into the cells, the replication, the binding, the exit of the particles and the infective power of viral particles.

Finally, the IFNs exert an indirect antiviral activity by modulating certain functions of the immune system, in particular by favoring the response to cellular mediation (including an increase of the MHC class I and II molecules, increase of IL-12 and IFN-gamma production, increase of the CTL activities, among others).

The antiviral activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 has been evaluated both *in vitro* in cell culture and *in vivo* in mouse model. Both tests have been carried out in parallel with wild-type IFN $\alpha$ -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

a) Antiviral activity *in vitro* in cell culture

This assay permits evaluation of the antiviral activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 in cell culture using the vesicular stomatitis virus (VSV), and comparison with that of wild-type IFN $\alpha$ -2.

To do so, WISH human epithelial cells were cultivated for 24 hours in the presence of decreasing concentrations of D72N mutated IFN $\alpha$ -7, or wild-type IFN $\alpha$ -2. Then, the cells were infected by the virus of vesicular stomatitis (VSV) during 24 to 48 additional hours and cell lysis was measured.

The antiviral activity of the different IFN $\alpha$  tested is determined by comparing the specific activity (IU/ $\mu$ g) corresponding to the amount of IFN $\alpha$ -7 that inhibits 50% of cell lysis induced by the VSV. The unit IU/ $\mu$ g stands for international units referring to Intron A activity per  $\mu$ g of IFN $\alpha$  protein.

A similar experiment has been carried out three times, and the values of specific activity measured in one representative experiment are the following:

- for D72N mutated IFN $\alpha$ -7 : 53 IU/ $\mu$ g
- for wild-type IFN $\alpha$ -2 : 330 IU/ $\mu$ g

The results of this experimentation indicate that D72N mutated IFN $\alpha$ -7 protein possesses a weak antiviral activity *in vitro* in cell culture. In particular, in cell culture

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

67

infected with VSV, the D72N mutated IFN $\alpha$ -7 has a lower antiviral activity than the wild-type IFN $\alpha$ -2.

b) Antiviral activity *in vivo* in mouse model

This test *in vivo* is performed in EMCV (Encephalomyocarditis virus) mouse model.

Human IFNs exhibit dose-dependent antiviral activity in the mouse which is in general 100 to 1,000 fold less than that exhibited by the same amount of mouse IFN (Meister et al. (1986). *J. Gen. Virol.* 67, 1633-1644).

Intraperitoneal injection of mice with Encephalomyocarditis virus (EMCV) gives rise to a rapidly progressive fatal disease characterized by central nervous system involvement and encephalitis (Finter NB (1973). *Front Biol.* 2: 295-360). Mouse and human interferon-alpha have both been shown to be effective in protecting mice against lethal EMCV infection (Tovey and Maury (1999). *J. IFN Cytokine Res.* 19: 145-155).

Groups of 20 six-week old Swiss mice were infected intraperitoneally with 100 x LD<sub>50</sub> EMCV and treated one hour later, and then once daily for 3 days thereafter with 2  $\mu$ g of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 or wild-type IFN $\alpha$ -2 preparations. A control group was performed with animals having been treated with excipient only. The animals were followed daily for survival for 21 days.

Results are presented in Figure 6 and indicate that the relative survival rate of the mice which have been treated with D72N mutated IFN $\alpha$ -7 is much higher than the survival rate of the non-treated mice, demonstrating the antiviral activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 *in vivo* in mouse model. Moreover, after 14 days, 45% of the mice treated with D72N mutated IFN $\alpha$ -7 are alive, while 30% of the mice treated with wild-type IFN $\alpha$ -2 are alive. Thus, the antiviral activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 *in vivo* in mouse model is higher than that observed for the mice which have been treated with wild-type IFN $\alpha$ -2.

Example 8. Evaluation of the anti-tumoral activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells

IFN $\alpha$  have been shown to be as effective in protecting mice against the growth

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

68

of a clone of Friend leukemia cells resistant to the direct anti-proliferative activity of IFN $\alpha$ , as against IFN sensitive parental Friend leukemia cells (Belardelli *et al.*, Int. J. Cancer, 30, 813-820, 1982; Belardelli *et al.*, Int. J. Cancer, 30, 821-825, 1982), reflecting the importance of indirect immune mediated mechanisms in the anti-tumoral activity of IFN $\alpha$ .

The following experimentation permits evaluation of the anti-tumoral activity of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 in mice previously inoculated with Friend erythroleukemia cells, and comparison with that of wild-type IFN $\alpha$ -2 chosen as a representative of commercial Intron A product.

To do so, groups of 12 six-week old DBA/2 mice were inoculated intraperitoneally with 100,000 IFN resistant Friend leukemia cells (3C18) (20,000 LD<sub>50</sub>) and treated one hour later and then once daily for 21 days thereafter with 2.0  $\mu$ g of the wild-type IFN $\alpha$ -2 or with 2.0  $\mu$ g of D72N mutated IFN $\alpha$ -7 or an equivalent volume of excipient alone. The animals were then followed daily for survival and the primary efficacy analysis was the relative survival of each treatment group in comparison to its excipient only group.

The results of this experiment, presented in Figure 7, indicate that, compared to mice which have not been treated with IFN $\alpha$ , treatment of mice with D72N mutated IFN $\alpha$ -7 results in an increase in the number of mice surviving after inoculation with highly malignant Friend erythroleukemia cells (FLC). After 45 days, 34% of the mice treated with D72N mutated IFN $\alpha$ -7 are alive, while 50% of the mice treated with wild-type IFN $\alpha$ -2 are alive. Thus, the survival rate of FLC inoculated mice is slightly lower after treatment with D72N mutated IFN $\alpha$ -7 than after treatment with wild-type IFN $\alpha$ -2.

All of these results demonstrate that D72N mutated IFN $\alpha$ -7 possesses unique biological properties.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

69

## CLAIMS

1. An isolated polynucleotide comprising:
  - a) all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, provided that such nucleotide sequence, or part of sequence, comprises at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g; or
  - b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).
2. The isolated polynucleotide of claim 1, comprising nucleotides 751 to 1320 of SEQ ID NO. 1, provided that the sequence contains at least one coding SNP selected from the group consisting of t779c, g1033a, c1084a, g1135t, t1166c, and g1181a.
3. The isolated polynucleotide of claim 1, wherein said polynucleotide is composed of at least 10 nucleotides.
4. An isolated polynucleotide that codes for a polypeptide comprising all or part of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K.
5. An isolated polynucleotide that codes for a polypeptide comprising all or part of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having the coding SNP D95N.
6. A method for identifying or amplifying all or part of a polynucleotide having 80 to 100% identity with nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 comprising hybridizing, under appropriate hybridization conditions, said polynucleotide with the polynucleotide of claim 1.
7. A method for genotyping all or part of a polynucleotide having 80 to 100% identity with nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 comprising the steps of amplifying a region of interest in the genomic DNA of a subject or a population of subjects, and determining the allele of at least one position in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 chosen from the group consisting of 559, 580, 667, 682, 779, 1033, 1084, 1125, 1135, 1161, 1166, 1181, and 1212.
8. The method of claim 7, wherein the genotyping is carried out by minisequencing.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

70

9. A recombinant vector comprising a polynucleotide according to claim 1.
10. A host cell comprising a recombinant vector according to claim 9.
11. A method for separating a polypeptide, comprising cultivating a host cell according to claim 10 in a culture medium and separating said polypeptide from the culture medium.
12. The polypeptide encoded by the isolated polynucleotide of claim 1.
13. An isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K.
14. The polypeptide according to claim 12, comprising amino acids 24 through 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K.
15. The polypeptide according to claim 12, comprising amino acids 24 through 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having the coding SNP D95N.
16. A method for obtaining an immunospecific antibody, comprising immunizing an animal with the polypeptide according to claim 12, and collecting said antibody from said animal.
17. The immunospecific antibody resulting from the method of claim 16.
18. A method for identifying an agent among one or more compounds to be tested which activates or inhibits the activity of an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K, said method comprising:
  - a) providing host cells comprising the recombinant vector according to claim 9;
  - b) contacting said host cells with said compounds to be tested,
  - c) determining the activating or inhibiting effect upon the activity of said polypeptide whereby said activating or inhibiting agent is identified.
19. A method for identifying an agent among one or more compounds to be tested

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

71

whose activity is potentiated or inhibited by an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K, said method comprising:

- a) providing host cells comprising the recombinant vector according to claim 9;
- b) contacting said host cells with said compounds to be tested,
- c) determining the potentiating or inhibiting effect upon the activity of said agent whereby said potentiated or inhibited agent is identified.

20. A method for analyzing the biological characteristics of a subject, comprising performing at least one of the following steps:

- a) Determining the presence or the absence of the polynucleotide according to claim 1 in the genome of a subject;
- b) Determining the level of expression of the polynucleotide according to claim 1 in a subject;
- c) Determining the presence or the absence of the polypeptide according to claim 12 in a subject;
- d) Determining the concentration of the polypeptide according to claim 12 in a subject; or
- e) Determining the functionality of the polypeptide according to claim 12 in a subject.

21. A therapeutic agent comprising one or more compounds selected from the group consisting of an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 provided that such nucleotide sequence, or part of sequence, comprises at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K; an antibody specific for said polypeptide.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

72

22. A method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group consisting of cancers and tumors, infectious diseases, immunologically and auto-immunologically related diseases, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the agent of claim 21, plus a pharmaceutically acceptable excipient.
23. The method of claim 22, wherein said cancers and tumors comprise metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic 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.
24. The method of claim 22, wherein said metabolic diseases comprise non-immune associated diseases such as obesity.
25. The method of claim 22, wherein said infectious diseases comprise viral infections including chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.
26. The method of claim 22, wherein said diseases of the central nervous system comprise Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.
27. The method of claim 22, wherein said immunologically and auto-immunologically related diseases comprise the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.
28. A method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group consisting of healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and/or osteoporosis, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the agent of claim 21, plus a pharmaceutically acceptable excipient.
29. A method for increasing or decreasing the activity in a subject of the polypeptide according to claim 12 comprising administering a therapeutically effective quantity

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

73

of one or more of: an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 provided that such nucleotide sequence, or part of sequence, comprises at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector, wherein said host cell may be obtained from said subject to be treated; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K; an antibody specific for said polypeptide; and a pharmaceutically acceptable excipient.

30. A method for preventing or treating in an individual a disorder or a disease linked to the presence in the genome of said individual of the polynucleotide of claim 1, comprising administering a therapeutically effective amount of one or more of: an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 and having at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K; an antibody specific for said polypeptide; and a pharmaceutically acceptable excipient.
31. A method for determining statistically relevant associations between at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g, in the IFN $\gamma$ -7 gene, and a disease or resistance to disease comprising:
- Genotyping a group of individuals;
  - Determining the distribution of said disease or resistance to disease within said group of individuals;
  - Comparing the genotype data with the distribution of said disease or resistance

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

74

- to disease; and
- d) Analyzing said comparison for statistically relevant associations.
32. A method for diagnosing or determining a prognosis of a disease or a resistance to a disease comprising detecting at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g, in the IFN $\gamma$ -7 gene.
33. A method for identifying a compound among one or more compounds to be tested having a biological activity substantially similar to the activity of D95N mutated IFN $\gamma$ -7 gene product, said method comprising the steps of:
- Determining the biological activity of said compound, such as signal transduction, dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, *in vitro* or *in vivo* antiviral activity, anti-tumoral activity in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line;
  - Comparing the activity determined in step a) of said compound with the activity of the D95N mutated IFN $\gamma$ -7 gene product.
  - Determining, on the basis of the comparison carried out in step b), whether said compound has a substantially similar, or lower, or higher, activity compared to that of the D95N mutated IFN $\gamma$ -7 gene product.
34. The method according to claim 33, wherein said compounds to be tested are identified from synthetic peptide combinatorial libraries, high-throughput screening, or designed by computer-aided drug design to have the same three-dimensional structure as that of the polypeptide of SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, provided that said amino acid sequences comprise the D95N SNP.
35. The compound identified by the method of claim 33.
36. A method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group consisting of cancers and tumors, infectious diseases, immunologically and auto-

- immunologically related diseases, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the compound of claim 35, plus a pharmaceutically acceptable excipient.
37. The method of claim 36, wherein said cancers and tumors comprise metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic 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.
38. The method of claim 36, wherein said infectious diseases comprise viral infections including chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.
39. The method of claim 36, wherein said immunologically and auto-immunologically related diseases comprise the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.
40. The method of claim 36, wherein said diseases of the central nervous system comprise Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.
41. The method of claim 36, wherein said metabolic diseases comprise non-immune associated diseases such as obesity.
42. A method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group consisting of healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and/or osteoporosis, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the compound of claim 35, plus a pharmaceutically acceptable excipient.
43. A diagnostic kit comprising one or more of: an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 and having at least one SNP selected from the group consisting of a559c, g580a, c667t, c682t, t779c, g1033a, c1084a, g1125a, g1135t, g1161a, t1166c, g1181a, and a1212g, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

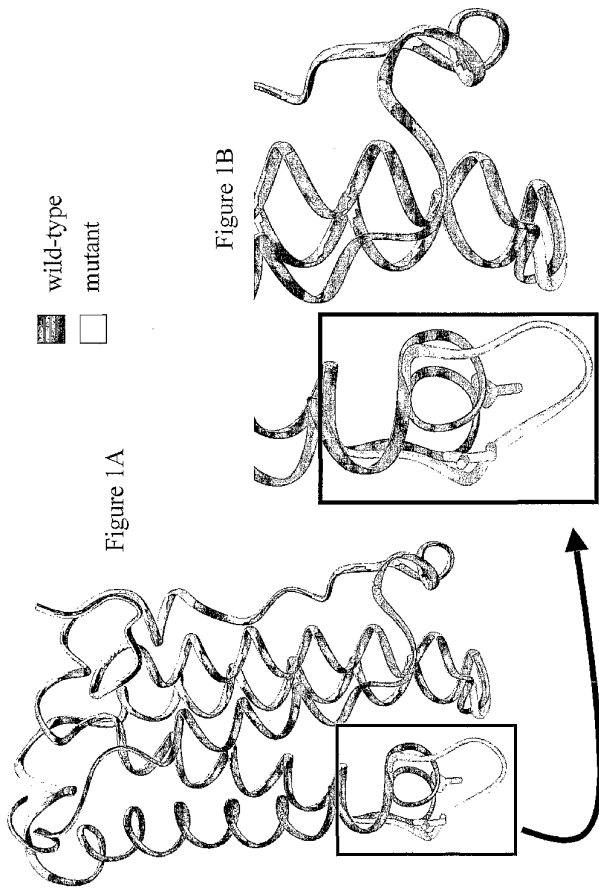
76

comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of V10A, D95N, L112I, V129L, F139S, and R144K; an antibody specific for said polypeptide.

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

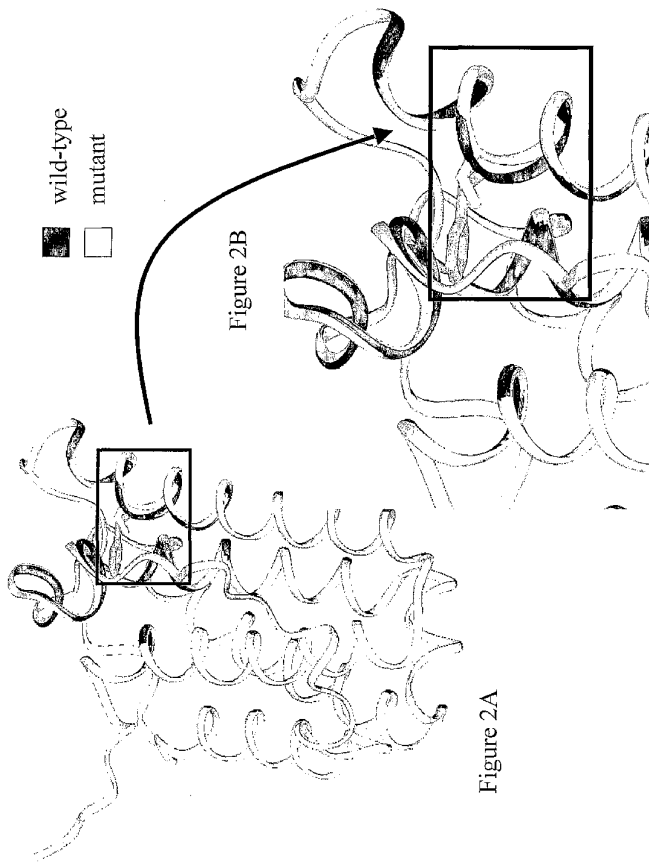
1/7



WO 02/101048

PCT/EP02/07456

2/7



WO 02/101048

PCT/EP02/07456

3/7

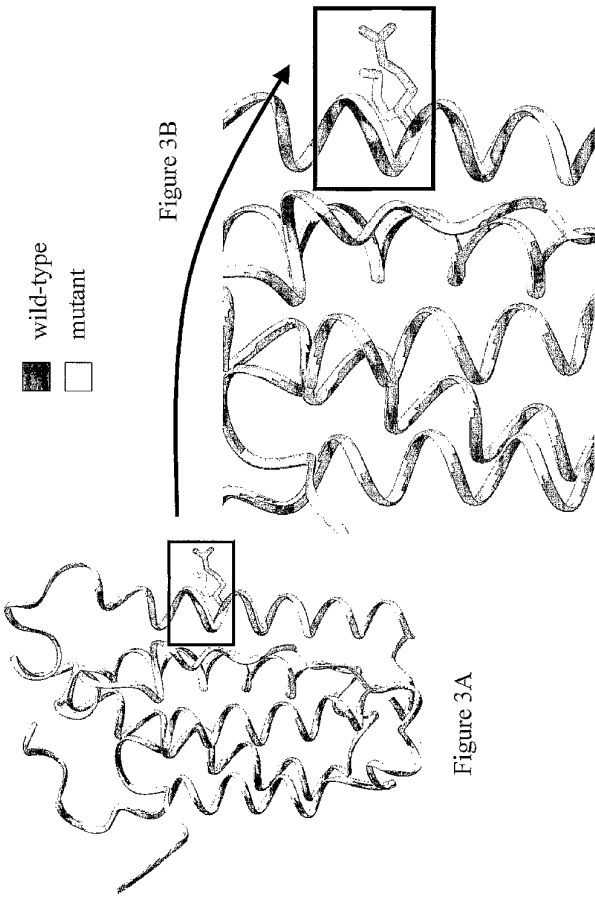


Figure 3A

Figure 3B

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

4/7

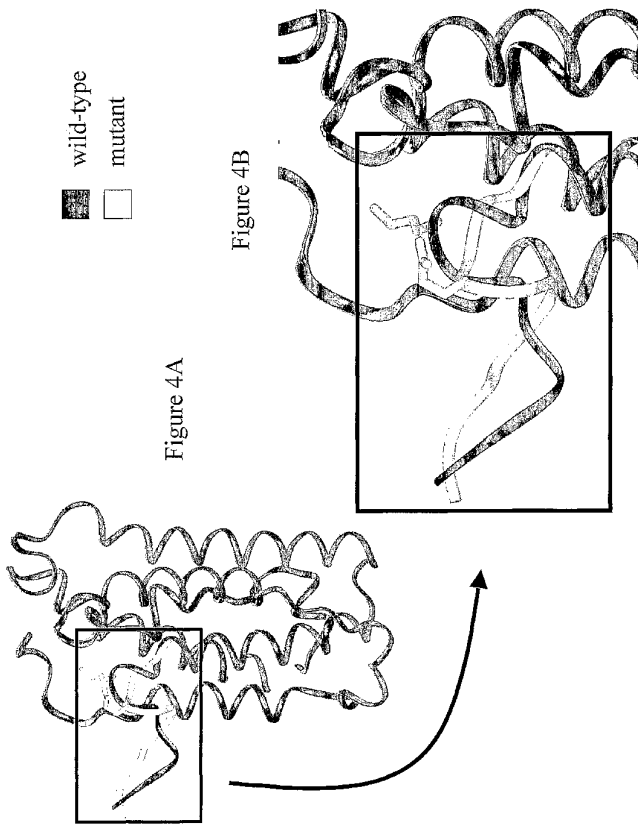


Figure 4A

Figure 4B

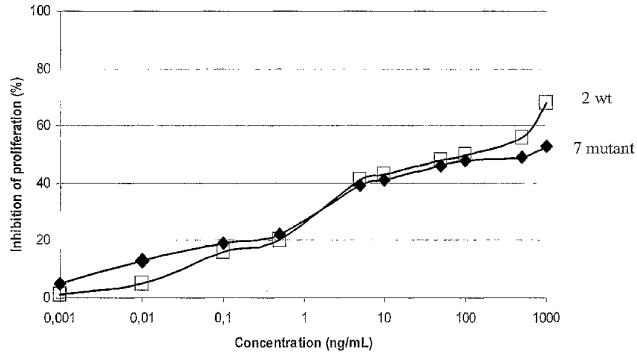
wild-type  
mutant

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

5/7

Figure 5

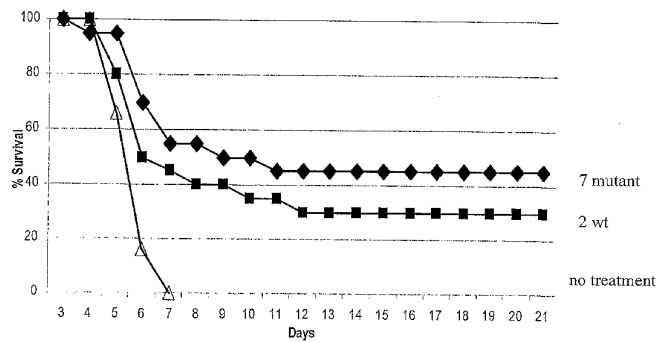


WO 02/101048

PCT/EP02/07456

6/7

Figure 6

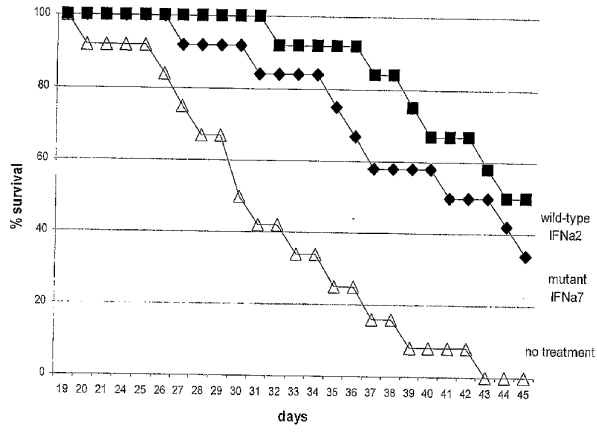


WO 02/101048

PCT/EP02/07456

7/7

Figure 7



WO 02/101048

PCT/EP02/07456

1

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; GENODYSSEE

&lt;120&gt; New polynucleotides and polypeptides of the IFN alpha 7 gene.

&lt;130&gt; BIF 023010 EXT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR 01 07588

&lt;151&gt; 2001-06-11

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1983

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

cacatcagta cttatgtcaa gtgctgaaaa gaaaaaagtg ttggcaatat ctggatgaat 60
actgcagcta ggaagttta caaattatit tctcatataa agcaaaatlc aaagctcoat 120
atactatgag aaaatttttt taaaattgat tcatatttct agcagttttg aatgattagg 180
tatgtaatta cttcatattt aatgtgtatt atacagattt ttatttttga tatgtaattt 240
gaaacaacaa aatttacatg aacaaattac attaaaagtt abccacaasa tatacttato 300
taallaaact tagattttta tagottttaa acttagattt tagtttaact ttctgtcoat 360
tcttaactta ctttgaataa aaagagcaaa ctctcaactt ttatctgtg aagtagaggt 420
atagttagaa taccctaata gatagccaa atctgtgtta ttasaaltrc atgaacattt 480
caattagaaa aaataccat aaaaggcttt gagtgcaggg gaaaaacagg caatgatgaa 540
aaaaaaatg aaaaactgat tcaaacacat gtagagagtg cataaagaaa gcaaaaaacg 600
agatagaag taaaactagc gcatttagaa atggaaatt agtatgtca ctatttaaga 660
cctatgcaca gagcaaatg tccagaaaac ctgagagcca cggttcaagt taaccaactc 720
aggtagocca gtgataattg caaaatccca atggcccggc cttttctttt actgatggtc 780
fgtgggtac tcagotacaa atccatctgc tctctgggt gtgatotgc tcagaccac 840
agcctgcgta ataggagggc ctgtatctc ctggcacaat tgggaagaa ctctctttt 900
tctgtgtga agcacagaca tgaattcaga tccacagagg aggagttga tggccaaccg 960
ttccagaaga ctcaagccat ctctgtctct catagatga tccagagac ctccaatctc 1020
ttcagcacag aggaactcct tctgtcttgg gaacagagcc tctagaaaa attttccact 1080
gaactttacc agcaactgaa tgaactgtga ccatgtgtga tacagaggt tggggtggaa 1140
gagactcccc tgatgaatga ggaactcctc ctgggtgtga ggaataact ccaagaaatc 1200
atcttttctc taatggagaa gaatacagc cctgtgctc gggaggttgc cagagcagaa 1260
atcatgagat cttctctctt ttcaacaac ttgaaaaaag gattaaggag gaaggattga 1320
aaactgttcc atcatgaaa tgattctcat tgaactatgc atcatctcc actttctatg 1380
gttcttccat ttcaagact cactctata acaaccaaaa gttgaatcaa aatttccaaa 1440
tgttttcagg agtgttaaga agcactgtgt ttactgtgc aggcactagt cttttcaga 1500
tgaccattct gatgtctcct ttcactatt tatttaata ttattttatt taactatttt 1560
tattatttaa atttttttt atgtaatac atattgaact ttacattgt gttaatgtaa 1620
caaatatgtt cttcatattt agccaatata ttaatttct ttttcaata atttttacta 1680
tcaaaaattt ctgtgttttg tttattttt aagattaast gcaagcctg actgtataac 1740
ctgacttaaa aatagatgat ttaagtaagt taactatcat aattttattc aagttataga 1800
aaaaatattt ttctatacc aggttatctg ttgcttctat gatataaacg tgaacataaa 1860
aaatacagtt ctgtttctct tgtatcttg atttttttca ggaagaaat ctaaaaacaa 1920
taataatgct gaattaatat cgtttatact aactgtgtga atgtgaggaa gtaaaaaaaa 1983
atg

```

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

2

<210> 2  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 2  
 Met Ala Arg Ser Phe Ser Leu Leu Met Val Val Leu Val Leu Ser Tyr  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Ile Cys Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu  
 20 25 30  
 Arg Asn Arg Arg Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser  
 35 40 45  
 Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Glu Phe Arg Phe Pro Glu Glu  
 50 55 60  
 Glu Phe Asp Gly His Gln Phe Gln Lys Thr Gln Ala Ile Ser Val Leu  
 65 70 75 80  
 His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Glu Asp Ser  
 85 90 95  
 Ser Ala Ala Trp Glu Gln Ser Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu  
 100 105 110  
 Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly  
 115 120 125  
 Val Glu Glu Thr Pro Leu Met Asn Glu Asp Phe Ile Leu Ala Val Arg  
 130 135 140  
 Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Met Glu Lys Lys Tyr Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser  
 165 170 175  
 Phe Ser Thr Asn Leu Lys Lys Gly Leu Arg Arg Lys Asp  
 180 185

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 taccacaactc aggtagcc

18

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

3

<400> 4  
catgaaagtg tgagatgatg c 21

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
gtccttttct ttaotgatgg 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
tgtagctgag taccagcacg 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
tcaatctctt cagcacagag 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
ttccaagca gcagatgagt 20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
tagaaaaatt ttccactgaa 20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 10  
gtcattcagt tgctggtaaa 20

<210> 11

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

4

<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
gtgtgatata ggaggttggg 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
catcagggga gtctcttcca 20

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
tcccotgatg aatgaggact 20

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
atttcctcac agccaggatg 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
ggaattcctc ctggctgtga 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
tgattctttg gaagtatttc 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 17

WO 02/101048

PCT/EP02/07456

5

```
tctctttttc aacaaacttg 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 18
cttcctcctt aatccttttt 20
<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 19
tgtgatctgc ctcagaccca c 21
<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 20
teaatccttc ctccttaata cttttt 26
```

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/101048 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, G01N 33/68, C12N 15/85, 15/63, C07K 14/56, 16/00, 16/24, A61K 38/21, A61P 9/00, 31/12, 35/00, 37/00
- (21) International Application Number: PCT/EP02/07456
- (22) International Filing Date: 11 June 2002 (11.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01/07588 11 June 2001 (11.06.2001) FR
- (71) Applicant (for all designated States except US): GEN-ODYSSEE [FR/FR], Parc d'Affaires Technopolis, 3, avenue du Canada, Bat Alpha, B.P. 810 Ullis, 1-91974 Courtabouff (FR).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): ESCARY, Jean-Louis [FR/FR], 4, rue Mosouris, F-78150 Le Chesnay (FR).
- (74) Agent: SANTARELLI, 14, avenue de la Grande Armée, BP 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 14 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/101048 A3

(54) Title: NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN $\alpha$ -7 GENE(57) Abstract: The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide sequence of the IFN $\alpha$ -7 gene comprising new SNPs, and new polypeptides derived from the wild-type IFN $\alpha$ -7 protein comprising at least one mutation caused by at least one SNP of the invention as well as their therapeutic uses.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/07456
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12Q1/68 G01N33/68 C12N15/85 C12N15/63 C07K14/56 C07K16/00 C07K16/24 A61K38/21 A61P9/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C12N C07K G01N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 25438 A (MAXYGEN INC ;CHEN TEDDY (US); HEINRICH VOLKER (US); PATTEN PHILLI) 12 April 2001 (2001-04-12)	1, 3, 6, 7, 9-12, 16, 17, 20-23, 25, 27-30
Y	* see especially SEQ ID NOS: 19, 22, 24 (nucleotide 393) * abstract; claims 1, 20-26, 31, 41, 42, 60, 64, 66-80, 104-123 --- -/-	8, 24, 26, 31, 32, 43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex		
<b>* Special categories of cited documents:</b> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 May 2003		Date of mailing of the international search report 13/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 600 nl, Fax: (+31-70) 340-3311		Authorised officer Knehr, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 02/07456

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUSSAIN M ET AL.: "Identification of interferon- $\alpha$ 7, - $\alpha$ 14 and - $\alpha$ 21 variants in the genome of a large human population" JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, vol. 16, 1996, pages 853-859, XP008015634 abstract	1-7, 12-14,20
Y	* see especially Fig.1 * page 853, column 2, paragraph 1; figures 1,3; table 2	8
X	ULLRICH A ET AL.: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A PORTION OF HUMAN CHROMOSOME 9 CONTAINING A LEUKOCYTE INTERFERON GENE CLUSTER" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 156, no. 3, 15 April 1982 (1982-04-15), pages 467-486, XP000605299 ISSN: 0022-2836 abstract page 468, paragraph 2 * see especially Fig.2, nucleotide 2090 * page 483, line 6 - line 14; figures 2,10,11	1,3,4, 6-10, 12-14,20
X	US 4 801 685 A (PESTKA SIDNEY ET AL) 31 January 1989 (1989-01-31)	1-5, 9-15,20
Y	* see especially Figure 9 * abstract; claims 1-5; figures 3,4,9	6-8, 21-23, 25, 29-32,43
X	COHEN S ET AL.: "CLONING, EXPRESSION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF A NEW VARIANT OF HUMAN INTERFERON ALPHA IDENTIFIED IN VIRUS INDUCED LYMPHOBLASTOID CELLS" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, BASEL, CH, vol. 60, 1985, pages 111-122, XP002062570 * see especially Fig.1, line 1, amino acid residue num.10 * the whole document	1-4, 9-14,20
Y		6-8,22, 25
X	WEBER H ET AL.: "Single amino acid changes that render human IFN- $\alpha$ 2 biologically active on mouse cells" THE EMBO JOURNAL, vol. 6, no. 3, 1987, pages 591-598, XP002242107 cited in the application * see especially Fig.'s 1 and 3, as well as table 2 * the whole document	13,14,19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internet Application No  
PCT/EP 02/07456

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SYVANEN A-CH ET AL.: "IDENTIFICATION OF INDIVIDUALS BY ANALYSIS OF BIALLELIC DNA MARKERS USING PCR AND SOLID-PHASE MINI SEQUENCING" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, US, vol. 52, no. 1, 1993, pages 46-59, XP002050638 ISSN: 0002-9297 the whole document	7, 8, 31, 32
Y	WO 00 39280 A (VIRAGEN INC) 6 July 2000 (2000-07-06) abstract; claim 20	22-27, 31
Y	JANSEN R L H ET AL.: "Interleukin-2 and interferon-alpha in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 12, 1992, pages 70-73, XP001148923 the whole document	21-23, 29-32
Y	MITA E ET AL.: "Predicting interferon therapy efficacy from hepatitis C virus genotype and RNA titer" DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, vol. 39, no. 5, 1995, pages 977-982, XP008016510 the whole document	21, 22, 25, 29, 32
Y	YAMADA R ET AL.: "IDENTIFICATION OF 142 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN 41 CANDIDATE GENES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS IN THE JAPANESE POPULATION" HUMAN GENETICS, BERLIN, DE, vol. 106, 2000, pages 293-297, XP002947356 the whole document	22, 27
P, A	FINK T ET AL.: "Biological characterization of three novel variants of IFN-alpha13 produced by human placental trophoblast" PLACENTA, vol. 22, September 2001 (2001-09), pages 673-680, XP001058217 the whole document	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP 02/07456
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Although claims 22-30 are directed to a therapeutic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the gene's expression products as related to the underlying polymorphisms.
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	33-42
	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02/07456

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/JSA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 33-42

Present claims 33-42 relate to methods as well as compounds resulting from such methods, defined by reference to a desirable characteristic or property, namely in possessing a biological activity being substantially similar to the activity of the D95N-mutated IFN $\alpha$ -7 gene product (claims 33 and 35), and further, in using compounds having the same three-dimensional structure as (parts of) the D95N-mutated polypeptide of SEQ ID NO:2 (claim 34), such methods and compounds being used for preventing or treating diseases (claims 36-42).

Without comprising clear essential technical features allowing the person skilled in the art to understand what exactly is meant with '...substantially similar to the activity of the D95N-mutated IFN $\alpha$ -7 gene product...' or '...having the same three-dimensional structure...', it is without saying that such terms could be interpreted in any possible way. Thus, they are not fulfilling the requirements of giving a clear teaching about the content and the scope of these claims, and especially, how to execute the teaching of these claims successfully. In fact, these claims cover all possible methods and deriving compounds having these characteristics or properties without giving any clue in form of technical features how to do so, in contrast to the requirements of Article 6 PCT (need for support) and/or Article 5 PCT (need for disclosure). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT) since an attempt is made to define the methods and deriving compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, by lacking any technical feature making these claims clear, supported and disclosed, no search has been carried out for claims 33-42.

In addition, a limited search has been executed for claims 1-32 and 43 since it is not clear how and to what extent '...or part of the sequence...' or '...or part of the polypeptide...' should be interpreted and be limited. From the description and the examples given, it appears that what is meant, is a mutated form of the IFN $\alpha$ -7 gene and its encoded gene product, provided they comprise at least one of the polymorphisms as claimed. However, present claims 1-32 and 43, comprising the wording '...or part of...' relate to an extremely large number of possible gene or polypeptide fragments. In fact, the claims contain so many possible permutations that a lack of clarity and/or conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the whole scope of these claims impossible. Consequently, the search has been limited and carried out to those parts of these claims which do appear to be clear and/or concise and/or supported, namely a mutated IFN $\alpha$ -7 gene and its encoded gene product, comprising at least one of the polymorphisms as claimed, as well as methods of genotyping and screening relying on such a mutated gene.

International Application No. PCT/EP 02 07456

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/07456

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0125438 A	12-04-2001	AU 8001300 A	10-05-2001
		CA 2385045 A1	12-04-2001
		EP 1238082 A2	11-09-2002
		JP 2003511031 T	25-03-2003
		WO 0125438 A2	12-04-2001
US 4801685 A	31-01-1989	EP 0072541 A2	23-02-1983
		JP 58041849 A	11-03-1983
		US 4810645 A	07-03-1989
WO 0039280 A	06-07-2000	US 6350589 B1	26-02-2002
		US 6433144 B1	13-08-2002
		EP 1140144 A2	10-10-2001
		WO 0039280 A2	06-07-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) July 1992

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76		4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 39/395	D	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04		4 C 0 8 7
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04		
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06		
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00		
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02		
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10		
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16		
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/24		
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00		
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04		
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18		
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/20		
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02		
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00		
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06		
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08		
C 0 7 K 14/56	C 0 7 K 14/56		
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19		
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02		
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566		
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A	
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/66	F	
	C 1 2 P 21/08		

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

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 エスカリー, ジャン - ルイ

フランス国, エフ - 7 8 1 5 0 ル シェスネイ, リュ モクスーリ, 4

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37  
DA77 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 BA23 BA57 CA01 GA11 HA12  
4B063 QA12 QA18 QQ43 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QR55 QR77 QS24  
QS33 QS34 QX01  
4B064 AG09 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA93Y AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 BA02 BA44 DA21 NA14 ZA022 ZA122 ZA162 ZA362  
ZA552 ZA592 ZA662 ZA682 ZA702 ZA892 ZA962 ZA972 ZB072 ZB082  
ZB132 ZB152 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352 ZC212 ZC552  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 CC02 CC05 DD22 DD23  
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA12  
ZA16 ZA36 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA70 ZA89 ZA96 ZA97  
ZB07 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZC21 ZC55  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 BC11 BC30 BC34 BC61 BC71 BC83  
CA12 NA14 ZA02 ZA12 ZA16 ZA36 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68  
ZA70 ZA89 ZA96 ZA97 ZB07 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27  
ZB33 ZB35 ZC21 ZC55  
4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA16 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	IFN $\alpha$ -7基因的新多核苷酸和多肽		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005500029A</a>	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003503798	申请日	2002-06-11
申请(专利权)人(译)	Jen'odise		
[标]发明人	エスカリージャンルイ		
发明人	エスカリー,ジャン-ルイ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/74 A61K35/76 A61K36/06 A61K38/00 A61K38/21 A61K39/395 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/56 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/21 C12P21/02 C12P21/04 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 A61K35/72		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/56 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N33/6866 G01N2500/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/72 A61K35/74.Z A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/06 A61P17/02 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/18 A61P31/20 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/56 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/66.F C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA23 4B024/BA57 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG09 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/BA02 4C084/BA44 4C084/DA21 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA122 4C084/ZA162 4C084/ZA362 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA702 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC212 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA12 4C086/ZA16 4C086/ZA36 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA70 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZC21 4C086/ZC55 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB63 4C087/BC11 4C087/BC30 4C087/BC34 4C087/BC61 4C087/BC71 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA12 4C087/ZA16 4C087/ZA36 4C087/ZA55 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA70 4C087/ZA89 4C087/ZA96 4C087/ZA97 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZC21 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA16 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬		

渡边洋一  
西山雅也

優先権 2001007588 2001-06-11 FR

其他公开文献 JP2005500029A5

外部链接 [Espacenet](http://Espacenet)

摘要(译)

本发明涉及衍生自包含新SNP的IFN $\alpha$ -7基因的核苷酸序列的新多核苷酸，和衍生自野生型IFN $\alpha$ -7蛋白的新多肽，其包含至少一个由本发明的至少一个SNP引起的突变，如以及它们的治疗用途。

(P2005-5000)  
(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(5) Int. Cl. 7	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 35/12</b>	A 6 1 K 35/12	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 35/72</b>	A 6 1 K 35/72	4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 35/74</b>	A 6 1 K 35/74 Z	4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 157 頁) 最終頁に	

(21) 出願番号	特願2003-503798 (P2003-503798)	(71) 出願人	502073278 ジェンオアイセ
(22) 出願日	平成14年6月11日 (2002.6.11)		フランス国, 9 1 9 7 4 クールタブ
(23) 翻訳文提出日	平成15年12月11日 (2003.12.11)		, レ ユリ, ベ. ベ. 8 1 0, バ ア
(24) 国際出願番号	PCT/EP2002/007456		ア, アブニユ ゼユ カナダ 3, パ
(25) 国際公開番号	W02002/101048		ダフェーレ テクノポリ
(26) 国際公開日	平成14年12月19日 (2002.12.19)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	01/07588	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成13年6月11日 (2001.6.11)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一