

(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2004-535196

(P2004-535196A)

(43) 公表日 平成16年11月25日(2004.11.25)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/56	A 6 1 K 35/56	4 B O 6 3
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-507279 (P2003-507279)	(71) 出願人	502073278 ジェンオディセ
(86) (22) 出願日	平成14年5月2日 (2002.5.2)		フランス国, 9 1 9 7 4 クールタプーフ
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月4日 (2003.11.4)		, レ ユリ, ペ. ペ. 8 1 0, バ アルフ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/005458		ア, アブニュ デュ カナダ 3, パルク
(87) 国際公開番号	W02003/000896		ダフェーレ テクノポリ
(87) 国際公開日	平成15年1月3日 (2003.1.3)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	01/05919		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成13年5月3日 (2001.5.3)	(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 α - 5 遺伝子の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 SNP を含んで成る TFN - 5 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、及び本発明の 1 つ以上の SNP により生じた 1 つ以上の突然変異を含んで成る、天然野生型 IFN - 5 に由来する新規ポリペプチド並びにそれらの医療上の使用に関連する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離されたポリヌクレオチドであって：

a) ヌクレオチド配列(配列番号 1)、ここにかかるヌクレオチド配列は、c4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c、及びg1 0 0 9 aからなる群から選択されたSNPを1つ以上含んで成るという条件であり；又は

b) a)のヌクレオチド配列に対して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。

【請求項 2】

a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 cからなる群から選択されたコーディングSNPを1つ以上含むという条件の配列番号 1 の 4 3 4 ~ 1 0 0 3 番目のヌクレオチドを含んで成る、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドが 1 0 以上のヌクレオチドからなる、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(配列番号 2)の全部又は一部を含んで成り、そしてQ2 8 R、Q7 0 E及びC1 2 2 Sから成る群から選択されたコーディングSNPを1つ以上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(配列番号 2)の全部又は一部を含んで成り、そしてコーディングSNP C1 2 2 S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(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もしくは一部を同定もしくは増幅する方法であって、適切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と請求項 1 に記載のポリヌクレオチドとを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(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もしくは一部をジェノタイピングする方法であって、対象者もしくは対象者集団のゲノムDNA中の注目の領域を増幅し、そしてヌクレオチド配列(配列番号 1)中での4 2、4 3、8 2、1 2 3、1 5 2、1 7 4、2 9 2、5 1 6、6 4 1、7 9 8 及び1 0 0 9 から成る群から選択された1つ以上の位置で対立遺伝子を特定する段階を含んで成る方法。

【請求項 8】

前記ジェノタイピングが、ミニシーケンシングにより行われている請求項 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成る組換えベクター。

【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】

請求項 10 に記載の宿主細胞を培養培地中で培養し、そして当該培養培地から前記ポリペプチドを分離することを含んで成る、ポリペプチドを分離する方法。

【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たポリペプチド。

【請求項 13】

アミノ酸配列(配列番号 2)の全部又は一部を含んで成り、そしてQ2 8 R、Q7 0 E、及びC1 2 2 Sから成る群から選択されたコーディングSNPを1つ以上有する、単離されたポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

アミノ酸配列（配列番号 2）の 24～189 番目のアミノ酸を含んで成り、そして Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

アミノ酸配列（配列番号 2）の 24～189 番目のアミノ酸を含んで成り、そしてコーディング SNP C122S 有する、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

免疫特異的抗体を獲得する方法であって、請求項 12 に記載のポリペプチドで動物を免疫し、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 17】

請求項 16 に記載の方法によりもたらされる免疫特異的抗体。

【請求項 18】

アミノ酸配列（配列番号 2）の全部もしくは一部を含んで成り、そして Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチドの活性を活性化もしくは阻害する因子を、試験される 1 もしくは複数の化合物の中から同定する方法であって、当該方法は：

- 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) 前記宿主細胞と前記試験される化合物とを接触させ；
- c) 前記ポリペプチドの活性にもたらす活性化もしくは阻害効果を測定することによって前記活性化もしくは阻害因子を同定する、

20

ことを含んで成る方法。

【請求項 19】

アミノ酸配列（配列番号 2）の全部もしくは一部を含んで成り、そして Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチドによって活性が増強もしくは阻害される因子を、試験される 1 もしくは複数の化合物の中から同定する方法であって、前記方法は：

- 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) 前記宿主細胞と前記試験される化合物とを接触させ；
- c) 前記因子の活性にもたらす増強もしくは阻害効果を測定することによって前記増強もしくは阻害された因子を同定する、

30

ことを含んで成る方法。

【請求項 20】

対象者の生物学的性質を分析する方法であって、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存在又は不在を特定すること；
- 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のレベルを測定すること；
- c) 対象者における請求項 12 に記載のポリペプチドの存在又は不在を特定すること；
- d) 対象者における請求項 12 に記載のポリペプチドの濃度を測定すること；
- e) 対象者における請求項 12 に記載のポリペプチドの機能を特定すること、

40

を 1 つ以上行うことを含んで成る方法。

【請求項 21】

c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c、及び g1009a からなる群から選択された SNP を 1 つ以上含んで成るという条件のヌクレオチド配列（配列番号 1）の全部もしくは一部、又は前記ヌクレオチド配列に対して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；

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；

Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上含んで成るという条件のアミノ酸配列（配列番号 2）の全部又は一部を含んで成る単離された

50

ポリペプチド；

前記ポリペプチドに対して特異的な抗体；

からなる群から選択された１もしくは複数の化合物を含んで成る治療剤。

【請求項 2 2】

個体における、ガン及び腫瘍、感染症、免疫及び自己免疫疾患に関連した疾患、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患からなる群から選択された疾患、並びに化学的治療に関連した障害を予防又は治療するための方法であって、前記個体に対して治療上有効な量の請求項 2 1 に記載の治療剤に、医薬的に許容できる賦形剤を加えて投与することを含んで成る方法。

【請求項 2 3】

前記ガン及び腫瘍が、転移性腎ガン、黒色腫、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、頸部、頭部及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、及びAIDSの場合のカポジ肉腫を含んで成る免疫欠損症に続いて現われる腫瘍を含んで成る請求項 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

前記代謝性疾患が免疫とは無関係の疾患、例えば、肥満症を含んで成る、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記感染症がウィルス感染症、例えば、慢性B型及びC型肝炎及びHIV/AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅などの性病を含んで成る、請求項 2 2 に記載の方法。

20

【請求項 2 6】

前記中枢神経系の疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病を含んで成る、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患が、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、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 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

個体における、傷の治療、透析された患者の貧血症、及びノ又は骨粗鬆症から成る群から選択された疾患を予防又は治療する方法であって、前記個体に対して治療上有効な量の請求項 2 1 に記載の治療剤に、医薬的に許容できる賦形剤を加えて投与することを含んで成る方法。

30

【請求項 2 9】

請求項 1 2 に記載のポリペプチドの対象者における活性を高める又は下げる方法であって、治療上有効な量の１又は複数の：

c 4 2 t、g 4 3 a、c 8 2 t、a 1 2 3 t、g 1 5 2 c、t 1 7 4 c、g 2 9 2 c、a 5 1 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 c、及びg 1 0 0 9 aからなる群から選択されたSNPを１つ以上含んで成るという条件のヌクレオチド配列（配列番号 1）の全部もしくは一部、又は前記ヌクレオチド配列に対して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；

40

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、ここで前記宿主細胞は治療される対象者から獲得されて良く；

Q 2 8 R、Q 7 0 E、及びC 1 2 2 Sから成る群から選択されたコーディングSNPを１つ以上含んで成るという条件のアミノ酸配列（配列番号 2）の全部又は一部を含んで成る単離されたポリペプチド；

前記ポリペプチドに対して特異的な抗体；及び

医薬的に許容できる賦形剤、

を投与することを含んで成る方法。

【請求項 3 0】

50

個体において、当該個体のゲノム中に請求項 1 に記載のポリヌクレオチドが存在することに関連した障害もしくは疾患を予防もしくは治療するための方法であって、治療上有効な量の 1 又は複数の：

c4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c、及びg1 0 0 9 aからなる群から選択されたSNPを 1 つ以上含んで成るという条件のヌクレオチド配列（配列番号 1）の全部もしくは一部、又は前記ヌクレオチド配列に対して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；
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；

Q2 8 R、Q7 0 E、及びC1 2 2 Sから成る群から選択されたコーディングSNPを 1 つ以上含んで成るという条件のアミノ酸配列（配列番号 2）の全部又は一部を含んで成る単離されたポリペプチド；

前記ポリペプチドに対して特異的な抗体；及び

医薬的に許容できる賦形剤、

を投与することを含んで成る方法。

10

【請求項 3 1】

IFN - 5 遺伝子におけるc4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c、及びg1 0 0 9 aからなる群から選択された 1 つ以上のSNPと疾患又は疾患に対する耐性との直接的な関連性を統計学的に特定する方法であって：

20

- a) 個体の群をジェノタイピングをし；
 - b) 前記疾患又は疾患に対する耐性の分布を前記個体の群中で特定し；
 - c) 遺伝子型データと前記疾患又は疾患に対する耐性の分布とを比較し；そして
 - d) 前記統計的な直接の関連性についての比較を分析する、
- ことを含んで成る方法。

【請求項 3 2】

疾患もしくは疾患に対する耐性を診断する又は予後診断を促す方法であって、IFN - 5 遺伝子において、c4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c、及びg1 0 0 9 aからなる群から選択される 1 つ以上のSNPを検出することを含んで成る方法。

30

【請求項 3 3】

試験される 1 又は複数の化合物の中から、C1 2 2 S突然変異IFN - 5 遺伝子産物の活性に実質上類似する生物活性を有する化合物を同定する方法であって、当該方法は：

- a) 前記化合物の生物活性、例えば、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、CD4⁺もしくは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もしくはin vivo抗ウイルス活性、悪性Friend赤白血病を予め接種されたマウスにおける抗腫瘍活性、Daudi Burkitt細胞系統に対する細胞抗増殖活性、TF-1細胞系統に対する細胞抗増殖活性を測定し；
 - b) 前記化合物の段階a)で測定した活性と、C1 2 2 S突然変異IFN - 5 遺伝子産物の活性とを比較し；
 - c) 段階b)で行われた比較に基づき、前記化合物が、C1 2 2 S突然変異IFN - 5 遺伝子産物の活性と比較して、実質上類似している、又はより低いもしくはより高い活性を有するかどうかを特定する、
- 段階を含んで成る方法。

40

【請求項 3 4】

前記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、ハイスループットスクリーニングから同定される、又は配列番号 2 のポリペプチド、もしくはC1 2 2 S SNPを含んで成るという条件を有するアミノ酸配列（配列番号 2）の位置 2 4 ~ 1 8 9 に含まれたアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列と同じ 3 次構造を有するようにコンピューターによる薬物設計によって設計される、請求項 3 3 に記載の方法。

50

【請求項 35】

請求項 33 に記載の方法によって同定された化合物。

【請求項 36】

個体における、ガン及び腫瘍、感染症、免疫及び自己免疫に関連した疾患、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患からなる群から選択された疾患、並びに化学的治療に関連した障害を予防又は治療する方法であって、前記個体に対して治療上有効な量の請求項 35 に記載の化合物に、医薬的に許容できる賦形剤を加えて投与することを含んで成る方法。

【請求項 37】

前記ガン及び腫瘍が、転移性腎ガン、黒色腫、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、頸部、頭部及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍及びAIDSの場合のカポジ肉腫を含んで成る免疫欠損症に続いて現われる腫瘍を含んで成る、請求項 36 に記載の方法。

10

【請求項 38】

前記感染症が、ウィルス感染症、例えば、慢性B型及びC型肝炎及びHIV/AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅などの性病を含んで成る、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患が、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、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 36 に記載の方法。

20

【請求項 40】

前記中枢神経系の疾患が、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病を含んで成る、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

前記代謝性疾患が、免疫とは無関係の疾患、例えば、肥満症を含んで成る、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

個体における、傷の治癒、透析された患者の貧血症、及び/又は骨粗鬆症から成る群から選択された疾患を予防又は治療する方法であって、前記個体に対して治療上有効な量の請求項 35 に記載の化合物に、医薬的に許容できる賦形剤を加えて投与することを含んで成る方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願：

本発明は、2001年5月3日に提出された、仏国特許出願第0105919号の名称「Nouveaux polynucleotide et polypeptide de l'IFN alpha5」の優先権を主張する。

【0002】

技術背景

技術分野

40

本発明は、新規SNPを含んで成る、IFN - 5 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により生じた突然変異を含んで成る、天然野生型IFN - 5 タンパク質に由来する新規ポリペプチド、並びにそれらの医療上の使用に関連する。

【0003】

関連技術

インターフェロン 5 遺伝子（本明細書中ではIFN - 5 に言及される）はHenocoらの刊行物「Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes」J.Mol.Biol.; 185 (2); pp. 227 ~ 260; (1985) に記載されている。

【0004】

この遺伝子のヌクレオチド配列は、アクセス番号X02956の下でGenBankデータベース

50

においてアクセス可能である。

【0005】

IFN は、それらの細胞抗増殖性効果、並びにそれらが抗ウィルス反応及び抗寄生虫性反応に関わることが知られている。

【0006】

INF は、いくつか他のサイトカインの発現を造血幹細胞のレベルで阻害し、並びに所定の腫瘍の細胞増殖を阻害することも知られている。

【0007】

IFN は、腎ガンにおいてEGFに対するレセプターの発現を減らすこと、所定のミトコンドリア遺伝子の発現を阻害すること、繊維芽細胞、単球及びBリンパ球の増殖を、特に *in vitro* で阻害すること、並びにBリンパ球による抗体の合成を遮断することも知られている。

【0008】

IFN は、腫瘍特異的抗原の発現を腫瘍細胞表層上で誘導すること、及びISREの特異的転写因子に作用することによってISRE型（インターフェロン刺激応答エレメント）のプロモーター領域の調節下にある遺伝子を誘導することも知られている。

【0009】

IFN は、様々な障害及び／又はヒトの疾患、例えば、様々なガン、ガン腫、黒色腫、リンパ腫、白血病並びに肝臓、頸部、頭部及び腎臓のガンなど、心疾患、代謝性疾患、例えば、免疫系に関係しないもので肥満など、感染症、例えばB型及C型の肝炎及びAIDS、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、統合性失調症及び鬱病など、組織又は器官移植の拒絶、傷の治癒、透析患者の貧血、アレルギー、喘息、多発性硬化症、骨粗鬆症、乾癬、関節リウマチ、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による治療に関連した疾患にさえも関わっていることが知られている。

【0010】

IFN は、特に、所定の白血病、転移性腎ガン並びに免疫不全に続いて現われる、腫瘍、例えば、AIDSの場合のカポジ肉腫の治療をするために用いられている。IFN は、他の種類の腫瘍に対して及び所定のウィルス感染症に対しても有効である。

【0011】

IFN はまた、FDA(Food and Drug administration)によって、陰部疣贅又は性病の治療をするための承認もなされている。

【0012】

しかし、IFN 、詳細にはIFN - 5 は、それが医薬組成物中で用いられた場合に多くの副作用も持つ。それは例えば、急性過敏症の反応(蕁麻疹、気管支収縮、アナフィラキシーショックなど)、心臓不整脈(cardiac arrhythmia)、低血圧症、癲癇性発作、甲状腺機能の問題、インフルエンザ様の症候群(発熱、発汗、筋肉痛)などである。

【0013】

更に、IFN で治療された患者は、これらの分子を中和する抗体を生産し、それ故にそれらの効果が低下する。

【0014】

本発明者は、天然の野生型IFN - 5 タンパク質とは異なる機能を有することが可能な新規ポリペプチド及びIFN - 5 遺伝子に対する新規ポリヌクレオチドの類似体をこの度発見した。

【0015】

これら新規のポリペプチド及びポリヌクレオチドは特に、先に説明された障害もしくは疾患を治療もしくは予防するのに用いられて良く、そしてそれらに関連する不利な点の全て又は一部が回避されうる。

【発明の開示】

【0016】

発明の概要

本発明はその第1の対象として、1又は複数のSNP(一塩基多型)を含んで成るので参照野

生型 IFN - 5 遺伝子のヌクレオチド配列とは異なる新規ポリヌクレオチドを有する。

【0017】

ヒト参照野生型 INF - 5 遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)は、1475ヌクレオチドからなり且つ570ヌクレオチドのコーディング配列(ヌクレオチド434番(開始コドン)~ヌクレオチド1003番(停止コドン))を含んで成る。

【0018】

出願人は、参照野生型 INF - 6 遺伝子のヌクレオチド配列において11個のSNPを同定した。これら11個のSNPは以下の:c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c、及びg1009aである。

【0019】

本発明の背景において、予め規定された、SNPの位置決めに対応するナンバリングは、ヌクレオチド配列(配列番号1)のナンバリングに関連していると解される。

【0020】

文字a、t、c、及びgは、それぞれ窒素含有塩基のアデニン、チミン、シトシン、及びグアニンに対応する。

【0021】

最初の文字は野生型のヌクレオチドに対応し、他方、最後の文字は突然変異したヌクレオチドに対応する。

【0022】

従って、例えば、SNP c42tは、参照野生型 IFN - 5 遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)上の位置42において、ヌクレオチドシトシン(c)のヌクレオチドチミン(t)への突然変異に対応する。

【0023】

これらのSNPは、出願人によって、「Process for the determination of one or several functional polymorphism(s) in the nucleotide sequence of a preselected functional candidate gene and its applications」という名称の、2000年12月6日に提出された出願人の仏国特許出願第0022894号(本明細書中で参考文献として引用されている)に記載された決定方法を用いて同定された。

【0024】

この特許出願に記載されたこのような方法により、1つ(又は複数の)の既存のSNP(s)を同定することが、複数の個体のランダムな集団に由来する1以上の個体において可能になる。

【0025】

本発明の範囲内で、例えば、コーディング配列を含んで成る IFN - 5 遺伝子のヌクレオチド配列の断片が、ランダム態様で選択された個体の集団における様々な個体から単離された。

【0026】

次いで、これらの断片の配列決定が、ヘテロ2本鎖プロファイル(即ち参照野生型 INF - 5 遺伝子配列のものとは異なるプロファイルである)を有するこれら所定の試料に対して、DHPLC(「変性高性能液体クロマトグラフィー」)による分析後に行われた。

【0027】

その後、このようにして配列決定された断片は、参照野生型 IFN - 5 遺伝子の断片のヌクレオチド配列及び本発明により同定されたSNPと比較された。

【0028】

従って、前記SNPは天然であり、そしてそれらの各々が世界集団の所定の個体中に存在している。

【0029】

参照野生型 INF - 5 遺伝子は、189個のアミノ酸の、アミノ酸配列番号2に対応する、未熟なタンパク質をコードし、それは最初の23個のアミノ酸を含むシグナルペプチドの解裂によって、166個のアミノ酸の成熟タンパク質に転換されるだろう。

10

20

30

40

50

【0030】

本発明の各コーディングSNP、即ち、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 cは、IFN - 5 遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列のレベルでの変更を生ずる。

【0031】

アミノ酸配列におけるこれらの変更は以下のとおりである。

【0032】

SNP a5 1 6 gは、アミノ酸配列番号2に対応する、IFN - 5 遺伝子の未熟タンパク質中の位置28及び成熟タンパク質の位置5において、アミノ酸グルタミン(Q)のアルギニン(R)への突然変異を起こす。本発明の記載において、当業者は、このSNPによってコードされた突然変異を、成熟タンパク質もしくは未熟タンパク質のいずれを参照するかにより、当業者はQ5 RもしくはQ28 Rと呼ぶだろう。

10

【0033】

SNP c6 4 1 gは、アミノ酸配列番号2に対応する、IFN - 5 遺伝子の未熟タンパク質中の位置70、及び成熟タンパク質の位置47において、アミノ酸グルタミン(Q)のグルタミン酸(E)への突然変異を起こす。本発明の記載において、当業者は、このSNPによってコードされた突然変異を、成熟タンパク質もしくは未熟タンパク質のいずれを参照するかにより、当業者はQ47 EもしくはQ70 Eと呼ぶだろう。

【0034】

SNP g7 9 8 cは、アミノ酸配列番号2に対応する、IFN - 5 遺伝子の未熟タンパク質中の位置122及び、成熟タンパク質の位置99において、アミノ酸システイン(C)のセリン(S)への突然変異を起こす。本発明の記載において、当業者は、このSNPによってコードされた突然変異を、成熟タンパク質もしくは未熟タンパク質のいずれを参照するかにより、当業者はC99 SもしくはC122 Sのと呼ぶだろう。

20

【0035】

SNP: a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 cは、本発明に従って、野生型参照IFN - 5 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された場合、ポリペプチドの空間的な配置の変更を起こす。

【0036】

これらの変更は、当業界で周知の方法により、例えば、de novo(SEQFOLD/MSIなど)、相同性(MODELER/MSIなど)、力場の最小化(DISCOVER、DELPHI/MSIなど)及び/又は分子動力学(CFF/MSIなど)のモデリングツール使用する、コンピューター分子モデリングによって確認されて良い。

30

【0037】

かかるモデルの例は、本明細書中、後の実施例の節に示されている。

【0038】

コンピューター分子モデリングにより示されることは、成熟した突然変異タンパク質上での突然変異Q5 Rにより、INF - 5 タンパク質のN末端部分の構造における局所的な変化(それは、この部分の3次元構造を維持するCys1残基のジスルフィド架橋によってアテニエーションされている)が生じていることである。

40

【0039】

しかし、Aヘリックスの前のINF のN末端ドメインは非常に良く保存されていることに注目することが重要である。更に、Shaffermanら(Journal of Biological Chemistry (1987) 262:pp. 6227~6237において)及び(Journal of Immunology (200) 167:pp. 1482~1489において)によりタンパク質のこの部分が、IFN の活性に関連していることを示している。

【0040】

従って、Q5 R突然変異タンパク質は、天然の野生型IFN - 5 タンパク質とは異なる3次元構造を有し、その構造における穏和な変化を伴い且つグルタミン(極性)からアルギニン(正に荷電した)への電荷の増加により、その活性と機能において有意な変化を伴う。

50

【0041】

コンピューター分子モデリングにより示されることは、成熟した突然変異タンパク質上での突然変異Q47Eにより、「AB」ループのC末端部分(それは、IFN - 5のそのレセプターへの結合に関係することが知られている)のほどもを生じることである。これは、図1A及び1Bに示されている。

【0042】

位置47のグルタミン酸残基は、このループ形成において見掛け上重要な役割を果たす。その理由は、それが全てのインターフェロン中で維持されているからである。

【0043】

従って、コンピューター分子モデリングにより我々が予想可能になることは、位置47のグルタミン酸の存在が、天然野生型IFN - 5タンパク質の構造と機能の有意な変化に関わるだろうということである。 10

【0044】

従って、Q47E突然変異タンパク質は、天然の野生型IFN - 5タンパク質とは異なる3次元構造を有し、特にIFN - 5がそのレセプターに対して結合するレベルにおいて、その構造と機能における有意な変化を伴う。

【0045】

コンピューター分子モデリングにより示されることは、成熟した突然変異タンパク質上での突然変異C99Sにより、天然野生型IFN - 5タンパク質において、N末端部分並びにヘリックスC及びD間の「CD」ループの3次元構造に参加するジスルフィド架橋の消失がもたら 20

【0046】

突然変異C99SはN末端ループ(Cys1 - Thr6)可動部(mobile)を作る。これにより、ヘリックスCの末端のほども及び「CD」ループの乱れがもたらされる。

【0047】

このジスルフィド架橋は、全ての 及び インターフェロン中で保持されていることも知られている。故に、突然変異C99Sは、突然変異IFN - 5タンパク質のN末端部分及びCDループの両方の構造変化が理由で、そのレセプターに対する結合に影響を及ぼすに違いない。

【0048】

従って、C99S突然変異タンパク質は、天然の野生型IFN - 5タンパク質とは異なる3次構造を有し、特にIFN - 5がそのレセプターに対して結合するレベルにおいて、その構造と機能における有意な変化を伴う。 30

【0049】

本発明に従い、他のSNP、即ち、c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c及びg1009aは、アミノ酸配列(配列番号2)のレベルにおいて、IFN - 5遺伝子のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質の変更に関連しない。SNP、c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、及びg1009aは非コーディングである。

【0050】

本発明に従い、ポリヌクレオチドのジェノタイピングは、集団において、これらのポリヌクレオチドの対立形質頻度を測定するような態様において行われて良い。ジェノタイピングの例は、本明細書中、後の実施例の節に示されている。 40

【0051】

本発明のポリペプチドの機能の測定は、それらの生物活性を測定するのと同じように行われて良い。

【0052】

これについて、例えば、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、Tリンパ球によるサイトカインの放出、単球によるサイトカインの放出、in vitroもしくはin vivo抗ウイルス活性、予め悪性Friend赤白血病細胞を接種されたマウスにおける抗腫瘍活性、Daudi burkitt's細 50

胞系統に対する細胞増殖抗活性、本発明に従うポリペプチドのTF-1細胞系統に対する細胞増殖抗活性を測定すること並びに野生型IFN-5との比較、及び/又は代表的な市販製品として選択された野生型IFN-2との比較をすることが可能である。

【0053】

本発明は、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を出発して獲得及び/もしくは同定された治療分子の、特に所定のヒト障害及び/もしくは疾患を予防及び治療するための使用するための目的も有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0054】

発明の詳細な説明

10

定義

「参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列」とは、ヒトIFN-5遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)であるとして解される。

【0055】

この配列は、アクセス番号X02956でGenBankにおいてアクセス可能である。更に、ヒトIFN-5遺伝子はK.Henocoら「Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes」; J.Mol.Biol.; 185(2); pp.227~260(1985)に記載されている。

【0056】

「天然野生型IFN-5タンパク質」又は「野生型IFN-5タンパク質」とは、参照野生型IFN-5遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされた成熟タンパク質として解される。天然野生型未熟タンパク質IFN-5は、配列番号2に示されているペプチドに対応する。

20

【0057】

「ポリヌクレオチド」とは、変更された又は変更されていないDNAもしくはRNAでありうるポリリボヌクレオチドもしくはポリデオキシリボヌクレオチドとして解される。

【0058】

用語「ポリヌクレオチド」には、例えば、1本鎖又は2本鎖DNA、1もしくは複数の1本鎖領域の混合物からなるDNA及び1もしくは複数の2本鎖領域からなるDNA、1本鎖又は2本鎖RNA並びに1もしくは複数の1本鎖領域の混合物からなるRNA及び1もしくは複数の2本鎖領域からなるRNAを含む。用語ポリヌクレオチドとは、1又は複数の3重鎖領域を含むRNA及び/又はDNAも含みうる。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、変更された骨格を有する態様で変更された1又は複数の塩基を含むDNA又はRNAと同じであると解されている。変更された塩基とは、例えば、イノシンのような異常な塩基と解される。

30

【0059】

「ポリペプチド」とは、例えば、活性中心ペプチド(isosteric peptide)の場合などでは、通常のもしくは変更されたペプチド結合によって互いに連結した2以上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と解される。

【0060】

ポリペプチドは、遺伝子コードによって規定された20個のアミノ酸以外から成りうる。ポリペプチドは同様に、天然のプロセス、例えば、翻訳後成熟プロセスによって変更されたアミノ酸又は当業者に周知の化学的方法によって変更されたアミノ酸からなるポリペプチドであって良い。かかる変更は刊行物中に詳細に記載されている。これらの変更はポリペプチドのどこにおいても、即ち、ペプチド骨格、アミノ酸鎖又はカルボキシもしくはアミノ末端においてさえも現われる。

40

【0061】

ポリペプチドは、ユビキチン化の後に枝分かれされうる、あるいは枝分かれの有無に関わらず環状化されうる。このような種類の変更は、天然又は当業者に周知の人工翻訳後プロセスの結果でありうる。

50

【 0 0 6 2 】

例えば、ポリペプチド変更には、アセチル化、アシル化、ADP - リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合性の固定化、ヘムの共有結合性の固定化、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合性の固定化、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合性の固定化、フォスファチジルイノシトールの共有結合性の固定化、共有結合性もしくは非共有結合性の架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、ジメチル化、システイン形成、ピログルタミン酸塩形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、例えば、PEG化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨード添加、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解法、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セネロイル化 (seneloylation)、硫酸化、アミノ酸付加、例えば、アルギニル化もしくはコピキチン化などが含まれると解される。かかる変更は刊行物：PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES、第2版、T.E Creighton, New York, 1993、POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983、Seifterら、“Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”, Meth. Enzymol. (1990) 182 : pp. 626 ~ 646、及びRattanら“Protein Synthesis: Post-Translational Modifications and Aging”, Ann NY Acad Sci (1992) 663 : pp. 48 ~ 62中に十分に記載されている。

10

【 0 0 6 3 】

「単離されたポリヌクレオチド」もしくは「単離されたポリペプチド」とは、それぞれ例えば、予め規定されたように、ヒトの体から単離されたか又は技術的な方法によって生産された、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドとして解される。

20

【 0 0 6 4 】

「同一性」とは、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列の同一性の測定として解される。

【 0 0 6 5 】

同一性とは、当業者に周知の用語であり、そして刊行物中に十分に記載されている。COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin A.M. 及び Griffin H.G., Ed Humana Press, New Jersey 1994; 及び SEQUENCE ANALYSIS MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987を参照のこと。

30

【 0 0 6 6 】

2つの配列の間での同一性及び類似性を測定するのに通常用いられる方法も、同じように刊行物中に十分記載されている。GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994、及びCarillo H. 及びLipton D, Siam J Applied Math (1998) 48 : p. 1073を参照のこと。

【 0 0 6 7 】

例えば、ヌクレオチド配列 (配列番号1) と95%以上の同一性を有するポリヌクレオチドは、前記配列に比較して、100ヌクレオチドに渡り突然変異を最大で5点含むポリヌクレオチドである。

40

【 0 0 6 8 】

これらの点突然変異は、1 (又は数個の) ヌクレオチドの置換、付加、及び/又は1 (又は数個の) 欠失でありうる。

【 0 0 6 9 】

同様に、例えばアミノ酸配列 (配列番号2) と95%以上の同一性を有するポリペプチドは、前記配列に比較して、100ヌクレオチドに渡り突然変異を最大で5点含むポリペプチドである。

【 0 0 7 0 】

これらの点突然変異は、1 (又は数個の) アミノ酸の置換、付加、及び/又は1 (又は複数の) 欠失でありうる。

50

【0071】

それぞれヌクレオチド配列(配列番号1)又はアミノ酸配列(配列番号2)と完全に同一ではなく、本発明のSNPを1つ以上含むと解される本発明の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であると考えられる。

【0072】

通常、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のSNPを1つ以上を含んで成るヌクレオチド配列(配列番号1)と同じもしくは事実上同じ生物活性を有する。

【0073】

類似の態様において、通常、本発明のポリペプチドは、本発明のコーディングSNPを1つ以上を含んで成るアミノ酸配列(配列番号2)と同じもしくは事実上同じ生物活性を有する。 10

【0074】

本発明により、変異体は、例えば、部位特異的突然変異誘発によって、あるいは直接合成によって獲得されて良い。

【0075】

「SNP」とは、ヌクレオチド配列中の塩基の任意の天然変異と解される。ヌクレオチド配列上で、SNPは、コーディング、サイレント又は非コーディングであって良い。

【0076】

コーディングSNPとは、ヌクレオチド配列のコーディング配列中に含まれた多型であり、それは、このヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列におけるアミノ酸の変更に 20 関わる。この場合、用語SNPを、ひいては、アミノ酸配列中の突然変異と同じように適用される。

【0077】

サイレントSNPとは、ヌクレオチド配列のコーディング配列中に含まれた多型であり、それは、このヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列におけるアミノ酸の変更に 30 関与しない。

【0078】

非コーディングSNPとは、ヌクレオチド配列の非コーディング配列中に含まれた多型である。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配列の部位中で顕著に発見される。 30

【0079】

「機能的SNP」とは、先に規定されたように、機能を有するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列中に含まれているSNPであると解される。

【0080】

「機能」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解される。

【0081】

本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能は、野生型の参照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又はこの後者のヌクレオチド配列の生物活性の保存、増大、減少又は抑制からなりうる。

【0082】

本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能は、同じように、参照野生型遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチド又はこの後者のヌクレオチド配列の生物活性における本質的な変化にある。 40

【0083】

前記生物活性は、特に本発明のポリペプチドとレセプターとの親和性又は親和性の不在に結びつきうる。

【0084】

ポリヌクレオチド

本発明は、その第1の目的のために：

a) 配列(配列番号1)もしくはそのコーディング配列(ヌクレオチド434番～ヌクレオ 50

チド 1 0 0 3 番)と 8 0 %以上の同一性、好適には 9 0 %以上の同一性、更に好適には 9 5 %以上の同一性、そして更には 9 9 %以上の同一性を有するヌクレオチド配列(以下のコーディング SNP : a 5 1 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 cを 1 つ以上含んで成ると解されるヌクレオチド配列);又は

b) a)のヌクレオチド配列に対して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を有する。

【 0 0 8 5 】

本発明の背景において、ナンバリングは、ヌクレオチド配列(配列番号 1)中の SNP の位置に対応していると解される。

【 0 0 8 6 】

本発明は、同じように :

a) ヌクレオチド配列(配列番号 1)もしくはそのコーディング配列(これらの配列は、それぞれ以下のコーディング SNP : a 5 1 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 cを 1 つ以上含んで成ると解される);又は

b) a)のヌクレオチド配列に対して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連する。

【 0 0 8 7 】

好適には、本発明のポリヌクレオチドは、配列(配列番号 1)又はそのコーディング配列(これらの各配列はそれぞれ、以下のコーディング SNP : a 5 1 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 cを 1 つ以上含んで成ると解される)からなる。

【 0 0 8 8 】

本発明によれば、先に規定されたポリヌクレオチドは : a 5 1 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 cからなる群から選択されたコーディング SNP を 1 つ含んで成る。

【 0 0 8 9 】

一層好適には、先に規定されたポリヌクレオチドは、SNP g 7 9 8 cを含んで成る。

【 0 0 9 0 】

例えば、先に規定されたポリヌクレオチドは、同じように以下の非コーディング SNP を 1 つ以上含んで良い。その非コーディング SNP は : c 4 2 t、g 4 3 a、c 8 2 t、a 1 2 3 t、g 1 5 2 c、t 1 7 4 c、g 2 9 2 c及び g 1 0 0 9 aである。

【 0 0 9 1 】

本発明は、その目的のために同じように :

a) 以下の非コーディング SNP : c 4 2 t、g 4 3 a、c 8 2 t、a 1 2 3 t、g 1 5 2 c、t 1 7 4 c、g 2 9 2 c及び g 1 0 0 9 aを 1 つ以上含んで成ると解される、ヌクレオチド配列(配列番号 1);又は、

b) a)のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列。
を含んで成る又はからなる単離されたポリヌクレオチドを有する。

【 0 0 9 2 】

本発明は :

a) 以下の SNP : c 4 2 t、g 4 3 a、c 8 2 t、a 1 2 3 t、g 1 5 2 c、t 1 7 4 c、g 2 9 2 c、a 1 5 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 c、g 1 0 0 9 aを 1 つ以上含んで成ると解されるヌクレオチド配列(配列番号 1)もしくはそのコーディング配列;又は、

b) a)のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列
の一部からなる、10ヌクレオチド以上からなる単離されたポリヌクレオチドにも関する。

【 0 0 9 3 】

好適には、先に規定された前記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なる。

【 0 0 9 4 】

本発明は、その目的のために :

以下のコーディング SNP : Q 2 8 R、Q 7 0 E、C 1 2 2 Sを 1 つ以上含んで成ると解される、

a) アミノ酸配列(配列番号 2);又は

10

20

30

40

50

b) アミノ酸の配列(配列番号2)の位置24~189に含まれたアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列;

を含んで成るポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドも有する。

【0095】

本発明の背景において、SNP Q28R、Q70E及びC122Sの位置を決めることに対応するナンバリングは、アミノ酸配列(配列番号2)のナンバリングに関連すると解される。

【0096】

本発明の好適な目的によれば、先に規定されたポリペプチドは、先に規定されたコーディングSNPを1つ含んで成る。

【0097】

更に好適には、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、アミノ酸配列(配列番号2)の全部又は一部を含んで成るポリペプチドをコードし且つコーディングSNP C122S有する。

【0098】

好適には、本発明のポリヌクレオチドはDNA又はRNA分子からなる。

【0099】

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なDNA又はRNA合成方法により得られうる。

【0100】

本発明のポリヌクレオチドは、同じように、IFN-5遺伝子のヌクレオチド配列から出発し、ヌクレオチド配列(配列番号1)上の各SNPについての突然変異ヌクレオチドによって野生型ヌクレオチドを変更することにより、部位特異的突然変異誘発によって得られうる。

【0101】

例えば、SNP g798cを含んで成る本発明のポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列(配列番号1)上の位置798で、ヌクレオチドグアニン(g)をヌクレオチドシトシン(c)によって変更することにより、IFN-5遺伝子のヌクレオチド配列から出発する部位特異的(site-directed)突然変異誘発によって得ることができうる。

【0102】

このようにして行われうる部位特異的突然変異誘発の方法は、当業者に周知である。特に、TA Kunkelの1985年の刊行物「Proc.Natl.Acad.Sci.USA」82:488に記載されている。

【0103】

単離されたポリヌクレオチドは、同じように、例えば、プレ、プロ、もしくはプレプロタンパク質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。

【0104】

本発明のポリヌクレオチドは、同じように、融合タンパク質もしくは他の精製産物を獲得するために、他のタンパク質もしくはタンパク質断片をコードするヌクレオチド配列に関連しうる。

【0105】

本発明のポリヌクレオチドは、同じように、ヌクレオチド配列、例えば、5'及び/又は3'非コーディング配列、例えば、転写されるもしくは転写されない配列、翻訳されるもしくは非翻訳されない配列、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もしくはmRNAを安定化する配列さえも含む。

【0106】

前記ヌクレオチド配列又はポリヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列とは、ストリンジェント条件下でこのヌクレオチド配列とハイブリダイズできるものとして規定されている。

【0107】

「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」とは、必ずではないが一般には、ヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列が、80%以上、好適には90%以上、更に一層好適には95%以上そして最も好適には97%以上の同一性を有する場合にハイブリダイゼーションを可能にする化学的条件として解されている。

【0108】

前記ストリンジェント条件は、当業者に周知の方法、例えば、50%のホルムアミド、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×デンハルト液、10%のデキストラン硫酸及び20µgの変性サケ精子DNAを含んで成る溶液中、42℃でのポリヌクレオチドのインキュベーション、しかる後に0.1×SSCで65℃でのフィルターの洗浄によって達成することができる。

【0109】

本発明の範囲内で、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件により、同一性が100%に等しいヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションが可能になる場合、当該ヌクレオチド配列は、a)で記載されたようなヌクレオチド配列に対して厳密に相補的であると考えられる。

【0110】

本発明の目的の範囲内で、あるヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列は、本発明のアンチセンスSNPを1つ以上含んで成る。従って、例えば、もし前記ヌクレオチド配列がSNP g798cを含んで成るならば、それは、位置798相当にグアニン(g)ヌクレオチドを含んで成る相補的なヌクレオチド配列である。

【0111】

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、その目的のために：

ヌクレオチド配列(配列番号1)又は必要ならそのコーディング配列(ヌクレオチド434番～ヌクレオチド1003番)と80%～100%の同一性(好適には90%以上の同一性、更に一層好適には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もしくは一部を同定、ハイブリダイズ及び/もしくは増幅するために、

a) ヌクレオチド配列(配列番号1)と80%～100%の同一性(好適には90%以上の同一性、更に一層好適には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) SNPを1つ以上含んで成る本発明のポリヌクレオチド；

の全部もしくは一部の使用をも有する。これらヌクレオチド配列(配列番号1)又はそのコーディング配列は各自、以下のSNP：c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c及び1009aを1つ以上含んで成ると解される。

【0112】

SNPの頻度のジェノタイピング及び測定

本発明は同じように、その目的のために：

ヌクレオチド配列(配列番号1)又は必要ならそのコーディング配列(ヌクレオチド434番～ヌクレオチド1003番)と80%～100%の同一性(好適には90%以上の同一性、更に一層好適には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もしくは一部をジェノタイピングするために、

a)ヌクレオチド配列(配列番号1)と80%～100%の同一性(好適には90%以上の同一性、更に一層好適には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)SNPを1つ以上含んで成る本発明のポリヌクレオチド；

の全部もしくは一部の使用をも有する。これらヌクレオチド配列(配列番号1)又はそのコーディング配列は各自、以下のSNP：c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c及び1009aを1つ以上含んで成ると解される。

【0113】

10

20

30

40

50

本発明によれば、ジェノタイピングは個体又は個体の集団に対して行われて良い。

【0114】

本発明の目的の範囲内で、ジェノタイピングは、個体又は個体の集団の遺伝子型を特定するための方法として規定されている。遺伝子型は、1又は複数の特異的な座に存在する対立遺伝子からなる。

【0115】

「個体の集団」とは、ランダム又は非ランダム態様で選択された個体の集団として解されている。これらの個体はヒト、動物、微生物又は植物であって良い。

【0116】

通常、個体の集団は、10以上の個体、好ましくは100～300の個体を含んで成る。 10

【0117】

個体は、それらの民族性又はそれらの遺伝子型に従い、特に下記の障害及び/又は疾患に冒されているものが選択されて良い。その障害及び/又は疾患とは：ガン腫、黒色腫、リンパ腫、白血病並びに肝臓、頸部、頭部、及び腎臓のガン、心疾患、代謝性疾患、例えば、免疫系と無関係な肥満症など、感染症、特にB型及C型の肝炎及びAIDS、肺炎、潰瘍性大腸炎などのウィルス性感染症、中枢神経系の疾患、例えば、アルツハイマー病、統合性失調症及び鬱病など、組織又は器官移植の拒絶、傷の治癒、透析された患者の貧血、アレルギー、喘息、多発性硬化症、骨粗鬆症、乾癬、関節リウマチ、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による治療に関連した疾患である。

【0118】

本発明の機能的SNPは、好適に個体の集団においてジェノタイピングされている。 20

【0119】

SNPをジェノタイピングするために行ことができる複数の方法が存在する（特に、Knok Pharmacogenomics, 2000年、第1版、pp.95～100“High-throughput genotyping assay approaches”を参照のこと）。これらの技術は、以下の4つの原理に基づいている。その原理とは：対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、任意にデオキシヌクレオチドの存在下でのジデオキシヌクレオチドによる、オリゴヌクレオチドの伸長、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドのライゲーション又は対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの解裂である。これらの各技術は、検出系、例えば、直接もしくは偏光蛍光の測定又は質量分析法と組み合わせられて良い。 30

【0120】

ジェノタイピングは特に、偏光蛍光スキャナーと共同して、ホットdd NTP（異なる蛍光によって標識された2つの異なるdd NTP）及びコールドdd NTP（標識されていない2つの異なるdd NTP）によるミニシークエンシングにより行われうる。偏光蛍光の読み込みを伴うミニシークエンシングプロトコール（FP-TDI Technology or Fluorescence Polarization Templated-direct Dye-Terminator Incorporation）は当業者に周知である。

【0121】

それは、各個体のDNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅の後に得られた産物により行われて良い。このPCR産物は、調べられるSNPを含むポリヌクレオチドの遺伝子領域を網羅するように選択されている。次いで、PCRサーマルサイクラーの最後の段階の後に、プレートは偏光蛍光スキャナー上に置かれて、蛍光特異的励起フィルター及び放射フィルターを用いることによって標識された塩基の読み込みがなされる。標識された塩基の強度値は、グラフ上で報告される。 40

【0122】

PCR増幅のために、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、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て良い。

【0123】

例えば、PCR増幅プライマーのためのセンス及びアンチセンスヌクレオチド配列はそれぞれ：

【化1】

配列番号 3 : センスプライマー : GGTCACCTCAATCTCAACAGC

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

でありうる。

【 0 1 2 4 】

このヌクレオチド配列により、ヌクレオチド配列（配列番号 1）における、ヌクレオチド 390～ヌクレオチド 1070 の 681ヌクレオチドの長さの断片の増幅が可能になる。 10

【 0 1 2 5 】

次いで、個体の集団において、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）の統計的解析が達成されている。それにより、様々な亜集団におけるそれらの影響力及びそれらの分布の重要性が特定可能になり、もし必要であれば、この個体の集団を形成する多様な民族集団も特定可能になる。

【 0 1 2 6 】

調査された集団で確認された様々な対立遺伝子の分布頻度を見積もるために、ジェノタイプングデータが解析されている。対立遺伝子頻度の計算はSAS - suite（登録商標）（SAS）又はSPLUS（登録商標）（MathSoft）などのソフトウェアを用いて行われて良い。様々な民族集団の個体集団の全域に渡る本発明のSNPの対立遺伝子分布の比較は、ソフトウェアARLEQUIN（登録商標）及びSAS - suite（登録商標）により行われてうる。 20

【 0 1 2 7 】

遺伝子マーカーとしての本発明のSNP

遺伝子の機能的配列（プロモーター、スプライシング部位、コーディング領域など）を変更するSNPは、疾患の感受性又は耐性に直接関連しているようだが、全てのSNP（機能的又は非機能的な）により、これらの疾患の状態に関連する1又は複数の遺伝子を同定するための有用なマーカーが提供されて良く、従って、全てのSNPはこれらの疾患の症状に間接的に関連している（Cargillら（1999）.Nature Genetics 22 : pp.231～238 ; Rileyら（2000）pharmacogenomics1 : pp.39～47 ; Roberts L（2000）Science 287 : pp.1898～1899を参照のこと）。 30

【 0 1 2 8 】

従って、本発明は、INF - 5 遺伝子のポリヌクレオチドにおいて以下のSNPを1つ以上含んで成るデータバンクにも関する。そのSNPは：c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c及び1009aである。

【 0 1 2 9 】

前記SNPは、ヌクレオチド配列（配列番号 1）上でのそれらの位置に従い番号が降られていることは十分理解されるだろう。

【 0 1 3 0 】

このデータバンクは：

（ i ） INF - 5 遺伝子のポリヌクレオチドにおける、以下のSNP：c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c及び1009aの1つ以上、と 40

（ ii ） 疾患又は疾患に対する耐性

の直接的な関連を統計学的に特定するために解析されて良い。

【 0 1 3 1 】

本発明は、疾患又は疾患に対する耐性のための診断 / 予測キットを開発するために、以下のSNP：c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c及び1009aの1つ以上の使用にも関する。

【 0 1 3 2 】

先に規定された本発明のSNPは、直接もしくは間接的に、疾患もしくは疾患に対する耐性 50

に関連しうる。

【0133】

好適に、これらの疾患は、先に記載したように規定されたものであって良い。

【0134】

発現ベクター及び宿主細胞

本発明はその目的のために、本発明のポリヌクレオチドを1つ以上含んで成る組換えベクターをも有する。

【0135】

多くの発現系、例えば、限定ではないが、染色体、エピソーム、及び誘導ウイルス (derived virus) などが用いられて良い。さらに詳細には、用いられる組換えベクターは細菌のプラスミド、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス、例えば、バキュロウイルス、SV40などのパピローマウイルス、ワクシニアウイルス、アデノーマウイルス、キツネポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルスなどに由来して良い。

10

【0136】

これら組換えベクターは同じように、コスミド又はファージミド誘導体であって良い。ヌクレオチド配列は、組換え発現ベクター中に当業者に周知の方法によって挿入されてうる。それらの方法は、例えば、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrookら、第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001に記載されている。

20

【0137】

組換えベクターは、ポリヌクレオチド発現の調節を制御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及び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んで成る。これらの配列は、用いられている宿主細胞に従って選択される。

【0138】

従って、本発明のポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドが、小胞体のルーメンへ、細胞膜周辺腔へ、膜上に又は細胞外環境に向けられるように、例えば、適切な分泌シグナルが組換えベクター中に組み込まれて良い。

【0139】

本発明はその目的のために、本発明の組換えベクターを含んで成る宿主細胞も有する。

30

【0140】

宿主細胞中への組換えベクターの導入は、当業者に周知の例えば、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davisら、第2版、McGraw-Hill Professional Publishing、1995年及びMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUALなどに記載されている、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、陽イオン脂質、エレクトロポレーション、トランスダクションによるトランスフェクション、マイクロインジェクション、トランスフェクション又はインフェクションなどの方法によって行われて良い。

【0141】

宿主細胞は、例えば、ストレプトコクチ (streptococci)、スタフィロコクチ (staphylococci)、大腸菌 (E. coli) 又はバチルスサブチリス (Bacillus subtilis) などの細菌細胞、酵母細胞及びアスペルギルス (Aspergillus) ストレプトミセス (Streptomyces) の細胞などの真菌の細胞、ショウジョウバエ (Drosophila) S2 及びスポドプテラ (Spodoptera) Sf9 などの昆虫の細胞、CHO、COS、HeLa、C127、BHK、HEK293細胞などの動物の細胞及び治療される人の細胞又は植物の細胞であってさえも良い。

40

【0142】

宿主細胞は、本明細書中で後に分かるように、例えば本発明のポリペプチドを発現するために又は医薬組成物中の活性産物として用いられて良い。

【0143】

50

ポリペプチド

本発明はその目的のために：

以下のコーディングSNP：Q28R、Q70E、C122Sを1つ以上含んで成ると解される、

a) アミノ酸配列（配列番号2）；又は

b) アミノ酸配列（配列番号2）の位置24～位置189に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列；

の全部もしくは一部と80%以上の同一性、好適には90%以上の同一性、さらに好適には95%以上の同一性、及び更に好適には99%以上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を有する。

【0144】

10

本発明のポリペプチドは、同じように：

以下のコーディングSNP：Q28R、Q70E、C122Sを1つ以上含んで成ると解される、

a) アミノ酸配列（配列番号2）；又は

b) アミノ酸配列（配列番号2）の位置24～位置189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ることができる。

【0145】

本発明のポリペプチドはさらに詳細には：

以下のコーディングSNP：Q28R、Q70E、C122Sを1つ以上含んで成ると解される、

a) アミノ酸配列（配列番号2）；又は

b) アミノ酸配列（配列番号2）の位置24～位置189に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列；

から成る。

20

【0146】

好適には、本発明のポリペプチドは：Q28R、Q70E、C122Sからなる群から選択されたコーディングSNPを1つ含む。

【0147】

一層に好適には、本発明のポリヌクレオチドは、アミノ酸配列（配列番号2）のアミノ酸24～189を含んで成り、そしてコーディングSNP C122Sも有する。

【0148】

30

本発明は、同じように、その目的のために、上記のポリペプチドを調製するための方法を有する。この方法では、先に規定した宿主細胞が培養培地中で培養されそして前記ポリペプチドが当該培養培地から単離されている。

【0149】

ポリペプチドは宿主細胞の培養培地から出発して、当業者に周知の方法、例えば塩、詳細には硫酸アンモニウム、エタノール、アセトン又はトリクロロ酢酸、酸抽出物などのカオロピック剤による沈殿；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除外（exclusion）クロマトグラフィーなどの方法によって精製されて良い。

40

【0150】

「培養培地」とは、本発明のポリペプチドが単離又は精製される培地として解される。この培地は、細胞外培地及び／又は細胞溶出物からなっていて良い。もし、前記ポリペプチドの構造が単離及び精製途中に変化したならば、当業者に周知の技術により、同じように、細胞溶出物を当該ポリペプチドに対して活性のある構造に戻すことが可能である。

【0151】

抗体

本発明はその目的のために、免疫特異的抗体を得るための方法をも有する。

【0152】

「抗体」とは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、ヒト

50

化抗体並びにFab断片、例えばFab又は免疫グロブリン発現ライブラリー産物と解される。

【0153】

前記免疫特異的抗体は、本発明のポリペプチドによる動物の免疫化によって得られうる。

【0154】

本発明は、先に規定した、本発明のポリペプチドに対する免疫特異的抗体にも関連する。

【0155】

本発明のポリペプチド、その断片の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する細胞が免疫特異的抗体を生産するのに用いられて良い。

【0156】

用語「免疫特異的」とは、本発明のポリペプチドに対して当業界で公知の他のペプチドよりも良い親和性を有する抗体を意味する。 10

【0157】

免疫特異的抗体は、本発明のポリペプチド、その断片の1つ、類似物もしくはエピトープ断片又は、このポリペプチドを動物中(好ましくはヒトではない)で発現する細胞を当業者に周知の方法により投与することによって得られうる。

【0158】

モノクローナル抗体を調製するために、細胞系統から出発する抗体生産のための典型的な方法、例えばハイブリドーマ技術(Kohlerら、Nature(1975)256: pp.495~497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kohlerら、Nature(1975)256: pp.495~497)及びEBVハイブリドーマ技術(Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (第27巻、UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series)における「The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer」(R.A Reisfeld and S.Sell著)、pp.77~96、Alan R.Liss Inc. N.Y. 1985, pp.77~96)が用いられて良い。 20

【0159】

単鎖抗体を生産するための技術は、同じように、例えば、米国特許第4,964,778号に、同じように記載されている。

【0160】

トランスジェック動物、例えばマウスなどは、同じようにヒト化抗体を生産するために用いられて良い。 30

【0161】

本発明のポリペプチドと相互反応する因子

本発明は、同じように、その目的のために、本発明のポリペプチドを活性化もしくは阻害する因子を同定するための方法をも有する。その方法は：

- a) コーディングSNPを1つ以上含む本発明のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターを調製し；
- b) a)の組換えベクターを含んで成る宿主細胞を調製し；
- c) b)の宿主細胞と試験される因子とを接触させ；そして
- d) 試験される因子によって発生した活性化もしくは阻害効果を測定すること、を含んで成る。 40

【0162】

本発明のポリペプチドは、これと相互に作用する化合物をスクリーニングするための方法に用いられても良い。

【0163】

これらの化合物は、本発明のポリペプチド固有の活性を、活性化する(アゴニスト)又は阻害する(アンタゴニスト)でありうる。これらの化合物は、同じように、本発明のポリペプチドのリガンド又は基質であって良い。Coliganら、Current Protocols in Immunology 1(2)、第5章(1999)を参照のこと。

【0164】

一般に、かかる方法を行うには、本発明のポリペプチドを発現する適切な宿主細胞を生産 50

することが望ましい。かかる細胞は、例えば、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエなど昆虫の細胞又は大腸菌のような細菌であって良い。

【0165】

次いで、これらの細胞又はこれらの細胞の膜抽出物は、試験される化合物の存在下に置かれる。

【0166】

次いで、試験される化合物の、本発明のポリペプチドとの結合能力が観察され、並びに機能的反応の阻害又は活性化も観察される。

【0167】

上記方法の段階d)は、これは直接又は間接的に標識されている試験される因子を用いることによって行われうる。その方法には、標識されたもしくは標識されていない因子及び標識された競合因子を用いることによる競合試験も含まれて良い。

10

【0168】

もし、試験される因子が、本発明のポリペプチドを発現する細胞に対して活性化シグナル又は阻害シグナルを発生するなら、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、そのシグナルが、同じように測定されて良い。

【0169】

かかる活性化因子もしくは阻害因子は、ポリヌクレオチドであり、所定の場合、例えば、タンパク質もしくは抗体などの、オリゴヌクレオチドもしくはポリペプチドでありうる。

【0170】

本発明は、同じように、その目的のために、本発明のポリペプチドによって活性化もしくは阻害される因子を同定するための方法も有する。その方法は：

20

a) コーディングSNPを1つ以上含む本発明のポリヌクレオチドを含んで成る組換えベクターを調製し；

b) a)の組換えベクターを含んで成る宿主細胞を調製し；

c) b)の宿主細胞を試験される因子の存在下に置き；そして

d) 当該ポリペプチドによって、試験される因子に対して発生された活性化もしくは阻害効果の測定をすること、

を含んで成る。

【0171】

本発明のポリペプチドによって活性化もしくは阻害された因子は、それぞれこのペプチドの存在下における活性化もしくは阻害によって反応する因子である。

30

【0172】

本発明のポリペプチドによって直接もしくは間接的に活性化もしくは阻害される因子は、例えば、膜レセプターもしくは核内レセプター、キナーゼそして一層好ましくはチロシンキナーゼ、転写因子などのポリペプチド又はポリヌクレオチドからなる。

【0173】

疾患の検出

本発明は、その目的のために、対象者における本発明のポリヌクレオチド及び/又はポリペプチドの生物学的な特性を分析するための方法をも有する。その方法は：

40

a) 対象者のゲノムにおける本発明のポリヌクレオチドの存在又は不在を特定すること；

b) 対象者における本発明のポリヌクレオチドの発現のレベルを測定すること；

c) 対象者における本発明のポリペプチドの存在又は不在を特定すること；

d) 対象者における本発明のポリペプチドの濃度を測定すること；

e) 対象者における本発明のポリペプチドの機能を特定すること、

を1つ以上含んで成る。

【0174】

これらの生物学的な特性は、対象者中もしくは対象者由来の試料において分析されて良い。

【0175】

50

これらの生物学的特性により、遺伝子診断を開始することを可能にし且つ対象者が病気に冒されるかもしくは冒される危険性があるのか、又は、逆に、本発明のポリヌクレオチド及び／又は本発明のポリペプチドの存在につながりがある疾患、軽い病気もしくは障害の進行に対して部分的に耐性が存在するかどうかを特定することが可能になりうる。

【0176】

これらの疾患は、障害並びに／又はヒト疾患、例えばガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連した疾患及び／もしくは自己免疫疾患及び障害、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患、及び化学的治療に関連した疾患でありうる。

【0177】

前記ガン及び腫瘍には、転移性腎ガン、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、頸部、頭部、腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍及びAIDSの場合のカポジ肉腫を含んで成る、免疫欠損症に続いて現われる腫瘍が挙げられる。

【0178】

前記感染症には、慢性B型及びC型肝炎及びHIV/AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅のような性病を含んで成るウィルス感染症が挙げられる。

【0179】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患には、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎が挙げられる。

【0180】

前記代謝性疾患には、肥満症のような免疫とは無関係の疾患も含まれうる。

【0181】

中枢神経系の前記疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病も含まれうる。

【0182】

前記疾患及び障害には傷の治癒、透析された患者の貧血症、及び骨粗鬆症が含まれて良い。

【0183】

この方法により、対象者における、本発明のSNPによってコードされる突然変異対立遺伝子の存在に関連する疾患の耐性又は遺伝子診断も可能になる。

【0184】

好適には、段階a)において、先に規定されたコーディングSNPを1つ以上含むポリヌクレオチドの存在又は不在が確認されるだろう。

【0185】

ポリヌクレオチドの検出は、試験される対象者由来の生物試料、例えば、細胞、血液、尿、唾液から出発して、又は試験される対象者の生検体もしくは検死解剖体から出発して行われて良い。ゲノムDNAは、例えば、直接又はPCR増幅の後に検出のために用いられて良い。RNAもしくはcDNAは、同じように、類似の態様において用いることができる。

【0186】

次いで、本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列と対象者のゲノムにおいて検出されたヌクレオチド配列とを比較することが可能である。

【0187】

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方法によって、変性剤を伴う又は伴わない電気泳動ゲル上でのDNA断片の移動度の差によって、又は融解温度の差を比較することによって行うことができる。Myersら、Science(1985)、230:p1242を参照のこと。かかるヌクレオチド配列の構造中の規定の位置でのかかる変更は、同じように、ヌクレアーゼ保護試験、例えばRNase及びS1ヌクレアーゼにより、又は化学解裂剤によっても明らかにされて良い。Cottonら、Proc.Nat Acad.Sci.US

10

20

30

40

50

A(1985)85: pp4397~4401を参照のこと。本発明のポリヌクレオチド断片を含んで成るオリゴヌクレオチドプローブは、同じように、スクリーニングを行うために用いられて良い。

【0188】

当業者に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特定するために、そしてこのポリヌクレオチドの遺伝的多様性を同定するために用いられて良い(Science(1986)、第24巻、pp.610~613を参照のこと)。

【0189】

段階b)において、ポリヌクレオチドの発現のレベルは、このポリヌクレオチド(及びポリペプチドのためのコード領域)によってコードされるRNAのレベルを、当業者に周知の方法、例えば、PCR、RT-PCR、RNase保護法、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り定量化することによって測定されて良い。

10

【0190】

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のポリペプチドの存在もしくは不在並びに濃度(の特定)は、当業者に周知の方法、例えば、ラジオイムノアッセイ、競合的結合試験、ウェスタンブロット及びELISA試験によって行われて良い。

【0191】

段階d)に引き続いて、本発明のポリペプチドの測定された濃度は、通常対象者において発見される天然野生型タンパク質の濃度と比較されうる。

【0192】

当業者は、感度、又はそれとは対照的な、疾患、軽い病気もしくは先に示した障害に対する耐性を示す閾値(上方もしくは下方の)を、従来技術の刊行物を用いることにより、もしくは先に記載したものなどの常用の試験もしくはアッセイにより容易に確認できうる。

20

【0193】

段階e)において、本発明のポリペプチドの機能の測定は当業者に周知の方法、例えば、先に記載したin vitro試験によって、又は前記ポリペプチドを発現する宿主細胞を使用することによって行われて良い。

【0194】

治療化合物及び疾患の治療

本発明は、その目的のために、活性因子として、本発明のポリペプチドを含む治療化合物も有する。

30

【0195】

本発明は、様々なヒトの疾患及び/もしくは障害を予防もしくは治療をするのが目的の治療化合物を製造するための、本発明のポリペプチドの使用にも関連する。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、免疫に関連した疾患及び/もしくは自己免疫疾患及び障害、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患、及び化学的治療に関連した疾患でありうる。

【0196】

前記ガン及び腫瘍には、転移性腎ガン、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、頸部、頭部、腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍及びAIDSの場合のカポジ肉腫を含んで成る、免疫欠損症に続いて現われる腫瘍が挙げられる。

40

【0197】

前記感染症には、慢性B型及びC型肝炎及びHIV/AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅のような性病を含んで成るウィルス感染症が挙げられる。

【0198】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患には、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎が含まれうる。

50

【0199】

前記代謝性疾患には、肥満症のような免疫とは無関係の疾患も含まれうる。

【0200】

中枢神経系の前記疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病も含まれうる。

【0201】

前記疾患及び障害には傷の治癒、透析された患者の貧血症、及び骨粗鬆症が含まれうる。

【0202】

好適に、本発明のポリペプチドは、様々なヒト障害及び／又は疾患を予防もしくは治療をする目的のための治療化合物を製造するために用いられて良い。その障害及び／又は疾患には、例えば、所定のウィルス感染症、例えば、B型及びC型肝炎、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ性白血病などの白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド腫瘍、悪性黒色腫、転移性腎ガン、アルツハイマー病、パーキンソン病、並びに、AIDSの場合のカボジー肉腫などの免疫疾患の後に現われる腫瘍及び陰部疣贅又は性病が挙げられる。

10

【0203】

所定の、本発明のポリペプチドの獲得を可能にする化合物、並びにこのポリペプチドによってもしくはこのポリペプチドから獲得もしくは同定された化合物は、ヒトの体を治療学的に治療するために、即ち、治療化合物として用いられて良い。

【0204】

従って、本発明は、その目的のために、活性因子として先に規定したコーディングSNP 1つ以上含む本発明のポリヌクレオチド、先に規定した組換えベクター、先に規定した宿主細胞、及び／もしくは先に規定した抗体を含む医薬も有する。

20

【0205】

本発明は、先に規定したコーディングSNPを1つ以上含む本発明のポリヌクレオチド、先に規定した組換えベクター、先に規定した宿主細胞、及び／又は先に規定した抗体の、様々なヒト障害及び／又は疾患を予防もしくは治療をする目的のための医薬を製造するための使用にも関連する。これらの疾患は、障害並びに／又はヒト疾患、例えばガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連した疾患及び／もしくは自己免疫疾患及び障害、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患、及び化学的治療に関連した疾患でありうる。

【0206】

前記ガン及び腫瘍には、転移性腎ガン、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、頸部、頭部、腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍及びAIDSの場合のカボジー肉腫を含んで成る、免疫欠損症に続いて現われる腫瘍が挙げられる。

30

【0207】

前記感染症には、慢性B型及びC型肝炎及びHIV/AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅のような性病を含んで成るウィルス感染症が挙げられる。

【0208】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患には、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎が挙げられる。

40

【0209】

前記代謝性疾患には、肥満症のような免疫とは無関係の疾患も含まれて良い。

【0210】

中枢神経系の前記疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病も含まれうる。

【0211】

前記疾患及び障害には傷の治癒、透析された患者の貧血症、及び骨粗鬆症が含まれうる。

【0212】

50

好適に、本発明は、先に規定したコーディングSNPを1つ以上含む本発明のポリヌクレオチド、先に規定した組換えベクター、先に規定した宿主細胞、及び/又は先に規定した抗体の、様々なヒト障害及び/又は疾患を予防もしくは治療をする目的のための医薬を製造するための使用にも関連する。その障害及び/又は疾患には、例えば、所定のウィルス感染症、例えば、B型及びC型肝炎、ヘアリー細胞白血病及び、慢性リンパ性白血病などの白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド腫瘍、悪性黒色腫、転移性腎ガン、アルツハイマー病、パーキンソン病、並びに、AIDSの場合のカポジ肉腫など免疫欠損症の後に現われる腫瘍、及び陰部疣贅又は性病が挙げられる。

【0213】

活性因子として有用な、本発明のポリペプチド及び他の化合物の投与量は、化合物の選択、治療上の適応、投与の態様、製剤の性質、対象者の性質及び医者判断に依存する。 10

【0214】

本発明のポリペプチドは、活性因子として用いられた場合、一般に1~100 µg/kg対象者の量で投与される。

【0215】

本発明は、その目的のために、医薬組成物も有する。それは、活性因子として、例えば、本発明のポリペプチド、先に規定したコーディングSNPを1つ以上を含む本発明のポリヌクレオチド、先に規定した組換えベクター、先に規定した宿主細胞、及び/又は先に規定した抗体などの上記化合物を1つ以上含み、並びに医薬的に許容できる賦形剤を含む医薬組成物も有する。 20

【0216】

これらの医薬組成物において、活性因子は生理的に有効な量において有利に存在している。

【0217】

これらの医薬組成物は、例えば、固体又は液体であって良く、且つ通常ヒトの医薬において用いられている医薬形態、例えば、単純もしくは被覆錠剤、ジェルキャップ、顆粒、カラムル、座薬及び好適には注射可能製剤及び注射可能にするための粉末、の形態において存在して良い。これらの医薬形態は、通常の方法により調製されて良い。

【0218】

活性因子は、通常医薬中で用いられている賦形剤、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、水性又は非水性ビヒクル、動物もしくは植物起源の脂肪性物質、パ ラフェン誘導体、グリコール、様々な湿潤剤、分散剤もしくは乳化剤、防腐剤の中に組み 込まれて良い。 30

【0219】

本発明の活性因子は、単独であるいは他の化合物、例えば、インターロイキンもしくはイ ンターフェロンなど他のサイトカインなどの治療化合物と組み合わせて用いられて良い。

【0220】

様々な処方法の医薬組成物が投与の態様により適用されている。

【0221】

医薬組成物は当業者に公知の様々な投与経路によって投与されて良い。 40

【0222】

本発明は、同じように、その目的のために、活性因子として、本発明のポリペプチド、本発 明のポリヌクレオチドの全部又は一部、先に規定した組換えベクター、先に規定した宿主 細胞、及び/又は先に規定した抗体などの先に規定した化合物を1つ以上含み、並びに医 薬的に許容できる適切な賦形剤を含む診断組成物を有する。

【0223】

この診断組成物は、例えば、診断組成物中で一般に用いられている、バッファー及び防腐 剤など適切な賦形剤を含んでも良い。

【0224】

本発明は、同じように：

- a) 治療的に有効な量の本発明のポリペプチド；及び／もしくは
 - b) 本発明のポリヌクレオチド；及び／もしくは、
 - c) 先に規定した、治療される対象者由来の宿主細胞、
- を使用して、対象者において本発明のポリペプチドの発現又は活性を高める目的の治療化合物を調製する目的も有する。

【0225】

従って、本発明のポリペプチドの発現又は活性を高める必要がある対象者を治療するためには、いくつかの方法が可能である。

【0226】

治療的に有効な量の本発明のポリペプチドを、医薬的に許容できる賦形剤により対象者に対して投与することが可能である。

【0227】

本発明のポリヌクレオチドを対象者に投与することによって本発明のポリペプチドの内生産を高めることも可能である。例えば、このポリヌクレオチドはレトロウィルス発現ベクター中に挿入できうる。かかるベクターは、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウィルスプラスミドベクターによって感染されている細胞から出発して、トランスダクションされた当該細胞が注目の遺伝子を含む感染性ウィルス粒子を生産する態様において、単離できうる。Strachan and Read, Bios Scientific Publishers Ltd. (1996)、Human Molecular GeneticsにおけるGene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, 第20章、を参照のこと。

【0228】

本発明により、先に規定したコーディングSNPを1つ以上含むポリヌクレオチドが好適に用いられるだろう。

【0229】

同じように、対象者に対して、彼に属する宿主細胞を投与することは可能であり、これらの宿主細胞は、先に規定した本発明のポリペプチドを発現するように、予め取り出されて改変されている。

【0230】

本発明は、同じように：

- a) 治療上有効な量の先に規定した免疫特異的抗体；及び／又は
 - b) 本発明のポリヌクレオチドの発現の阻害を可能にするポリヌクレオチド
- の、対象者において本発明のポリペプチドの発現もしくは活性を下げる目的の治療化合物を調製するための使用にも関連する。

【0231】

従って、対象者に対して、治療上有効な量の阻害因子及び／又は先に規定した抗体を、可能性としては、医薬的に許容できる賦形剤との組み合わせにおいて投与することも可能である。

【0232】

同じように、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、本発明の相補的なポリヌクレオチドを投与することによって、本発明のポリペプチドの内生産を減らすことが可能である。

【0233】

好適には、先に規定したコーディングSNPを1つ以上含む相補的ポリヌクレオチドが用いられて良い。

【0234】

本発明は、以下のSNP：c4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c及び1 0 0 9 aの1つを含んで成るという条件のヌクレオチド配列(配列番号1)と、95%以上の同一性(好適には97%以上の同一性、更に好適には99%の同一性、そして特に100%の同一性)を有するヌクレオチド配列が患

10

20

30

40

50

者ゲノム中に存在することに関連したIFN - 5突然変異体によって生じる障害もしくは疾患の予防もしくはその患者の治療をする医薬を調製するための、IFN - 5タンパク質の使用も考慮する。

【0235】

好適には、前記医薬は、ガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連した疾患及び／もしくは自己免疫疾患及び障害、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患、及び化学的治療に関連した疾患からなる群から選択された疾患の1つを予防又は治療するために用いられている。

【0236】

前記ガン及び腫瘍には、転移性腎ガン、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、頸部、頭部、腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍及びAIDSの場合のカポジ肉腫を含んで成る、免疫欠損症に続いて現われる腫瘍が挙げられる。

【0237】

前記感染症には、慢性B型及びC型肝炎及びHIV/AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅のような性病を含んで成るウィルス感染症が挙げられる。

【0238】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患には、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎が含まれる。

【0239】

前記代謝性疾患には、肥満症のような免疫とは無関係の疾患が挙げられる。

【0240】

中枢神経系の前記疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病も挙げられる。

【0241】

前記疾患及び障害には傷の治療、透析された患者の貧血症、及び骨粗鬆症が含まれうる。

【0242】

本発明のSNP C122Sを含んで成るIFN - 5ポリペプチドの擬態化合物

本発明は：

a) アミノ酸配列（配列番号2）；又は

b) アミノ酸配列（配列番号2）の位置24～189に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列、

のポリペプチドの生物活性に実質上類似する生物活性を有する新規化合物にも関係する。ここでa)及びb)のアミノ酸配列は、SNP C122Sを含んで成るという条件を有する。

【0243】

前記生物活性は、例えば、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、CD4⁺もしくは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もしくはin vivo抗ウィルス活性、悪性Friend赤白血病細胞を予め接種されたマウスの抗腫瘍活性、Daudi Burkitt細胞系統に対する細胞抗増殖活性、TF-1細胞系統に対する細胞抗増殖活性を実施例の節に記載されたように測定することによって評価されて良い。

【0244】

実施例の節に記載されたように、野生型IFN - 2に比べて、C122S突然変異IFN - 5は：

- CD4⁺又はCD8⁺Tリンパ球によるIFN - 放出を刺激するより高い能力、
 - 単球によるIL - 10及びTNF - 放出を刺激するより高い能力、
 - VSVに感染した培養細胞におけるより低いin vitro抗ウィルス活性、
 - 予め悪性Friend赤白血病細胞を接種されたマウスにおけるより高い抗ウィルス活性、
 - EMVCマウスモデルにおける類似のin vivo抗ウィルス活性、
- を有する。

30

40

50

【0245】

実施例の節に記載されているように、C122S突然変異IFN- γ は、樹状細胞が成熟するのを刺激する高い能力を有し、このC122S突然変異IFN- γ による活性は、野生型IFN- γ 及び野生型INF- γ に比べて高い。

【0246】

実施例の節に記載されたように、野生型IFN- γ に比べて、C122S突然変異IFN- γ は：

- MCF-7乳ガン細胞系統におけるシグナル伝達を活性化するより低い能力、
- Daudi Burkitt細胞系統に対するより低い抗増殖活性、
- VSVに感染した培養細胞におけるより低いin vitro抗ウィルス活性、

10

を有する。

【0247】

本発明の新規化合物は、例えば、先に規定したように、C122S突然変異IFN- γ の生物活性に実質上類似する生物活性を有しうる。

【0248】

前記化合物は、C122S突然変異IFN- γ よりも高い、Tリンパ球によるIFN- γ 放出、単球によるIL-1 β 及びTNF- α 放出、悪性Friend赤白血病細胞を予め接種されたマウスの抗腫瘍活性、及び/又は樹状細胞成熟などの生物活性を有しうる。

【0249】

前記化合物は、C122S突然変異IFN- γ よりも低い、例えばVSVに感染した培養細胞におけるin vitro抗ウィルス活性、及び/又はDaudi Burkitt細胞系統に対するより低い抗増殖活性をも有しうる。

20

【0250】

前記化合物は生化学的な化合物、例えば、ポリペプチドもしくはペプチドなど、又は有機化学的な化合物、例えば、合成ペプチド擬態などでありうる。

【0251】

本発明は、C122S SNPを含む本発明のポリペプチドの、上に規定した化合物を同定するための使用にも関する。

【0252】

本発明は、本発明の化合物を同定する方法にも関連する。当該方法は、以下の段階：

30

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⁺もしくはCD8⁺Tリンパ球によるサイトカインの放出、単球によるサイトカイン放出、in vitroもしくはin vivo抗ウィルス活性、悪性Friend赤白血病細胞を予め接種されたマウスにおける抗腫瘍活性、Daudi Burkitt細胞系統に対する細胞抗増殖活性を特定し；

b) i)試験される化合物の段階a)で特定した活性と、

ii)C122S SNPを含んで成るという条件であるアミノ酸配列（配列番号2）のポリペプチド又は当該アミノ酸配列（配列番号2）の位置24～189に含まれたアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列の活性、とを比較し；そして

c) b)で行われた比較に基づき、試験された化合物が、C122S SNPを含んで成るという条件であるアミノ酸配列（配列番号2）のポリペプチド又は当該アミノ酸配列（配列番号2）の位置24～189のアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列に比較して、実質上類似する、又はより低いもしくはより高い活性を有するのかを特定する；

40

段階を含んで成る。

【0253】

好適に、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、ハイスループットスクリーニングにより予め同定されて良い。あるいは、C122S SNPを含んで成るという条件である、アミノ酸配列（配列番号2）又は当該アミノ酸配列（配列番号2）の位置24～189に含まれるアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列と同じ3次構造を持つようにコンピューターによるドラッグデザインによって設計されうる。

【0254】

50

化合物を同定及び設計する方法は、当業者に周知である。

【0255】

これらの方法に言及する刊行物には、例えば：

- Silverman.R.B(1992)「Organic Chemistry of Drug Design and Action」、Academic Press 第1版(1992年1月15日)；

- Anderson S及びChiplin .J(2002)「Structural genomics; shaping the use of drug design」Drug Discov. Today. 7(2):pp.105~107

- Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH.(2002)「The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery」Drug Discv .Today 7(2):pp.109~116；

- Burbidge R, Trotter M, Buxton B, Holden S.(2002)「Drug design by machine learning: support vector machines for pharmaceutical data analysis」Comput. Chem. 26(1):pp.5~14；

- Kauvar L.M(1996).「Peptide mimetic drugs: a comment on progress and prospects」14(6):p709

などが挙げられうる。

【0256】

本発明の化合物は、ガン及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連した疾患及び/もしくは自己免疫疾患及び障害、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患、及び化学的治療に関連した疾患からなる群から選択された疾患の1つの予防又は治療を目的とした医薬を調製するために用いられて良い。

【0257】

前記ガン及び腫瘍には、転移性腎ガン、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、頸部、頭部、腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍及びAIDSの場合のカポジ肉腫を含んで成る、免疫欠損症に続いて現われる腫瘍が挙げられる。

【0258】

前記感染症には、慢性B型及びC型肝炎及びHIV/AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅のような性病を含んで成るウィルス感染症が挙げられる。

【0259】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患には、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、クローン病及び潰瘍性大腸炎が挙げられうる。

【0260】

前記代謝性疾患には、肥満症のような免疫とは無関係の疾患も含まれうる。

【0261】

中枢神経系の前記疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病も含まれて良い。

【0262】

前記疾患及び障害には傷の治癒、透析された患者の貧血症、及び骨粗鬆症が含まれうる。

【0263】

好適に、本発明の化合物は、所定のウィルス感染症、例えば、B型及びC型肝炎、ヘアリー細胞白血病、慢性リンパ性白血病などの白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド腫瘍、悪性黒色腫、転移性腎ガン、アルツハイマー病、パーキンソン病、並びに、AIDSの場合のカポジ肉腫などの免疫欠損症の後に現われる腫瘍及び陰部疣贅又は性病からなる群から選択された疾患の1つの予防又は治療を目的とした医薬を調製するために用いられて良い。

【実施例】

【0264】

10

20

30

40

50

実施例実施例 1

SNP c6 4 1 g又はg7 9 8 c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

第1の段階において、そしてPDBデータベースから入手可能(コード1ITF)なINF - 2の3次元構造から出発して、ソフトウェアModeler(MSI, San Diego, CA)を用いることによって、INF - 5の3次元構造を構築した。

【0265】

次いで、成熟ポリペプチド断片を、突然変異Q47E及びC99Sを再生成する態様で変更した。

【0266】

次いで、この成熟断片に対してプログラムAMBER及びDISCOVER(MSI: Molecular Simulation Inc.)を用いることによって1000段階の分子最小化を行った。

【0267】

次いで、2つの分子動力学計算ランを同じプログラム及び同じ力場で行った。

【0268】

各場合、50,000段階を300°Kで計算し、300平衡段階で終了した。

【0269】

モデリングの結果を図1A及び図1B、並びに図2A及び2Bに視覚化している。

【0270】

実施例2: SNP a5 1 6 g、c6 4 1 g、又はg7 9 8 cの各集団におけるジェノタイピング
SNPのジェノタイピングは、産物が偏光蛍光の読み込みによって検出されるミニシークエンシングの原理に基づいている。この技術は、蛍光ミニシークエンシングから成る(FP-TDI Technology又はFluorescence Polarization Template direct Dye-terminator incorporation)。

【0271】

ミニシークエンシングを、集団の各個体のゲノムDNAからPCRによって増幅した産物に対して行う。このPCR産物をジェノタイピングされるSNPを含む遺伝子領域を網羅する態様で選択した。用いられなかったPCRプライマー及び組み込まれなかったdNTPを除いた後で、前記ミニシークエンシングを行った。

【0272】

ミニシークエンシングは、SNP部位の上流側に丁度位置したオリゴヌクレオチドプライマーの、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る伸長からなる。この伸長方法よりもたらされる産物を偏光蛍光を読み込むことによって直接解析する。

【0273】

これらの全ての段階、並びに読み込みを同じPCRプレートで行った。

【0274】

従って、ジェノタイピングには5つの段階:

- 1) PCRによる増幅、
- 2) 酵素消化によるPCR産物の精製
- 3) オリゴヌクレオチドプライマーの伸長
- 4) 読み込み
- 5) 読み込んだものの翻訳

が必要である。

【0275】

ジェノタイピング段階1及び2を、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 cの各SNPに対して同じ条件で行った。段階3、4及び5は、これらの多型のそれぞれに対して特異的である。

【0276】

10

20

30

40

50

1) IFN - 5 遺伝子のヌクレオチド配列のPCRによる増幅を、民族的に起源の異なる 268 個体に由来するのゲノムDNAから出発して行った。

【0277】

これらのDNAは、Coriell Institute in the United States によって提供された。

【0278】

268 個体は以下のとおりである。

【表1】

系統的集団	特異的民族集団	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
アメリカンインディアン人	南アメリカアンデス人	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
ヨーロッパ系白人	北アメリカ系白人	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
非ヨーロッパ系白人	ギリシャ人	8	21.6
	インドーパキスタン人	9	24.3
	中東人	20	54.1
	小計	37	13.8
東南アジア人	太平洋諸島系人	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

【0279】

これらの個体それぞれに由来するゲノムDNAが試料を構成する。

【0280】

全てのSNPについて、PCR増幅を以下のプライマーから出発して行った。

【化 2】

配列番号 3 : センスプライマー : GGTCACCTCAATCTCAACAGC

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

【0281】

これらのヌクレオチド配列により、ヌクレオチド配列（配列番号 1）のヌクレオチド 390 ~ ヌクレオチド 1070 の、681ヌクレオチドの長さの断片の増幅が可能になる。

10

【0282】

各 SNP について、PCR 産物はミニシーケンシングのための鋳型として有効であろう。

【0283】

PCR 反応の総反応体積は、試料につき 5 μ l である。

【0284】

反応体積は下の表に示した試薬からなる。

【表 2】

供給者	参照	反応物	初濃度	体積/チューブ (μ l)	最終濃度
Life Technology	Taqと共に供給された	バッファー(X)	10	0.5	1
Life Technology	Taqと共に供給された	MgSO ₄ (mM)	50	0.2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0.1	0.2
	必要次第	センスプライマー (μ M)	10	0.1	0.2
	必要次第	アンチセンスプライマー (μ M)	10	0.1	0.2
Life Technology	11304-029	Taq白金	5U/ μ l	0.02	0.1U/反応物
		H ₂ O	Qsp 5 μ l	1.98	
		DNA (試料)	2.5ng/ μ l	2	5ng/反応物
		合計体積		5 μ l	

20

30

【0285】

これらの試薬を ABGene (参照 TF - 0384 - K) によって提供された 384 ウェルのブラック PCR プレートに分注した。次いで、プレートを密封し、遠心し、384 ウェルプレートのためのサーモサイクラー (Tetrad of MJ Reserch) に置いて、以下のインキュベーションを行った。PCR サイクル、即ち、94 で 1 分、しかる後に 3 段階 (94 で 15 秒、56 で 30 秒、68 で 1 分) からなる 36 サイクルである。

40

【0286】

2) 次いで、PCR 増幅産物を 2 つの酵素 : エピアルカリフォスファターゼ (SAP) 及びエキソヌクレアーゼ I (Exo I) を用いて精製する。これらの酵素により、第 1 に、PCR 増幅中に組み込まれなかった dNTP の脱リン酸化が起こり、第 2 に、他方で単一標準 DNA 残さ、詳細には、PCR 中に用いられなかったプライマーが取り除かれる。

50

【 0 2 8 7 】

消化を、PCRプレートの各ウェルごとに、試料につき5 μ lの反応混合物を添加することによって行う。この反応混合物は、以下の試薬からなる。

【表 3】

供給者	参照	反応物	初濃度	体積／チューブ* (μ l)	最終濃度
AP Biotech	E70092X	SAP	1U/ μ l	0.5	0.5/反応物
AP Biotech	070073Z	Exo I	10U/ μ l	0.1	1/反応物
AP Biotech	SAPと共に 供給された	ハフア-SAP (X)	10	0.5	
		H ₂ O	Qsp 5 μ l	3.9	
		PCR 産物		5 μ l	
		合計体積		10 μ l	

10

【 0 2 8 8 】

プレートを、充填した後に密封し、遠心し、そして384ウェルプレートのためのサーモサイクラー (Tread of MJ Reserch) に置いて、以下のインキュベーションを行った。それは、SAP - EXO消化：37 で45分、80 で15分である。

20

【 0 2 8 9 】

次いで、伸長又はミニシークエンシング段階を、調製した試料につき5 μ lの反応混合物を添加することによって消化されたPCRの産物に対して行った。

【 0 2 9 0 】

ミニシークエンシング3)及び読み込み4)及び読み込んだものの読み替え5)段階は、各SNP、a5 1 6 g、c6 4 1 g及びg7 9 8 cに対して特異的である。

【 0 2 9 1 】

これらの段階の全てを、これらそれぞれの多型のために用いた特異的な条件を正確に、本明細書中、以降に記載している。

30

【 0 2 9 2 】

3)ミニシークエンシング

ジェノタイピングのために欠かせない2つのミニシークエンシングプライマーの配列を、本発明のSNP部位の上流に位置したヌクレオチドの配列に対応するように決定した。SNPを含むPCR産物は2本鎖DNA産物であり、故に、そのジェノタイピングをセンス鎖又はアンチセンス鎖のどちらかに対して行うことができる。選定のプライマーは、Life Technologies Inc.で製造されている。

【 0 2 9 3 】

下の表には、各SNPについて、試験したミニシークエンシングプライマーの配列及びジェノタイピングのために維持した至適条件を示している。

40

【表 4】

SNP	試験したプライマー	ジェノタイピングのための至適条件
a516g	配列番号5 : セン : tctgggctgtgatctgcctc 配列番号6 : アンチセン : tgttactcaggctgtgggtc	アンチセンプライマー+ ddTTP-R110+ddGTP-Tamra
c641g	配列番号7 : セン : aggaggagtttgatggcaac 配列番号8 : アンチセン : ggcttgagccttctggaact	センプライマー+ dCTP-R110+ddGTP-Tamra
g798c	配列番号9 : セン : gctgaatgacctggaagcct 配列番号10 : アンチセン : ctccaacctcctgcatacata	アンチセンプライマー+ ddGTP-R110+ddCTP-Tamra

10

【0294】

SNPのミニシーケンシングを最初16試料に対して確認し、そして268個体及び10コントロールからなる一式の個体集団に対してジェノタイピングした。

【0295】

次いで、伸長又はミニシーケンシング段階を以下の表に示すように行う。

【表5】

供給者	参照	反応物	初濃度	体積/チューブ [*] (μ l)	最終濃度
自分で調製する		伸長バッファー (X)	5	1	1
Life Technologies	必要次第	Miniseq プライマー(μ M) A又はB	10	0.5	1
AP Biotech	27-2051 (61, 71, 81)-01	ddNTPs ² (μ M) 2つは標識されていない	各々2.5	0.25	各々0.125
NEN	Nel 472/5 及びNel 492/5	ddNTPs ² (μ M) 2つはTamra及びR110で 標識されている	各々2.5	0.25	各々0.125
AP Biotech	E79000Z	Thermo-配列	3.2U/ μ l	0.125	0.4U/反応物
		H ₂ O	Qsp 5 μ l	3.125	
		消化したPCR産物		10	
		合計体積		15	

20

30

¹ 5X伸長バッファーは250mMのトリス-HCl pH 9、250mM KCl、25mMのNaCl、10mMのMgCl₂及び40%のグリセロールからなる。

40

² ddNTPのために、4塩基の混合が多型研究により行われている。機能性SNPを含む注目の2塩基（野生型ヌクレオチド/変異ヌクレオチド）のみがTamra又はR110で標識された。

【0296】

次いで、プレートを、充填した後に密封し、遠心し、384ウェルプレートのためのサーモサイクラー（Tetrad of MJ Reserch）に置いて、以下のインキュベーションを行った。伸長PCRサイクル、即ち、93 で1分、しかる後に2段階（93 で10秒、55 で30秒）からなる35サイクルである。

50

【0297】

サーモサイクラーでの最後の段階の後、プレートをLJL Biosystems IncのAnalyst (商標登録) HT型の偏光蛍光リーダーに直接置いた。2つの方法を用いることによるCriterion Host (商標登録) ソフトウェアを用いてプレートを読んだ。第1番目にTamra標識された塩基を、この蛍光 (励起 550 ~ 10 nm、放射 580 ~ 10 nm) に対して特異的な放射及び励起フィルターを用いることによって読み込み可能にし、そして第2番目に、R110標識された塩基を、この蛍光 (励起 490 ~ 10 nm、放射 520 ~ 10 nm) に対して特異的な励起及び放射フィルターを用いることによって読み込み可能にする。この2つの場合において、Dichroic double mirror (R110 / Tamra) を使用し、そして他の読み込みパラメーターは：

Z高度：1.5 mm

アテニューエーター：アウト

積分時間：100,000 µ秒

ローデータ (Raw data) 単位：カウント / 秒

偏極スイッチ：ウェルによって

プレート定着時間：0 m秒

PMTセットアップ：Smart Read (+)、感度 2

ダイナミック偏極器：放射

空電偏極器：S

10

【0298】

このようにして得られたファイル結果 (file result) は、Tamraフィルター及びR110フィルターについて計算されたmP (ミリ偏極化) の値を含んでいる。これらのmP値は、下記の式により、平行面 (//) に対して得られた強度値及び垂直面 () に対して得られた強度値から出発して計算される。

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

20

【0299】

この計算では、値 は、因子 g により重み付けされている。それは、実験的に予め測定されていなければならない機械的パラメーターである。

【0300】

4) 及び 5) 読み込んだものの読み替え及び遺伝子型の決定

mP値はMicrosoft Inc.のExcel ソフトウェア、及び / 又はLJL Biosystems Inc.によって開発されたAllele Caller (登録商標) ソフトウェアを用いてグラフで報告されている。

30

【0301】

横軸上には、Tamra標識された塩基のmP値が示されており、縦軸にはR110標識された塩基のmP値が示されている。強mP値により、この蛍光で標識された塩基が組み込まれていることを示し、そして反対に弱mP値により、この塩基の組み込み不在が明らかになる。

【0302】

様々な遺伝子型を有するヌクレオチド配列の類似群が最大で3つ得られて良い。

【0303】

Allele Caller (登録商標) ソフトウェアの使用により、一度様々な群の同定が行われれば、表の形態で、各個体を規定する遺伝子型を直接抽出することが可能になる。

40

【0304】

例えば、SNP g798cについて、アンチセンスにおいて読まれた対立遺伝子cは、センスにおいて読まれた対立遺伝子gに対応し、そして未熟IFN - 5タンパク質配列の位置49でシステイン (C) が存在することに関連し、それ故に、アンチセンスにおいて読まれた対立遺伝子gは、対応するタンパク質の配列のこの位置のセリン (S) に対応する、センスにおいて読まれた対立遺伝子cに対応するということを特定することは欠かせない。

【0305】

SNP a516g、c641g、g798cに関するミニシーケンシングの結果

ジェノタイピング方法の完了後、個々の個体集団の遺伝子型の特定を、本発明中で研究さ

50

れたSNPに関して上記のグラフを用いて行った。

【0306】

SNP a5 1 6 gに関して、その遺伝子型は試験される個体において理論上、ホモ接合体AAもしくはヘテロ接合体AGもしくはホモ接合体GGである。実際には、下に示したように、ホモ接合体遺伝子型GGはこの個体集団において検出されていない。

【0307】

SNP c6 4 1 gに関して、その遺伝子型は試験される個体において理論上、ホモ接合体CCもしくはヘテロ接合体CGもしくはホモ接合体GGである。実際には、下に示したように、ホモ接合体遺伝子型GGは、この個体集団において検出されていない。

【0308】

SNP g7 9 8 cに関して、その遺伝子型は試験される個体において理論上、ホモ接合体GG、もしくはヘテロ接合体GC遺伝子もしくはホモ接合体CCである。実際には、下に示したように、ヘテロ接合体CCは、この個体集団において検出されていない。

【0309】

個体集団において特定された遺伝子型の分布及び研究した3つのSNPに関する様々な対立遺伝子頻度の計算の結果を以下の表に記載している。

【表6】

系統集団		合計	g516g (Q28R)							
			f	(95% CI)	AA	%	AG	%	GG	%
アフリカ系アメリカ人	50	1, 1	(0, 3. 1)	46	97, 9	1	2, 1			47
アメリカインディアン	15			15	100					15
カリブ人	10			10	100					10
ヨーロッパ系白人	99	1, 5	(0, 3. 2)	95	96, 9	3	3, 1			98
メキシコ人	10			7	100					7
非ヨーロッパ系白人	37			35	100					35
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)	254	98, 4	4	1, 6			258

系統集団		合計	c641g (Q70E)							
			f	(95% CI)	CC	%	CG	%	GG	%
アフリカ系アメリカ人	50	5, 1	(0. 7, 9. 5)	44	89, 8	5	10, 2			49
アメリカインディアン	15			15	100					15
カリブ人	10			9	100					9
ヨーロッパ系白人	99			94	100					94
メキシコ人	10			9	100					9
非ヨーロッパ系白人	37			37	100					37
北東アジア人	20			19	100					19
南アメリカ人	10			10	100					10
東南アジア人	17	3, 3	(0, 9. 8)	14	93, 3	1	6, 7			15
合計	268	1, 2	(0. 2, 2. 1)	251	97, 7	6	2, 3			257

系統集団		合計	g798c (C122S)								
			f	(95% CI)	GG	%	GC	%	CC	%	合計
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		5, 0	(0, 14. 6)	9	90, 0	1	10, 0			10
ヨーロッパ系白人	99		0, 5	(0, 1. 5)	98	99, 0	1	1, 0			99
メキシコ人	10		5, 0	(0, 14. 6)	9	90, 0	1	10, 0			10
非ヨーロッパ系白人	37				36	100					36
北東アジア人	20				20	100					20
南アメリカ人	10		5, 0	(0, 14. 6)	9	90, 0	1	10, 0			10
東南アジア人	17				17	100					17
合計	268		0, 7	(0, 1. 5)	263	98, 5	4	1, 5			267

【 0 3 1 0 】

先の表では、

- Nは、個体数を示し、
- %は、特異的分集団における個体の百分率を示し
- 対立遺伝子頻度は、特異的分集団における突然変異対立遺伝子の百分率を示し、
- 95% CIは、95%信頼性での最小及び最大インターバル

である。

10

20

30

40

50

【0311】

系統集団、及びSNPによってこれらの結果を検証することで、以下のことを確認した。

- SNP a5 1 6 gについて、4人のヘテロ接合体AG個体は、分集団の、アフリカ系アメリカ人及びヨーロッパ系白人に由来する
- SNP c6 4 1 gについて、6人のヘテロ接合体CG個体は、分集団の、アフリカ系アメリカ人及び東南アジア人に由来する
- SNP g7 9 8 cについて、4人のヘテロ接合体GC個体は、分集団の、カリブ人及びヨーロッパ系白人、メキシコ人及び南アメリカ人に由来する

【0312】

実施例3．天然野生型IFN - 5及びC1 2 2 S突然変異IFN - 5の酵母における発現

10

a) 天然野生型IFN - 5及びC1 2 2 S突然変異IFN - 5の真核発現ベクターpZip - to po中へのクローニング

天然野生型IFN - 5及びC1 2 2 S突然変異IFN - 5の成熟部分をコードするためのヌクレオチド配列を、SNPについてヘテロ接合体である個体からのゲノムDNAを鋳型として用いることでPCRによって増幅した。

【0313】

かかる増幅を可能にするPCRプライマーは：

【化3】

配列番号11：センスプライマー：TGTGATCTGCCTCAGACCCAC

20

配列番号12：アンチセンスプライマー：TCATTGCTTCCTCCTTAATCTTTCTTG

である。

【0314】

PCR産物を、真核発現ベクターpZipZ - TOP0 (TOP0 (登録商標) - cloning; Invitrogen Corp.) 中に、メタノールにより誘導可能なハイブリッドプロモーターA0X1の制御下で挿入した。

【0315】

30

このベクターにより、酵母ピチアパストリス (Pichia pastoris) 中での真核生物タンパク質のヘテロ接合体発現が可能になる。

【0316】

組換えタンパク質をコードするためのベクター領域のヌクレオチド配列を調べた後、当該ベクターをPme1制限酵素によって直線状にした。そしてP.パストリス (pastoris) 酵母系統 (Invitrogen) をこれらの組換え発現ベクターで形質転換させた。

【0317】

b) P.パストリスにおけるヘテロ接合体発現及び天然野生型IFN - 5及びC1 2 2 S突然変異IFN - 5タンパク質の精製

天然野生型IFN - 5をコードするため又はC1 2 2 S突然変異IFN - 5をコードするためのクローンを含む50 mLのBMGY培地 (2%のペプトン、1%のイーストエクストラクト、1.34%のYNB、1%のグリセロール、100 mMのリン酸カリウム、0.4 mg/lのビオチンを含むpH 6.0) により、2つの飽和事前培養物を、30 で24 ~ 48時間に渡り200回転/分 (rpm) で動揺しながら行った。

40

【0318】

培地が飽和細胞密度 (600 nmの波長で測定した光学密度1.2に対応する) に到達した場合、それを、5 OD/mLで、250 mLのBMMY培地 (2%のペプトン、1%のイーストエクストラクト、1.34%のYNB、0.5%のメタノール、100 mMのリン酸カリウム、0.4 mg/lのビオチンを含むpH 6.0) に接種するために用いた。

【0319】

50

次いで、30 で24時間に渡り、培養フラスコ中180 rpmの動揺をしながら、最終濃度1%のメタノールによってタンパク質の発現を誘導した。

【0320】

コーディング配列上流の、「因子」のシグナルペプチド配列が存在することにより、タンパク質は、酵母によって培養培地中に分泌される。前記因子は、天然に、プロセッシング中に解裂する。

【0321】

懸濁を遠心して、得られた上清から出発してタンパク質をHPLCによって精製した。

【0322】

開始前段階において、超遠心 (Labscale カットオフ5000 Da、Millipore)、しかる後の透析により、10倍濃度の酵母上清が50 mMのトリスCl、pH9.0、25mMのNaClのバッファ中で可能になる。

【0323】

最初のクロマトグラフィーによる段階で、青セファロースカラム (Amersham Pharmacia) 上での親和性によりタンパク質回収が可能になる。その一方、SDS PAGE型の電気泳動、及びIFN- γ タンパク質に対して向けられた特異的抗体による免疫検出により、回収された画分中でのタンパク質の存在が確認される。この段階で、注目のタンパク質の純度は75%超である。

【0324】

第2の精製段階で、ゲルろ過により、50 mMのトリス、pH9.0、25 mMのNaClに対して、IFN- γ タンパク質に対応する回集された画分のバッファ交換が可能になる。

【0325】

精製の最後の段階は、イオン交換クロマトグラフィーカラム上でタンパク質を分離することから成る。

【0326】

組換えタンパク質を含む画分を、トリス50 mM、pH9、NaCl25 mMバッファで予め平衡化した陰イオン交換カラムに注入する。タンパク質の溶出を、勾配 (トリス50 mM、pH9 バッファ中、0.025 ~ 1 MのNaCl) の移動により行う。

【0327】

注目のタンパク質の純度をSDS / PAGEゲル上で計算し且つタンパク質濃度をデンストメトリ (Quantity one、Biorad) 及びBCAアッセイ (ビシンコニン酸及び硫酸銅、Sigma) によって測定する。

【0328】

精製された、天然野生型IFN- γ 及びC122S突然変異IFN- γ タンパク質をこのプロトコル (いずれ、より多くの量のタンパク質を得るのにスケールアップされる) により得、それらを下記の機能試験のために用いる。

【0329】

実施例4. 野生型及びC122S突然変異IFN- γ の、乳ガン細胞系統MCF-7中でのシグナル伝達を活性化する能力の評価

インターフェロンは、JAK (Janus Kinase) 及びSTAT (Signal Transducer and Activators of Transcription) タンパク質を伴うシグナル経路を介して作用することが分かっている。インターフェロンがそのレセプターに対して結合することでJAKタンパク質のリン酸化が誘導され、そして順番にリン酸化によってSTATタンパク質が活性化される。活性化されたSTATタンパク質は核に移り、遺伝子のプロモーター上のインターフェロン応答エレメントに対して結合し、これにより各遺伝子の転写が刺激される。インターフェロンによって開始されるシグナル経路を調べるために、レポーター遺伝子技術を用いた。手順を以下に記載している。

【0330】

乳ガン細胞MCF-7 (ECACC) を24時間に渡り、10%ウシ胎児血清を補足したRPMIの96ウェルプレートにおいて、 1×10^4 細胞/ウェルの密度で播いた。次いで、細胞を6

時間に渡り、製造説明書により Superfect (Qiagen) を用いて、インターフェロン刺激化応答エレメント (Clontech) の制御下に置かれた Firefly Luciferase をコードするレポーター遺伝子構築体 (pISRE-Luc) でトランスフェクトした。その後、培養培地を交換しそして細胞を CO_2 インキュベーター中 37 でインキュベートし、その後、それらを様々な量の野生型又は突然変異 INF - 5 タンパク質で 37、6 時間に渡り刺激を加えた。刺激化の後、培養培地を捨て 100 μl / ウェルのリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) / 1mM MgCl_2 と換えた。ルシフェラーゼ活性を、100 μl / ウェルの基質 LucLite-Plus (Packard) を添加後に MicroBeta カウンターで測定した。

【0331】

結果は、ルシフェラーゼ活性最大刺激の % として表されている。野生型 INF - 5 又は C122S 突然変異 INF - 5 のシグナル伝達経路を始動させる能力とは、それらの、それぞれルシフェラーゼ活性を (最大の刺激化を 100 % 活性とした場合) 50 % 刺激する個々の濃度に対応する、50 % (EC50 の) 有効用量を測定することに基づいている。

【0332】

野生型 INF - 5 について測定された平均 EC50 値は、5.67 pM である。

【0333】

C122S 突然変異 INF - 5 について測定された平均 EC50 値は、93.27 pM である。

【0334】

従って、野生型タンパク質の EC50 値に対する、突然変異型タンパク質の EC50 値の対応する比率は (標準偏差 7.63 で) 18.32 pM に至る。

【0335】

従って、この試験により、C122S 突然変異 INF - 5 の生物活性は、乳ガン細胞系統 MCF-7 中でインターフェロンシグナル経路を活性化するその能力に基づいて、野生型のものに比べて 10 ~ 25 倍低いことが示された。

【0336】

実施例 5 . C122S 突然変異 INF - 5 の免疫調節活性の評価

I 型の INF (INF 及び INF) は免疫系の所定の機能を調節できる。それらは：樹状細胞 (DC) の成熟を促すこと、即ち、MHC クラス I 型 (HLA-ABC) 及び II 型 (HLA-DR) 分子の発現を促すこと、T リンパ球、CD80、CD60 及び CD83 分子の共刺激に関わる分子の発現を増加させること並びに T リンパ球の刺激機能を促すことが示されている。

【0337】

a) C122S 突然変異 INF - 5 の樹状細胞の成熟に対する効果

C122S 突然変異 INF - 5 の免疫調節活性を最初に樹状細胞の成熟により調べ、そして代表的な市販のイントロン A 産物として選択した野生型 INF - 5 又は野生型 INF - 2 のものと比較した。

【0338】

そのようにするために、樹状細胞を最初に、GM-CSF 及び IL-4 サイトカインの存在下で培養した成熟末梢血単球から生成した。CD14⁺ 細胞生成キットを用いて精製した後、これらの樹状細胞を、100 ng/mL の C122S 突然変異 INF - 5、野生型 INF - 2 又は野生型 INF - 5 存在下に置き、そして、それらの遺伝子型をマーカーとして MHC クラス I 及び II 分子並びに CD40、CD80、CD86、CD83 及び CD1 の発現を調べるための目的の FACS 解析によって決定した。これら樹状細胞の成熟の状態を、刺激されていない樹状細胞との対照実験を供するために、INF 処理をせずに獲得したのとも比較した。

【0339】

各マーカー及び 4 つの実験条件について測定した蛍光強度の中央値 (任意の単位で示した) を下の表に示している。

【表 7】

	HLA ABC	HLA DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD1a
IFN α ナシ	64	133	24	25	14	15	26
C122S IFN α -5	136	217	621	132	58	16	113
野生型 IFN α -2	87	281	331	76	45	15	155
野生型 IFN α -5	117	158	72	27	14	16	98

10

【 0 3 4 0 】

この試験の結果により、C122S突然変異IFN α -5タンパク質は、樹状細胞成熟を刺激する高い能力を有することが示された。詳細には、C122S突然変異IFN α -5による樹状細胞の成熟の刺激は、野生型IFN α -5及び野生型IFN α -2のものよりも高い。

【 0 3 4 1 】

b) C122S突然変異IFN α -5の、Tリンパ球によるサイトカイン放出に対する効果
C122S突然変異IFN α -5の免疫調節活性を、攻撃に対する免疫応答を模擬するために突然変異IFN α -5タンパク質存在及び強抗原(SEB)有無の存在下に置かれた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も調べた。試験を、コントロールとして用いられ且つ代表的なイントロンA市販製品として選定される野生型IFN α -2の存在下でも行った。

20

【 0 3 4 2 】

そのようにするために、末梢血単核細胞(PBMC)を健常な供与者から単離して16時間に渡り、抗CD3及び抗CD28抗体又はSEBを含む適切な培地中で刺激した。各培養では、4 μ g/mLのC122S突然変異IFN α -5又は野生型IFN α -2を添加した。刺激後、Tリンパ球を抗CD3、抗CD4、抗CD69抗体又は抗CD3、抗CD8及び抗CD69抗体で細胞外標識し、そしてTh1型のサイトカイン(IFN γ)又はTh2型のサイトカイン(IL-10)に対して向けられた特異的な抗体で細胞内標識をした。蛍光を発する細胞を、FACS Calibur及びCellQuestソフトウェアを用いて分析した。

30

【 0 3 4 3 】

得られた結果により、C122S突然変異IFN α -5及び野生型IFN α -2はIL-10及びINF γ の放出を刺激することではなく、そしてそれ故にSEBの不在下ではTリンパ球を活性化しないことが示された。その一方で、以下に示すように、C122S突然変異IFN α -5及び野生型IFN α -2タンパク質は、SEB活性化されたTリンパ球によるサイトカイン(IL-10及びIFN γ)放出を刺激する。この表は、SEBの存在下でリンパ球によるサイトカイン放出(CD4 $^{+}$ 、CD69 $^{+}$ 細胞又はCD8 $^{+}$ 、CD69 $^{+}$ 細胞のCD4 $^{+}$ Tリンパ球及びCD8 $^{+}$ Tリンパ球のそれぞれに対する%、並びに総細胞に対するCD69細胞の%として表した)を示す。

40

【 表 8 】

リンパ球		IFN γ	IL-10	CD69+細胞/合計
CD4 ⁺ CD69 ⁺	IFN α ナシ	11.9	7.5	1.26
	C122S IFN α -5	31.48	26.64	3.36
	野生型 IFN α -2	19.6	24.68	2.7
CD8 ⁺ CD69 ⁺	IFN α ナシ	8.73	0.65	4.69
	C122S IFN α -5	24.11	6.98	10.5
	野生型 IFN α -2	16.37	4.26	10.02

10

【0344】

これらの結果により、明らかに、C122S突然変異IFN α -5が、予めSEB抗原によって活性化されたCD4⁺Tリンパ球及び、CD8⁺Tリンパ球によるサイトカイン（IFN γ 及びIL-10）の放出を刺激することが示された。詳細には、CD4⁺又はCD8⁺Tリンパ球によるインターフェロンの生産は、C122S突然変異IFN α -5の存在下でのほうが野生型IFN α -2の存在下でよりも高い。

【0345】

c) C122S突然変異IFN α -5の、単球によるサイトカイン放出に対する効果
最後に、C122S突然変異IFN α -5の免疫調節効果を、細菌毒素（LPS）の存在下又は不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調べた。この試験はコントロールとして用い且つ代表的なイントロンA市販製品として選択された野生型IFN α -2の存在下でも行った。

20

【0346】

そのようにするために、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を健常な供与者から単離してそれらの遺伝子型を分析し、CD64⁺、CD4⁺dim細胞の総対量を測定した（CD64及びCD4dimは血液単球のためのマーカーである）。一晚培養した後、これらのPBMCを培地中単独（刺激された細胞はなく）で又はLPS（刺激された細胞）の存在下でインキュベートした。各培用では4 μ g/mLのC122S突然変異IFN α -5又は野生型IFN α -2を添加した。培養後、細胞を抗CD64及び抗CD4dimで細胞外標識し、そしてTh1型のサイトカイン（TNF α 、IL-12及びIL-10に対して向けられた特異的抗体で細胞内標識をした。

30

【0347】

蛍光を発する細胞を、FACScalibur及びCellQuestソフトウェアを用いて分析した。

【0348】

得られた結果により、C122S突然変異IFN α -5及び野生型IFN α -2は、LPSの不在下ではサイトカイン（IL-10、IL-12及びTNF α ）の放出を刺激することはないことが示された。

【0349】

その一方で、LPSの存在下では、単球はサイトカイン（IL-10、IL-12及びTNF α ）放出し、この放出は更に、以下の表に示すように、C122S突然変異IFN α -5タンパク質又は野生型IFN α -2タンパク質の存在下で増加した。この表は、LPSの存在下での単球によるサイトカイン放出（総細胞に対するCD64⁺CD4dim細胞の%、及びCD4dimCD64⁺細胞の%として表した）を示す。

40

【表9】

	IL-10	IL-12	TNF- α	CD4dim CD64 ⁺ 細胞/合計
IFN α ナシ	16.21	8.52	13.88	3.1
C122S IFN α -5	72.51	27.76	66.67	3
野生型IFN α -2	49.34	34.48	50.87	2.71

【0350】

10

これらの結果により、LPSの存在下では、C122S突然変異IFN α -5タンパク質が単球によるサイトカイン（IFN α 及びIL-10）の放出を刺激できることが示された。詳細には、単球によるIL-10及びTNF- α 放出の刺激は、C122S突然変異IFN α -5の存在下でのほうが野生型IFN α -2の存在下でよりも高い。

【0351】

実施例6.C122S突然変異IFN α -5のin vitro抗増殖活性の評価

a) ヒトリンパ腫のDaudi Burkitt細胞系統に対して

これらの試験をことなる2つのIFN α -5型、即ち、C122S突然変異IFN α -5及び野生型IFN α -5により行った。予めRPMI1640培地（10%ウシ胎児血清及び2mMのL-グルタミンを補足した）中で培養した細胞（ヒトDaudi Burkittリンパ腫細胞系統、本明細書中では以降「Daudi細胞」と呼ぶ）を96ウェルプレートに細胞密度 4×10^4 細胞/ウェルで播いた。

20

【0352】

各ウェルでは、Daudi細胞を、0.003pM~600nMの範囲で濃度を増加する天然野生型IFN α -5又は突然変異IFN α -5のどちらかと接触するよう置いた。

【0353】

3回繰り返した3つ以上の実験を両方のタンパク質及び各濃度について行った。

【0354】

次いで、Daudi細胞を37℃で66時間に渡り5%CO₂下でインキュベートし、その後、Uptiblu試薬（Uptima）を培養物に添加した。増殖の速度を、更なる4時間のインキュベーション後に、590nmで放射された蛍光（560nmで励起する）を測定することによって定量した。

30

【0355】

C122S突然変異IFN α -5又は野生型IFN α -5の抗増殖活性は、細胞の増殖を50%阻害するIFN α -5の濃度に対応するIC50を測定することに基づいている。

【0356】

C122S突然変異IFN α -5に関して測定した平均IC50値が93.27である一方で、野生型IFN α -5に関する測定した平均IC50値は5.67である。従って、天然野生型タンパク質のIC50値に対する、突然変異型タンパク質のIC50値に対応する平均比率は、18.32（標準偏差7.63）に至る。

40

【0357】

この試験により、C122S突然変異IFN α -5タンパク質は、Daudi細胞増殖を阻害するということが示された。更に、細胞抗増殖活性は、C122S突然変異IFN α -5の場合、野生型IFN α -5に比べて大いに減少している。

【0358】

b) TF-1赤白血病細胞系統に対して

C122S突然変異IFN α -5の効果をTF-1赤白血病細胞系統に対しても評価した。この試験は、コントロールとして用い且つ代表的なイントロンA市販製品として選択された野生型IFN α -2の存在下でも行った。

【0359】

50

そのようにするために、C1 2 2 S突然変異IFN - 5又は野生型IFN - 2 (0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 0 ng/mLの範囲で濃度が増加する)と接触するよう置いて細胞の増殖を測定した。

【0360】

この実験を3回繰り返し、そして代表的な実験の結果を図3に示している。

【0361】

これらのデータにより、C1 2 2 S突然変異IFN - 5はTF - 1に対して弱い抗増殖活性を有することが示される。特に、C1 2 2 S突然変異IFN - 5の抗増殖活性効果は、野生型IFN - 2より劣っており、C1 2 2 S突然変異IFN - 5の血液毒性が野生型IFN - 2よりも優れていないことを示唆する。

【0362】

10

実施例7 . C1 2 2 S突然変異IFN - 5の抗ウイルス活性の評価

IFNは抗ウイルス防御において重要な役割を果たす。IFN抗ウイルス活性は一部IFNが誘導した酵素系に起因する。それは、例えば：

- アデノシンオリゴマー合成を触媒する酵素である2' 5'オリゴアデニル化シンセターゼ。これらのオリゴマーは、一度活性化するとウイルスRNAを破壊するエンドリボヌクレアーゼであるRNaseLを活性化する。

- ウィルス転写産物の合成及び/又は突然変異を阻害するMxタンパク質 (GTPase)。この活性は主にインフルエンザウィルスに対して発揮される。

- 二本鎖化したRNAによって活性化されるPKRタンパク質 (又はp68キナーゼ)。活性化されたPKRはタンパク質合成を阻害する。

20

【0363】

IFNの抗ウイルス活性は他の機構によっても誘導される。それは例えば、レトロウィルスの場合、ウィルス粒子が細胞内へ侵入すること、複製、結合、粒子の射出及びウィルス粒子の感染性を阻害することである。

【0364】

最後に、IFNは、免疫系の所定の機能を調節することによって、詳細には、(特に、MHCクラスI及びII型の分子を増加させること、IL - 12及びIFN 生産を高めること、CTL活性の向上など)細胞が介在する反応によって、間接的に抗ウイルス活性を発揮する。

【0365】

C1 2 2 S突然変異IFN - 5の抗ウイルス活性を培養細胞におけるin vitro及びマウスモデルにおけるin vivoの両方で評価した。両方の試験を、コントロールとして用い且つ代表的なイントロンA市販製品として選択された野生型INF - 2を用いて平行して行った。

30

【0366】

a)培養細胞におけるin vitro抗ウイルス活性

このアッセイにより、水泡性口内炎ウィルス (VSV) を用い培養細胞におけるC1 2 2 S突然変異IFN - 5の抗ウイルス活性の評価、そして野生型IFN - 2又は野生型IFN - 5との比較が可能になる。

【0367】

そのようにするために、WISHヒト上皮細胞を、濃度を下げるC1 2 2 S突然変異IFN - 5、野生型IFN - 5又は野生型IFN - 2の存在下で24時間に渡り培養した。次いで、細胞を、水泡性口内炎ウィルス (VSV) によって24 ~ 48時間に渡りインフェクションして細胞の溶解を測定した。

40

【0368】

試験された異なるIFN の抗ウイルス効果を、細胞のVSVによって誘導される溶解を50%阻害するIFNの濃度に対応するIC50値を比較することによって測定した。

【0369】

類似の実験を3回行って、代表的な実験の1つにおいて測定されたIC50値を下の表に示している。

【表10】

	C122S IFN α -5	野生型IFN α -5	野生型IFN α -2
IC50 (ng/mL)	17	5.5	4

【0370】

この実験の結果により、C122S突然変異IFN α -5タンパク質は、培養細胞でin vitro抗ウイルス活性を有することが示された。更に、VSVでインフェクトされた培養細胞において、C122S突然変異IFN α -5は、野生型IFN α -5又は野生型IFN α -2よりも低い抗ウイルス活性を有する。

10

【0371】

b)マウスモデルでのin vivo抗ウイルス活性

このin vivo試験をEMCV (Encephalomyocarditis virus) マウスモデルで行っている。

【0372】

ヒトIFNは前記マウスにおいて用量依存性抗ウイルス活性を示す。一般にそれは、同量のマウスIFNによって示されるよりも100～1000倍低い (Meisterら (1986)、J. Gen. Virol. 67; pp. 1633～1644)。

【0373】

マウスへの脳心筋炎ウイルス (EMCV) の腹腔内注射により、中枢神経系が巻き込まれ且つ脳障害 (encephalitis) を特徴とする急速に進行する致死性疾患が生じる (Finter NB (1973)、Front Biol. 2; pp. 295～360)。マウス及びヒトのインターフェロンはどちらも、致死EMCV感染に対してマウスを保護することにおいて有効であることが示されている (Tovey及びMaury (1999)、J. IFN Cytokine Res. 19; pp. 145～155)。

20

【0374】

群中20匹の、6週齢Swissマウスの腹腔内に100×LD₅₀ EMCVをインフェクトしそして1時間後に2µgのC122S突然変異IFN α -5又は野生型IFN α -2調製物で処理し、その後3日に渡り1日に1回処理した。コントロールの群は賦形剤でのみ処理したもので行った。動物はその後日21日に渡り延命された。

30

【0375】

結果を図4に示しており、そしてC122S突然変異IFN α -5で処理されたマウスの相対生存率は、無処理マウスの生存率よりもかなり高いことが示されており、これはC122S突然変異IFN α -5のマウスモデルにおけるin vivoでの抗ウイルス活性を示している。更に、C122S突然変異IFN α -5のマウスモデルにおけるin vivo抗ウイルス活性は、野生型IFN α -2で処理したマウスについて確認されたものと類似している。

【0376】

実施例8．悪性Friend赤白血病細胞を予め接種したマウスにおけるC122S突然変異IFN α -5の抗腫瘍活性の評価

IFN α は、IFN感受性親Friend白血病細胞に対するのと同じように、IFN α の直接抗増殖活性に対して耐性のFriend白血病細胞のクローン増殖に対してマウスを保護することにおいて有効であること (Belardelliら、Int. J. Cancer, 30, pp. 813～820, 1982; Belardelliら、Int. J. Cancer, 30, pp. 821～825, 1982) が示されており、これはIFN α の抗腫瘍活性における間接免疫介在機構の重要性を反映する。

40

【0377】

以下の実験により、C122S突然変異IFN α -5の、予めFriend赤白血病細胞を接種されたマウスにおける抗腫瘍活性の評価が可能になり、そして体表的な市販のイントロンA製品として選択した野生型IFN α -2の抗腫瘍活性との比較が可能になる。

【0378】

そのようにするために、群中12匹の6週齢DBA/2マウスの腹腔内に100,000個

50

のIFN耐性Friend赤白血病細胞(3C18)(20,000LD₅₀)を接種し、そして1時間後、2μgの野生型IFN-2もしくは2μgのC122S突然変異IFN-5もしくは等体積の賦形剤のみで処理し、その後21日に渡り1日に1回処理した。動物はその後毎日生き続け、そして賦形剤でのみ処理した群との比較において各処理群の一次効果測定値(primary efficacy measure)を40日での生存率として、そして一次効果分析値(primary efficacy analysis)を各処理群の40日での相対生存率として規定した。

【0379】

この実験の、図5に示した結果により、明らかに、IFNで処理しなかったマウスに比較して、C122S突然変異IFN-5でマウスを処理することで、非常に悪性のFriend赤白血病細胞(FLC)を接種した後に生存するマウスの数の増加がもたらされることが示される。詳細には、FLCを接種されたマウスの生存率の増加は、野生型IFN-2で処理した後よりもC122S突然変異IFN-5により処理した後の方が高い。

10

【0380】

これら全ての結果から、C122S突然変異IFN-5は固有の生物学的特性を有することが示される。

【図面の簡単な説明】

【0381】

【図1】図1Aは、SNP Q47Eを含んで成る本発明のコードされたタンパク質、及び天然野生型IFN-5タンパク質のモデルを示す。図1Bは、図1Aで示された各タンパク質の、よりすぐれた部分のモデルの拡大を示している。図1A及び図1Bにおいて、黒のリボンは天然野生型IFN-5タンパク質の構造を示し、そして白のリボンはQ47E突然変異IFN-5タンパク質の構造を示す。

20

【図2】図2Aは、本発明のSNP C99Sを含んで成るコードされたタンパク質、及び天然野生型IFN-5タンパク質のモデルを示す。図2Bは、図2Aで示された各タンパク質の、よりすぐれた部分のモデルの拡大を示している。図2A及び図2Bにおいて、黒のリボンは天然野生型IFN-5タンパク質の構造を示し、そして白のリボンはC99S突然変異IFN-5タンパク質の構造を示す。

【図3】C122S突然変異IFN-5のTF-1細胞系統に対する抗増殖効果を測定するための試験の結果を示す。この図において、横軸は、IFNの濃度(ng/mL)に対応し、そして縦軸は、細胞増殖の阻害率(%)に対応する。C122S突然変異IFN-5の抗増殖効果(黒菱形)を、野生型のもの(白四角)と比べている。

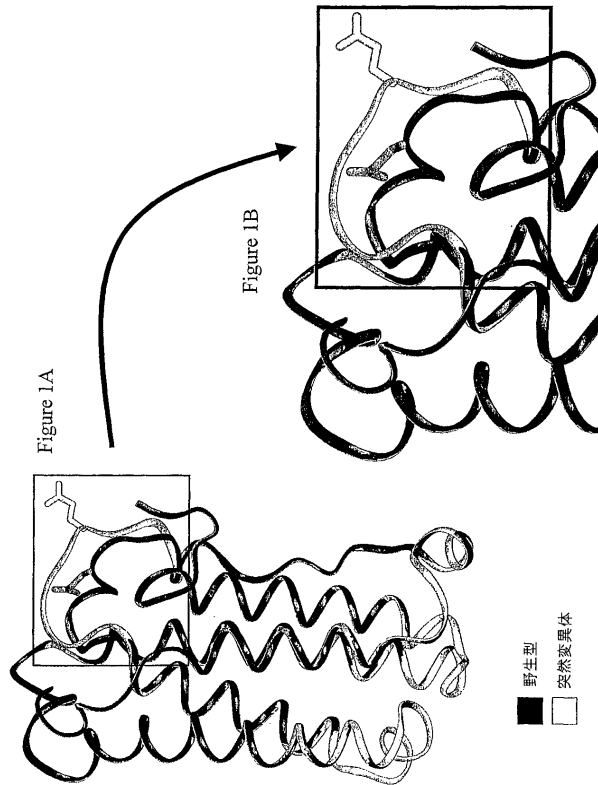
30

【図4】予めVSVウィルスに感染してC122S突然変異IFN-5タンパク質で処理されたマウスの生存率を、野生型IFN-2、又は処理していないものとの比較で示す。この図において、横軸は生存時間(日)に対応し、そして縦軸はVSVに感染したマウスの相対生存率に対応する。黒四角はC122S突然変異IFN-2で処理したVSV感染マウスに関するデータを示し、そして白抜き三角は何も処理をしなかったVSV感染マウスに関するデータを示している。

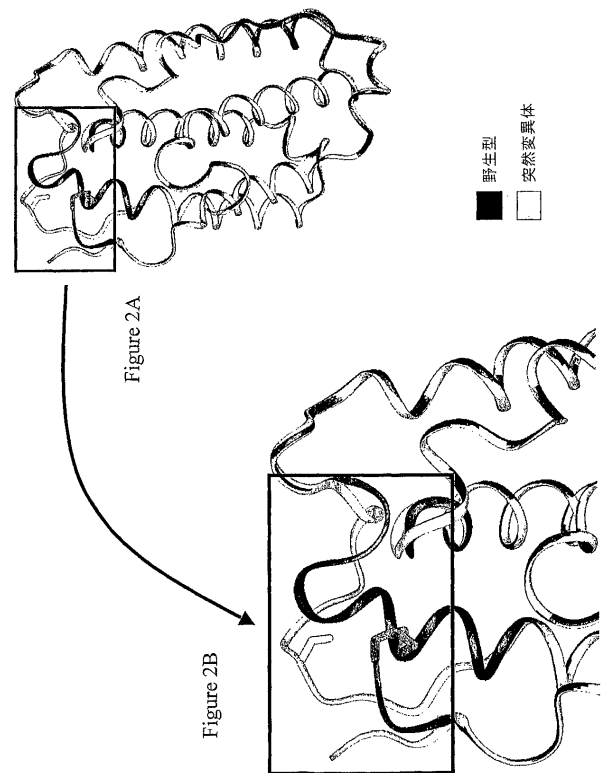
【図5】予め悪性Friend赤白血病細胞(FLC)を接種され、そしてC122S突然変異IFN-5タンパク質で処理されたマウスの生存率を、野生型IFN-2で処理されたもの、又は処理していないものとの比較で示す。この図において、横軸は生存時間(日)に対応し、そして縦軸はFLCを接種したマウスの相対生存率に対応する。黒菱形はC122S突然変異IFN-5で処理したFLC接種マウスに関するデータを示す。黒四角は野生型IFN-2で処理したFLC接種マウスに関するデータを示し、そして白抜き三角は何も処理しなかったFLC接種マウスに関するデータを示している。

40

【 図 1 】

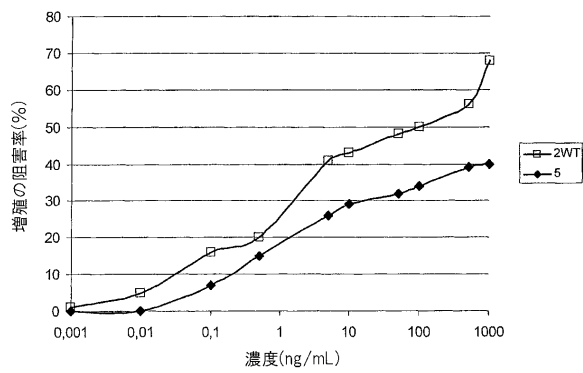


【 図 2 】



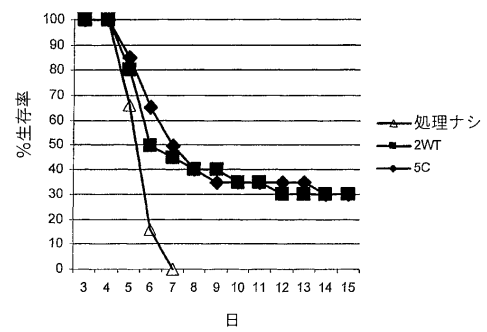
【 図 3 】

Figure 3



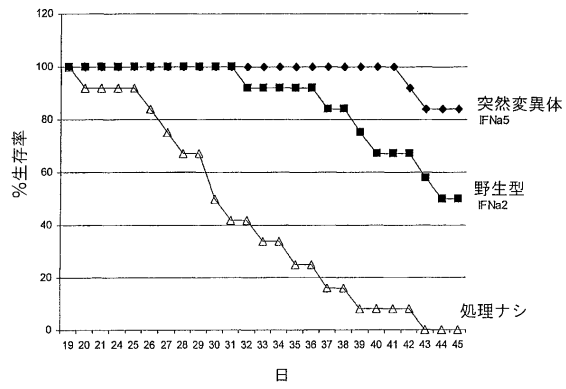
【 図 4 】

Figure 4



【図 5】

Figure 5



【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
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000896 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/19,
C12Q 1/68, C12N 15/63, C12P 21/02, 21/08, G01N 33/68,
A61K 38/21, 48/00, 39/395, A61P 3/00, 35/00, 17/00,
19/00, 25/00, 37/00

(21) International Application Number: PCT/EP02/05458

(22) International Filing Date: 2 May 2002 (02.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 01/05919 3 May 2001 (03.05.2001) FR

(81) Designated States (*national*): AU, AG, AI, 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, 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,
KR, 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).(71) Applicant (*for all designated States except US*): GEN-
ODYSSEE (FR/FR); Parc d'Affaires Technopolis, 3, av-
enue du Canada, Bat. Alpha, Boîte postale 810, Les Ulis,
F-91974 Courcouronnes (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: RINU, Santarelli; 14, avenue de la Grande Ar-
mée, Boîte postale 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/000896 A2

(54) Title: NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN α 5 GENE(57) Abstract: The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide sequence of the IFN α 5 gene com-
prising new SNPs, and new polypeptides derived from the natural wild-type IFN α 5 protein comprising at least one mutation caused
by at least one SNP of the invention as well as their therapeutic uses.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN α -5 GENE

RELATED APPLICATIONS:

The present invention claims priority to French Patent Application 0105919 filed on
5 May 03, 2001 titled << Nouveaux polynucléotides et polypeptides de l'IFN alpha 5 >>.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention.

The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide
10 sequence of the IFN α -5 gene comprising new SNPs, and new polypeptides derived from the
natural wild-type IFN α -5 protein comprising mutations caused by these SNPs, as well as
their therapeutic uses.

Related Art.

15 The interferon alpha 5 gene, hereinafter referred to as IFN α -5, is described in the
publication of K. Henco et al. "Structural relationship of human interferon alpha genes and
pseudogenes"; J. Mol. Biol.; 185 (2); 227-260; (1985).

The nucleotide sequence of this gene is accessible in the GenBank database under
accession number X02956.

20 The IFN α are known for their cellular antiproliferative effects and their involvements
in antiviral and antiparasitic responses.

The IFN α 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.

25 The IFN α 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.

30 The IFN α 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

2

It is known that the IFN α 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 α 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 α are also effective against other types of tumors and against certain viral infections.

The IFN α are also recognized by the FDA (Food and Drug Administration) for the treatment of genital warts or venereal diseases.

However, the IFN α , and in particular IFN α -5, have numerous side effects when they are used in pharmaceutical compositions, such as reactions of acute hypersensitivity (urticaria, bronchoconstriction, anaphylactic shock etc.), cardiac arrhythmias, low blood pressure, epileptic seizures, problems with thyroid functions, flu-like syndromes (fevers, sweats, myalgias) etc.

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

The inventors have found new polypeptide and new polynucleotide analogs to the IFN α -5 gene capable of having a different functionality from the natural wild-type IFN α -5 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.

30

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

3

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 α -5 gene, in that it comprises one or several SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

5 The nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the human reference wild-type IFN α -5 gene is composed of 1475 nucleotides and comprises a coding sequence of 570 nucleotides, from nucleotide 434 (start codon) to nucleotide 1003 (stop codon).

The applicant has identified 11 SNPs in the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN α -6 gene. These 11 SNPs are the following: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c,
10 g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a.

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,
15 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 c42t corresponds to a mutation of the nucleotide cytosine (c) at position 42 of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the reference wild-type IFN α -
20 5 gene, into nucleotide thymine (t).

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
25 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
30 IFN α -5 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

4

IFN α -5 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 α -5 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 α -5 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: a516g, c641g, g798c, causes modifications, at the level of the amino acid sequence, of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN α -5 gene.

These modifications in the amino acid sequence are the following:

The SNP a516g causes a mutation of the amino acid glutamine (Q) at position 28 in the immature protein of the IFN α -5 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in arginine (R) and at position 5 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP either Q5R or Q28R according to whether one refers to the mature protein or to the immature protein respectively.

The SNP c641g causes a mutation of the amino acid glutamine (Q) at position 70 in the immature protein of the IFN α -5 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in glutamic acid (E) and at position 47 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP Q47E or Q70E according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNP g798c causes a mutation of the amino acid cysteine (C) at position 122 in the immature protein of the IFN α -5 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in serine (S) and at position 99 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP C99S or C122S according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

The SNPs a516g, c641g, g798c 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 α -5 gene.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

5

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 *de novo* (for example, SEQFOLD/MSI), homology (for example, MODELER/MSI), minimization of the force field (for example, DISCOVER, 5 DELPHI/MSI) and/or molecular dynamics (for example, CFF/MSI).

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

Computational molecular modeling shows that the mutation Q5R on the mature mutated protein causes a local change in the structure of the N-terminal part of the IFN α -5 protein, which is attenuated by the disulfide bridge of Cys1 residue that maintains the three- 10 dimensional conformation of this segment.

However, it is important to note that the N-terminal domain of IFN α before helix A is highly conserved. Furthermore, Shafferman *et al.* (In: Journal of Biological Chemistry (1987) 262:6227-6237) and Hu *et al.* (In: Journal of Immunology (2001) 167: 1482-1489) showed that this part of the protein is involved in the activity of IFN α .

15 Thus, the Q5R mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN α -5 protein involving a moderate change in its structure and a significant change in its activity and function due to the gain of charge from a glutamine (polar) to an arginine (positively charged).

Computational molecular modeling shows that the mutation Q47E on the mature 20 protein causes the unfolding of the C-terminal part of the "AB" loop which is known to be involved in the binding of IFN α -5 to its receptor. This is represented in Figures 1A and 1B.

The glutamic acid residue of position 47 appears to play an important role in the formation of this loop, because it is retained in all interferons.

25 Thus, computational molecular modeling allows us to anticipate that the presence of the glutamic acid in position 47 will involve a significant change in the structure and function of the natural wild-type IFN α -5 protein.

Thus, the Q47E mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN α -5 protein involving a significant change in its structure and function, in particular at the level of IFN α -5 binding to its receptor.

30 Computational molecular modeling shows that the mutation C99S on the mature mutated protein results in the disappearance of a disulfide bridge which participates, in the natural wild-type IFN α -5 protein, in the three-dimensional conformation of the N-terminal part and the "CD" loop, between helices C and D. This is represented in Figures 2A and 2B.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

6

Mutation C99S makes the N-terminal loop (Cys1-Thr6) mobile. This results in unfolding of the end of helix C and disturbance of the "CD" loop.

It is also known that this disulfide bridge is retained in all alpha and beta interferons. The mutation C99S must therefore affect the binding of the mutated IFN α -5 protein to its
5 receptor due to the structure changes of both its N-terminal part and CD loop.

Thus, the C99S mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN α -5 protein involving a significant change in its structure and function, in particular at the level of IFN α -5 binding to its receptor.

Other SNPs in conformity with the invention, namely: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c,
10 t174c, g292c, and g1009a, do not involve modification of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN α -5 gene at the level of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2. The SNPs c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, and g1009a, are non-coding.

Genotyping of the polynucleotides in conformity with the invention can be carried out in such a fashion as to determine the allelic frequency of these polynucleotides in a
15 population. Examples of genotyping are given, hereinafter, in the experimental section.

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 T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, *in vitro* or *in*
20 *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 α -5, and/or with the wild-type IFN α -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.

30 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1A represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP Q47E and the natural wild-type IFN α -5 protein. Figure 1B represents a

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

7

close up of the model of the superior 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 α -5 protein and the white ribbon represents the structure of the Q47E mutated IFN α -5 protein.

Figure 2A represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP C99S and the natural wild-type IFN α -5 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 α -5 protein and the white ribbon represents the structure of the C99S mutated IFN α -5 protein.

Figure 3 represents the results of the test for measuring the antiproliferative effect of C122S mutated IFN α -5, on the TF-1 cell line. In this figure, the abscissas correspond to the concentration of IFN α (ng/mL) and the ordinates correspond to the inhibition of cell proliferation (%). The antiproliferative effect of the C122S mutated IFN α -5 (black diamonds) is compared to that of wild-type IFN α -2 (white squares).

Figure 4 represents the survival rate of mice previously infected by VSV virus and treated with C122S mutated IFN α -5 protein, in comparison to those treated with wild-type IFN α -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 C122S mutated IFN α -5. The black squares represent the data for VSV infected mice treated with wild-type IFN α -2, and the open triangles represent the data for VSV infected mice which have not been treated.

Figure 5 represents the survival rate of mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells (FLC) and treated with C122S mutated IFN α -5 protein, in comparison to those treated with wild-type IFN α -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 FLC inoculated mice. The black diamonds represent the data for FLC inoculated mice treated with C122S mutated IFN α -5. The black squares represent the data for FLC inoculated mice treated with wild-type IFN α -2, and the open triangles represent the data for FLC inoculated mice which have not been treated.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

8

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions.

5 "Nucleotide sequence of the reference wild-type gene" is understood as the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the human IFN α -5 gene.

This sequence is accessible in GenBank under Accession number X02956. Moreover, the human IFN α -5 gene is described in K. Henco et al. "Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes"; J. Mol. Biol.; 185 (2); 227-260; (1985).

10 "Natural wild-type IFN α -5 protein" or "wild-type IFN α -5 protein" is understood as the mature protein encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN α -5 gene. The natural wild-type immature protein IFN α -5 corresponds to the peptide sequence shown in SEQ ID NO. 2.

"Polynucleotide" is understood as a polyribonucleotide or a polydeoxyribonucleotide
15 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
20 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.

25 "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
30 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

9

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, 5 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 10 including 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, 2nd Ed., T. E. Creighton, New York, 1993, POST- 15 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.

20 "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.

25 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 30 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

10

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
5 100 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
10 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
15 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.

20 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.

25 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,
30 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

11

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
5 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.

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
10 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
15 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

20 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 434 to nucleotide 1003), it being understood that this nucleotide sequence comprises at least one of the
25 following coding SNPs a516g, c641g, g798c; 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:

- 30 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: a516g, c641g, g798c; or
- b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

12

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 comprises at least one of the following coding SNPs: a516g, c641g, g798c.

According to the invention, the polynucleotide previously defined comprises a single
5 coding SNP selected from the group consisting of: a516g, c641g, g798c.

More preferably, the polynucleotide previously defined comprises the SNP g798c.

A polynucleotide such as previously defined can equally include at least one of the following non-coding SNPs: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, and g1009a.

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

a) a nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following non coding SNPs: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, and g1009a; or

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

15 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: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, g1009a; or

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

20 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 has for its object an isolated polynucleotide coding for a polypeptide comprising:

25 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 each of the amino acid sequences under a) and b) comprises at least one of the following coding SNPs: Q28R, Q70E, C122S.

30 It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponding to the positioning of the SNPs Q28R, Q70E, and C122S, 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

13

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 C122S.

5 Preferably a polynucleotide according to the invention is composed of a DNA or RNA molecule.

A polynucleotide according to the invention can be obtained by standard DNA or RNA synthetic methods.

A polynucleotide according to the invention can equally be obtained by site-directed
10 mutagenesis starting from the nucleotide sequence of the IFN α -5 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 a SNP g798c
15 IFN α -5 gene by modifying the nucleotide guanine (g) by the nucleotide cytosine (c) at position 798 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 T A Kunkel in 1985 in "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 82:488 can notably be mentioned.

20 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
25 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
30 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

14

"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 %.

5 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
10 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).

15 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 g798c, its complementary nucleotide sequence comprises the guanine (g) nucleotide at the equivalent of position 798.

20

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
25 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
30 coding sequence (from nucleotide 434 to nucleotide 1003),

it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following SNPs: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

15

Genotyping and determination of the frequency of a SNP

The present invention equally has for its object the use of all or part of:

5 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

10 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 434 to nucleotide 1003),

it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following SNPs: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, g1009a.

15 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.

20 "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:
25 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
30 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

16

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 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 for the PCR amplification primers can be, respectively:

SEQ ID NO. 3: Sense primer: GGTCACCTCAATCTCAACAGC

SEQ ID NO. 4: Antisense primer: GGCAGAACTCAAGAAGTGTG

The nucleotide sequences permit amplification of a fragment having a length of 681 nucleotides, from nucleotide 390 to nucleotide 1070 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

17

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®.

10

SNPs of the invention as genetic markers.

Whereas SNPs modifying functional sequences of genes (e.g. promoter, splicing sites, coding region) are likely to be directly related to disease susceptibility or resistance, all SNPs (functional or not) may provide valuable markers for the identification of one or several genes involved in these disease states and, consequently, may be indirectly related to these disease states (See Cargill et al. (1999). Nature Genetics 22:231-238; Riley et al. (2000). Pharmacogenomics 1:39-47; Roberts L. (2000). Science 287: 1898-1899).

Thus, the present invention also concerns a databank comprising at least one of the following SNPs: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a, in a polynucleotide of the IFN α -5 gene.

20

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

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

25

- (i) at least one of the following SNPs: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a, in a polynucleotide of the IFN α -5 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: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a, in a polynucleotide of the IFN α -5 gene, for developing diagnostic/prognostic kits for a disease or a resistance to a disease.

30

A SNP of the invention such as defined above may be directly or indirectly associated to a disease or a resistance to a disease.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

18

Preferably, these diseases may be those which are defined as mentioned above.

Expression vector and host cells.

5 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,
10 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
15 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.

20 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
25 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
30 MANUAL, *supra*, such as transfection by calcium phosphate, transfection by DEAE dextran, transfection, microinjection, transfection by cationic lipids, electroporation, transduction or infection.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

19

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 each of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: Q28R, Q70E, C122S.

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 each of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: Q28R, Q70E, C122S.

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;
- it being understood that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: Q28R, Q70E, C122S.

Preferably, a polypeptide according to the invention contains a single coding SNP selected from the group consisting of: Q28R, Q70E, and C122S.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

20

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 C122S.

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 polypeptide according to the invention.

The invention also relates to an immunospecific antibody for a polypeptide according to the invention, such as defined previously.

A polypeptide according to the invention, one of its fragments, an analog, one of its variants or a cell expressing this polypeptide can also be used to produce immunospecific
30 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

21

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.

- 5 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.

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

Agents interacting with the polypeptide of the invention.

- 20 The present invention equally has for its object a process for the identification of an agent activating or inhibiting a polypeptide according to the invention, comprising:

- a) the preparation of a recombinant vector comprising a polynucleotide according to the invention containing at least one coding SNP;
- b) the preparation of host cells comprising a recombinant vector according to a);
- c) the contacting of host cells according to b) with an agent to be tested; and
- 25 d) the determination of the activating or inhibiting effect generated by the agent to test.

A polypeptide according to the invention can also be employed for a process for screening compounds that interact with it.

- 30 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).

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

22

In general, in order to implement such a process, it is first desirable to produce appropriate host cells that express a polypeptide according to the invention. Such cells can be, for example, cells of mammals, yeasts, insects such as *Drosophila* or bacteria such as *E. coli*.

These cells or membrane extracts of these cells are then put in the presence of
5 compounds to be tested.

The binding capacity of the compounds to be tested with the polypeptide of the invention can then be observed, as well as the inhibition or the activation of the functional response.

Step d) of the above process can be implemented by using an agent to be tested that is
10 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 process for the identification of an agent activated or inhibited by a polypeptide according to the invention, comprising:

- a) the preparation of a recombinant vector comprising a polynucleotide according to the
20 invention containing at least one coding SNP;
- b) the preparation of host cells comprising a recombinant vector according to a);
- c) placing host cells according to b) in the presence of an agent to be tested; and
- d) the determination of the activating or inhibiting effect generated by the polypeptide on the agent to be tested.

25 An agent activated or inhibited by the polypeptide of the invention is an agent that responds, respectively, by an activation or an inhibition in the presence of this polypeptide.

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

30

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

23

Detection of diseases.

The present invention also has for object a process for analyzing the biological characteristics of a polynucleotide according to the invention and/or of a polypeptide according to the invention in a subject, comprising at least one of the following:

- 5 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;
- 10 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

24

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,

5 Parkinson's disease, schizophrenia and depression.

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

This process 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
10 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
15 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
20 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.,
25 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).

30 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

25

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.

5 Consecutively to step d), the determined concentration of the polypeptide according to the invention can be compared with the natural wild-type protein concentration usually found in a subject.

A person skilled in the art can identify the threshold above or below which appears the sensitivity or, to the contrary, the resistance to the disease, the indisposition or the disorder evoked above, with the help of prior art publications or by conventional tests or
10 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
15 polypeptide.

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.

20 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
25 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,
30 carcinoïd 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

26

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.

5 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.

10 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

15 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

20 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.

25 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

30 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

27

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

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

30 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

28

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.

5 In these pharmaceutical compositions, the active agent is advantageously present at physiologically effective doses.

These pharmaceutical compositions can be, for example, solids or liquids and be present in pharmaceutical forms currently used in human medicine such as, for example, simple or coated tablets, gelcaps, granules, caramels, suppositories and preferably injectable preparations and powders for injectables. These pharmaceutical forms can be prepared
10 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,
15 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
20 to the mode of administration.

The pharmaceutical compositions can be administered by different routes of administration known to a person skilled in the art.

The invention equally has for an object a diagnostic composition that contains, as active agent, at least one above-mentioned compound such as a polypeptide according to the
25 invention, all or part of a polynucleotide according to the invention, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody, as well as a suitable pharmaceutically acceptable excipient.

This diagnostic composition may contain, for example, an appropriate excipient like those generally used in the diagnostic composition such as buffers and preservatives.

30 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;

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

29

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.

5 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
10 can be isolated starting from cells having been infected by a retroviral plasmid vector containing RNA encoding for the polypeptide of the invention, in such a fashion that the transduced cells produce infectious viral particles containing the gene of interest. See Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

15 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.

20 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;

25 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.

30 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

30

Preferably, a complementary polynucleotide containing at least one coding SNP such as previously defined can be used.

The present invention concerns also the use of a IFN α -5 protein for the preparation of a medicament for the prevention or the treatment of a patient having a disorder or a disease
 5 caused by a IFN α -5 variant linked to the presence in the genome of said patient of a nucleotide sequence having at least 95% identity (preferably, 97% identity, more preferably 99% identity and particularly 100% identity) with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, provided that said nucleotide sequence comprises one of the following SNPs: c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a.

10 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.

15 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
 20 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
 25 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
 30 patient, and osteoporosis.

Mimetic compounds of an IFN α -5 polypeptide comprising the SNP C122S of the invention.

The present invention also concerns a new compound having a biological activity

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

31

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;

5 provided that said amino acid sequences under a) and b) comprise the SNP C122S.

Said biological activity may be evaluated, for example, by measuring 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 as described in the experimental section.

As mentioned in the experimental section, in comparison to wild-type IFN α -2, the C122S mutated IFN α -5 possesses:

- a higher capacity to stimulate IFN-gamma release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes
- 15 - a higher capacity to stimulate IL-10 and TNF- α release by monocytes
- a lower antiviral activity *in vitro* in cell culture infected with VSV
- a higher anti-tumoral activity in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells
- a similar antiviral activity *in vivo* in EMCV mouse model

20 As mentioned in the experimental section, C122S mutated IFN α -5 possesses a high capacity to stimulate dendritic cell maturation, this activity being higher with C122S mutated IFN α -5 compared to wild-type IFN α -2 and to wild-type IFN α -5.

Also as mentioned in the experimental section, in comparison to wild-type IFN α -5, the C122S mutated IFN α -5 possesses:

- 25 - a lower capacity to activate signal transduction in the MCF-7 breast carcinoma cell line
- a lower antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line
- a lower antiviral activity *in vitro* in cell culture infected with VSV.

A new compound of the invention, such as previously defined, may possess a
30 biological activity substantially similar to that of the C122S mutated IFN α -5.

Said compound may also have a biological activity such as IFN-gamma release by T-lymphocytes, IL-10 and TNF- α release by monocytes, anti-tumoral activity in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells, and/or dendritic cell

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

32

maturation, which is even higher than that of the C122S mutated IFN α -5.

Said compound may also have a biological activity such as antiviral activity *in vitro* in cell culture infected with VSV, and/or antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, which is even lower than that of the C122S mutated IFN α -5.

5 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 C122S SNP, for the identification of a compound such as defined above.

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

a) Determining the biological activity of the compound to be tested, 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, for example;

b) Comparing:

i) the activity determined in step a) of the compound to be tested, with

20 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 C122S 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
25 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 C122S SNP.

30 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

33

that said amino acid sequences comprise the C122S 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:

- 5 - 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
- 10 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"
- 15 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,

20 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,

25 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

30 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,

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

34

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 c641g, or g798c 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 α -5 was constructed starting from that of IFN α -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 Q47E, and C99S.

A thousand molecular minimization steps were conducted on this mutated fragment by using the programs AMBER and DISCOVER (MSI: Molecular Simulations Inc.).

Two molecular dynamic calculation runs were then carried out with the same program and the same force fields.

In each case, 50,000 steps were calculated at 300°K, terminated by 300 equilibration steps.

The result of these modelings is visualized on Figures 1A and 1B, and Figures 2A and 2B.

Example 2: Genotyping of the SNPs a516g, c641g, or g798c 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

35

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
5 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
10 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
- 15 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
20 a516g, c641g, g798c. 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 α -5 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.

25 The 268 individuals are distributed as follows:

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

36

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

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:

- 5 SEQ ID NO. 3: Sense primer: GGTCACCTCAATCTCAACAGC
 SEQ ID NO. 4: Antisense primer: GGCAGAACTCAAGAAGTGTG

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment of a length of 681 nucleotides, from nucleotide 390 to nucleotide 1070 in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

For each SNP, the PCR product will serve as a template for the minisequencing

- 10 The total reaction volume of the PCR reaction is 5 μ l per sample.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

37

This reaction volume is composed of the reagents indicated in the following table:

Supplier	Reference	Reactant	Initial Conc.	Vol. per tube (µl)	Final Conc.
Life Technology	Delivered with Taq	Buffer (X)	10	0.5	1
Life Technology	Delivered with Taq	MgSO ₄ (mM)	50	0.2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0.1	0.2
	On request	Sense Primer (µM)	10	0.1	0.2
	On request	Antisense Primer (µM)	10	0.1	0.2
Life Technology	11304-029	Taq platinum	5U/ µl	0.02	0.1 U/ reaction
		H ₂ O	Qsp 5 µl	1.98	
		DNA (sample)	2.5 ng/ µl	2	5 ng/ reaction
		Total volume		5 µl	

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 µl 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 ₂ O	Qsp 5 µl	3.9	
		PCR product		5 µl	
		Total vol.		10 µl	

15

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

38

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.

5 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 SNP a516g, c641g, and g798c.

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

3) Minisequencing

15 The sequences of the two minisequencing primers necessary for the genotyping were determined in a way to correspond to the sequence of the nucleotides located upstream of the site of a SNP according to the invention. The PCR product that contains the SNP being a double stranded DNA product, the genotyping can therefore be done either on the sense strand or on the antisense strand. The selected primers are manufactured by Life Technologies Inc.

The following table indicates, for each SNP, the sequence of the minisequencing primers that have been tested and the optimal condition retained for the genotyping:

SNP	Primers tested	Optimal condition for the genotyping
a516g	SEQ ID NO. 5: Sense: tctggcgtgtgatctgcctc SEQ ID NO. 6: Antisense: tgttactcaggctgtgggtc	antisense primer + ddTTP-R110 + ddCTP-Tamra
c641g	SEQ ID NO. 7: Sense: aggaggagtttgatggcaac SEQ ID NO. 8: Antisense: ggcttgagccttctggaact	sense primer + dCTP-R110 + ddGTP-Tamra
g798c	SEQ ID NO. 9: Sense: gctgaatgacctggaagcct SEQ ID NO. 10: Antisense: ctccaacctctgcatcata	antisense primer + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra

20

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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

39

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 ¹ (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 ² (µM) 2 are non labeled	2.5 of each	0.25	0.125 of each
NEN	Nel 472/5 and Nel 492/5	ddNTPs ² (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 ₂ O	Qsp 5 µl	3.125	
		digested PCR product		10	
		Total volume		15	

5 ¹ The 5X elongation buffer is composed of 250 mM Tris-HCl pH 9, 250 mM KCl, 25 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and 40 % glycerol.

² 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.

10 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
15 fluorescence reader of type Analyst® HT of LJJL 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
20 520-10 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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

40

Raw data units: counts/sec
 Switch polarization: by well
 Plate settling time: 0 msec
 PMT setup: Smart Read (+), sensitivity 2

- 5 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
 10 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.

- 15 The mP values are reported on a graph using Microsoft Inc. Excel software, and/or Allele Caller® software developed by LJI Biosystems Inc.

On the abscissa is indicated the mP value of the Tamra labeled base, on the ordinate is indicated the mP value of the R110 labeled base. A strong mP value indicates that the base labeled with this fluorophore is incorporated and, conversely, a weak mP value reveals the
 20 absence of incorporation of this base.

Up to three homogenous groups of nucleotide sequences having different 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
 25 table form.

It is necessary to specify that for SNP g798c, for example, the allele c read in antisense corresponds to the allele g read in sense, and is related to the presence of a cysteine (C) at position 49 of the immature IFNα-5 protein sequence and therefore that the allele g read in antisense corresponds to the allele c read in sense corresponding to a serine (S) for
 30 this position in the sequence of the corresponding protein.

Results of the minisequencing for the SNPs a516g, c641g, g798c

After the completion of the genotyping process, the determination of the genotypes of

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

41

the individuals of the population of individuals for the SNPs studied here was carried out using the graphs described above.

For SNP a516g the genotype is in theory either homozygote AA, or heterozygote AG, or homozygote GG in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote
5 genotype GG is not detected in the population of individuals.

For SNP c641g the genotype is in theory either homozygote CC, or heterozygote CG, or homozygote GG in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype GG is not detected in the population of individuals.

For SNP g798c the genotype is in theory either homozygote GG, or heterozygote GC, or homozygote CC in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote
10 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 3 SNPs studied are presented in the following tables:

15

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

42

		a516g (Q28R)								
Phylogenetic Population	Total	f	(95% CI)	AA	%	AG	%	GG	%	Total
African American	50	1,1	(0, 3.1)	46	97,9	1	2,1			47
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99	1,5	(0, 3.2)	95	96,9	3	3,1			98
Mexican	10			7	100					7
Non-European Caucasoid	37			35	100					35
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10			10	100					10
Southeast Asian	17			16	100					16
Total	268	0,8	(0, 1.5)	254	98,4	4	1,6			258

		c641g (Q70E)								
Phylogenetic Population	Total	f	(95% CI)	CC	%	CG	%	GG	%	Total
African American	50	5,1	(0.7, 9.5)	44	89,8	5	10,2			49
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			9	100					9
European Caucasoid	99			94	100					94
Mexican	10			9	100					9
Non-European Caucasoid	37			37	100					37
Northeast Asian	20			19	100					19
South American	10			10	100					10
Southeast Asian	17	3,3	(0, 9.8)	14	93,3	1	6,7			15
Total	268	1,2	(0.2, 2.1)	251	97,7	6	2,3			257

		g798c (C122S)								
Phylogenetic Population	Total	f	(95% CI)	GG	%	GC	%	CC	%	Total
African American	50			50	100					50
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10	5,0	(0, 14,6)	9	90,0	1	10,0			10
European Caucasoid	99	0,5	(0, 1,5)	98	99,0	1	1,0			99
Mexican	10	5,0	(0, 14,6)	9	90,0	1	10,0			10
Non-European Caucasoid	37			36	100					36
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10	5,0	(0, 14,6)	9	90,0	1	10,0			10
Southeast Asian	17			17	100					17
Total	268	0,7	(0, 1,5)	263	98,5	4	1,5			267

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

43

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

5 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 a516g, the 4 heterozygote individual AG come from the sub-
- 10 populations African American and European Caucasoid.
- for SNP c641g, the 6 heterozygote individuals CG come from the sub-
- populations African American and Southeast Asian.
- for SNP g798c, the 4 heterozygote individuals GC come from the sub-
- populations Caribbean, European Caucasoid, Mexican, and South American.

15

Example 3. Expression of natural wild-type IFN α -5 and C122S mutated IFN α -5 in yeast

a) Cloning of the natural wild-type IFN α -5 and C122S mutated IFN α -5 in the eukaryote expression vector pPicZ α -topo

20 The nucleotide sequences coding for the mature part of the natural wild-type IFN α -5 and C122S mutated IFN α -5 are amplified by PCR using as template genomic DNA from an individual who is heterozygote for the SNP.

The PCR primers permitting such an amplification are:

SEQ ID NO. 11: Sense primer: TGTGATCTGCCTCAGACCCAC

25 SEQ ID NO. 12: Antisense primer: TCATTCTTCCTCCTTAATCTTTCTTG

The PCR products are inserted in the eukaryote expression vector pPicZ α -TOPO under the control of the hybrid promoter AOX1 inducible by methanol (TOPOTM-cloning; Invitrogen Corp.).

This vector permits the heterologous expression of eukaryote proteins in the

30 yeast *Pichia pastoris*.

After checking of the nucleotide sequence of the region of the vector coding for

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

44

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.

5 b) Heterologous expression in *P. pastoris* and purification of the natural wild-type IFN α -5 and C122S mutated IFN α -5 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 α -5 or that coding for
10 C122S mutated IFN α -5, 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 OD/mL, 250 mL of BMMY medium (2% Peptone, 1% yeast extract, 1.34% YNB, 0.5%
15 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",
20 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)
25 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
30 other hand by immuno-detection by a specific antibody directed against the IFN α -5 protein. At this step, the purity of the protein of interest is higher than 75%.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

45

In a second purification step, a gel filtration permits buffer exchange of the collected fractions corresponding to IFN α -5 proteins against 50 mM Tris pH 9.0, 25 mM NaCl.

5 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.

10 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 α -5 and C122S mutated IFN α -5 proteins obtained according to this protocol, eventually scaled-up to produce higher amount of proteins,
15 are used for the functional tests described below.

Example 4. Evaluation of the capacity of wild-type and C122S mutated IFN α -5 to activate signal transduction in the breast carcinoma cell line MCF-7

The interferons are known to act through signaling pathways involving the JAK
20 (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
25 signaling pathways initiated by interferon, the reporter gene technique was used. The procedure is described below.

The breast carcinoma cells MCF-7 (ECACC) were seeded at a density of 1.10^4 cells/well in 96-well plates in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum for 24 hours. Cells were then transfected for 6 hours with a reporter gene construct (pISRE-
30 Luc) coding for the Firefly Luciferase placed under the control of the Interferon-Stimulated Response Element (Clontech) using Superfect (Qiagen) according to the

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

46

manufacturer's instructions. Then, culture media were changed and cells were incubated over-night in a CO₂ incubator at 37°C after which they were stimulated with various doses of wild-type or mutated IFN α -5 proteins for 6 hours at 37°C. After stimulation, culture media were discarded and replaced with 100 μ l/well of Phosphate Buffered Saline (PBS)/1mM MgCl₂. Luciferase activity was measured in a MicroBeta counter (Perkin-Elmer) following addition of 100 μ l/well of the substrate Lucite-Plus (Packard).

Results are expressed as the percentage of maximal stimulation of the Luciferase activity. The ability of the wild-type IFN α -5 or C122S mutated IFN α -5 to trigger the signal transduction cascades is based on the measurements of their Efficacy Doses at 50% (EC50's) corresponding to their respective concentrations stimulating 50% of the Luciferase activity (the maximal stimulation is considered as being 100% activity).

The average EC50 value measured for the wild-type IFN α -5 is 5.67 pM.

The average EC50 value measured for the C122S mutated IFN α -5 is 93.27 pM.

Thus, the ratio corresponding to the EC50 value for the mutated protein over the EC50 value for the wild-type protein reaches 18.32 (with a standard deviation of 7.63).

Consequently, this test demonstrates that the biological activity of C122S mutated IFN α -5 is 10 to 25 times less than that of wild-type IFN α -5 based on its capacity to activate the interferon signaling pathway in the breast carcinoma cell line MCF-7.

20

Example 5. Evaluation of immunomodulatory activity of C122S mutated IFN α -5

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 C122S mutated IFN α -5 on dendritic cell maturation.
- Immunomodulatory activity of C122S mutated IFN α -5 was first investigated on dendritic cells maturation and compared to that of either wild-type IFN α -5 or wild-type

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

47

IFN α -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
- 5 100 ng/mL of C122S mutated IFN α -5, wild-type IFN α -2, or wild-type IFN α -5, 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 α treatment, to provide a control with non-stimulated dendritic
- 10 cells.

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

	HLA ABC	HLA DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD1a
No IFN α	64	133	24	25	14	15	26
C122S IFN α -5	136	217	621	132	58	16	113
Wild-type IFN α -2	87	281	331	76	45	15	155
Wild-type IFN α -5	117	158	72	27	14	16	98

- 15 The results of this test demonstrate that C122S mutated IFN α -5 protein possesses a high capacity to stimulate dendritic cell maturation. In particular, stimulation of dendritic cell maturation by C122S mutated IFN α -5 is higher than that of wild-type IFN α -5 or wild-type IFN α -2.

- 20 b) Effect of C122S mutated IFN α -5 on cytokine release by T-lymphocytes

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

48

Immunomodulatory activity of C122S mutated IFN α -5 was also investigated by measuring cytokine release by T lymphocytes placed in presence of the mutated IFN α -5 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 α -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 μ g/mL of C122S mutated IFN α -5 or wild-type IFN α -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 C122S mutated IFN α -5 and wild-type IFN α -2 do not stimulate IL-10 and IFN-gamma release and, thus, do not activate T lymphocytes in absence of SEB. In contrast, C122S mutated IFN α -5 and wild-type IFN α -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 α	11.9	7.5	1.26
	C122S IFN α -5	31.48	26.64	3.36
	Wild-type IFN α -2	19.6	24.68	2.7
CD8+ CD69+	No IFN α	8.73	0.65	4.69
	C122S IFN α -5	24.11	6.98	10.5
	Wild-type IFN α -2	16.37	4.26	10.02

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

49

These results clearly demonstrate that C122S mutated IFN α -5 stimulates 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
 5 production by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes is higher in presence of C122S mutated IFN α -5 than in presence of wild-type IFN α -2.

c) Effect of C122S mutated IFN α -5 on cytokine release by monocytes

Finally, immunomodulatory activity of C122S mutated IFN α -5 was investigated
 10 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 α -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
 15 of CD64+ CD4dim cells (CD64 and CD4dim are markers for blood monocytes). After 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 μ g/mL of C122S mutated IFN α -5 or wild-type IFN α -2 was added. After culture, cells were extracellularly labelled with anti-CD64 and anti-CD4dim, and intracellularly labelled
 20 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 C122S mutated IFN α -5 protein and wild-type IFN α -2 do not stimulate cytokines (IL-10, IL-12 and TNF-alpha) release in absence of
 25 LPS.

In contrast, in presence of LPS, monocytes release cytokines (IL-10, IL-12 and TNF- α), this release being additionally increased in presence of C122S mutated IFN α -5 protein or wild-type IFN α -2 as shown in the table below. This table represents cytokine release by monocytes in presence of LPS, expressed as percentage of the CD64+
 30 CD4dim cells, and the percentage of CD4dim CD64+ cells on total cells.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

50

	IL-10	IL-12	TNF- α	CD4dim CD64+ cells/total
No IFN α	16.21	8.52	13.88	3.1
C122S IFN α -5	72.51	27.76	66.67	3
Wild-type IFN α -2	49.34	34.48	50.87	2.71

These results demonstrate that, in presence of LPS, C122S mutated IFN α -5 protein is able to stimulate cytokine release by monocytes. In particular, stimulation of IL-10 and TNF- α release by monocytes is higher in presence of C122S mutated IFN α -5 than in presence of wild-type IFN α -2.

Example 6. Evaluation of *in vitro* antiproliferative activity of C122S mutated IFN α -5

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

These tests are carried out on two different types of IFN α -5, namely: C122S mutated IFN α -5 and natural wild-type IFN α -5. 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 4.10^4 cells/ well.

In each well, Daudi cells are placed in contact of increasing concentrations of either natural wild-type or mutated IFN α -5, ranging from 0.003 pM to 600 nM.

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

The Daudi cells are then incubated for 66 h at 37 °C under 5% CO₂ after which the Uptibblue 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 C122S mutated IFN α -5 or wild-type IFN α -5 is based on the measurements of the IC50 corresponding to the concentration of IFN α -5 inhibiting 50% of the cell growth.

The average IC50 value measured for the C122S mutated IFN α -5 is 93.27 whereas

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

51

the average IC50 value measured for the wild-type IFN α -5 is 5.67. The average ratio corresponding to the value of the IC50 of the mutated protein over the value of the natural wild-type protein reaches 18.32 (standard deviation 7.63).

This test demonstrates that the C122S mutated IFN α -5 protein inhibits Daudi
5 cells proliferation. Moreover, the cellular antiproliferative activity is greatly decreased in the case of C122S mutated IFN α -5 by comparison with wild-type IFN α -5.

b) on the TF-1 erythroleukemia cell line

The effect of C122S mutated IFN α -5 was also evaluated on TF-1
10 erythroleukemia cell line. This test was also performed in presence of wild-type IFN α -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 C122S mutated IFN α -5 or wild-type IFN α -2 (0.001 to 1000 ng/mL) and the cell proliferation measured.

15 This experiment was repeated three times, and the results of one representative experiment are presented in Figure 3.

These data indicate that C122S mutated IFN α -5 has a weak antiproliferative effect on TF-1 cells. In particular, the antiproliferative effect of C122S mutated IFN α -5 is inferior to that of wild-type IFN α -2, suggesting that the C122S mutated IFN α -5's
20 hematologic toxicity is not superior to that of wild-type IFN α -2.

Example 7. Evaluation of the antiviral activity of C122S mutated IFN α -5

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

- 25 - 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.
- 30 - The PKR protein (or p68 kinase) which is activated by the double-stranded RNA. The activated PKR inhibits protein synthesis.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

52

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 C122S mutated IFN α -5 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 α -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 C122S mutated IFN α -5 in cell culture using the vesicular stomatitis virus (VSV), and comparison with that of wild-type IFN α -2 or of wild-type IFN α -5.

To do so, WISH human epithelial cells were cultivated for 24 hours in the presence of decreasing concentrations of C122S mutated IFN α -5, wild-type IFN α -5 or wild-type IFN α -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 effect of the different IFN α tested is determined by comparing the IC50 value corresponding to the IFN concentration inhibiting 50% of cell lysis induced by the VSV.

A similar experiment has been carried out three times, and the IC50 values measured in one representative experiment are presented in the following table:

	C122S IFN α -5	Wild-type IFN α -5	Wild-type IFN α -2
IC50 (ng/mL)	17	5.5	4

The results of this experimentation indicate that C122S mutated IFN α -5 protein possesses an antiviral activity *in vitro* in cell culture. Moreover, in cell culture infected

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

53

with VSV, the C122S mutated IFN α -5 has a lower antiviral activity than the wild-type IFN α -5 or wild-type IFN α -2.

b) Antiviral activity *in vivo* in mouse model

5 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).

10 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).

15 Groups of 20, six-week old Swiss mice were infected intraperitoneally with 100 x LD₅₀ EMCV and treated one hour later, and then once daily for 3 days thereafter with 2 μ g of C122S mutated IFN α -5 or wild-type IFN α -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.

20 Results are presented in Figure 4 and indicate that the relative survival rate of the mice which have been treated with C122S mutated IFN α -5 is much higher than the survival rate of the non-treated mice, demonstrating the antiviral activity of C122S mutated IFN α -5 *in vivo* in mouse model. Moreover, the antiviral activity of C122S mutated IFN α -5 *in vivo* in mouse model is similar to that observed for the mice which
25 have been treated with wild-type IFN α -2.

Example 8, Evaluation of the anti-tumoral activity of C122S mutated IFN α -5 in mice previously inoculated with malignant Friend erythroleukemia cells

30 IFN α have been shown to be as effective in protecting mice against the growth of a clone of Friend leukemia cells resistant to the direct anti-proliferative activity of IFN α , as against IFN sensitive parental Friend leukemia cells (Belardelli *et al.*, Int. J.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

54

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 α .

The following experimentation permits evaluation of the anti-tumoral activity of
5 C122S mutated IFN α -5 in mice previously inoculated with Friend erythroleukemia cells, and comparison with that of wild-type IFN α -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
10 LD₅₀) and treated one hour later and then once daily for 21 days thereafter with 2.0 μ g of the wild-type IFN α -2 or with 2.0 μ g of C122S mutated IFN α -5 or an equivalent volume of excipient alone. The animals were then followed daily for survival and the primary efficacy measure was defined as survival at 40 days and the primary efficacy analysis was the relative survival at 40 days of each treatment group in comparison to
15 its excipient only group.

The results of this experiment, presented in Figure 5, clearly indicate that, compared to mice which have not been treated with IFN α , treatment of mice with C122S mutated IFN α -5 results in an increase in the number of mice surviving after inoculation with highly malignant Friend erythroleukemia cells (FLC). In particular, the
20 increase in FLC inoculated mice survival is higher after treatment with C122S mutated IFN α -5 than after treatment with wild-type IFN α -2.

All of these results demonstrate that C122S mutated IFN α -5 possesses unique biological properties.

25

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

55

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide comprising all or part of:
 - a) the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, provided that such nucleotide sequence comprises at least one SNP selected from the group consisting of c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c and g1009a; or
 - b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).
2. The isolated polynucleotide of claim 1, comprising nucleotides 434 to 1003 of SEQ ID NO. 1, provided that the sequence contains at least one coding SNP selected from the group consisting of a516g, c641g, g798c.
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 Q28R, Q70E, and C122S.
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 C122S.
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 42, 43, 82, 123, 152, 174, 292, 516, 641, 798 and 1009.
8. The method of claim 7, wherein the genotyping is carried out by minisequencing.
9. A recombinant vector comprising a polynucleotide according to claim 1.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

56

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.
- 5 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 Q28R, Q70E, and C122S.
14. The polypeptide according to claim 12, comprising amino acids 24 through 189 of
10 the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having at least one coding SNP selected from the group consisting of Q28R, Q70E, and C122S.
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 C122S.
16. A method for obtaining an immunospecific antibody, comprising immunizing an
15 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
20 part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of Q28R, Q70E, and C122S, 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,
- 25 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 whose activity is potentiated or inhibited by an isolated polypeptide comprising all

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

57

or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of Q28R, Q70E, and C122S, said method comprising:

- a) providing host cells comprising the recombinant vector according to claim 9;
 - 5 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:
- 10 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
 - 15 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
- 20 consisting 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 c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a
 - 25 host cell comprising said recombinant vector; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 provided that such amino acid sequence comprises at least one coding SNP selected from the group consisting of Q28R, Q70E, and C122S; an antibody specific for said polypeptide.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

58

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 03/000896

PCT/EP02/05458

59

- 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 c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c and g1009a, 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 provided that such amino acid sequence comprises at least one coding SNP selected from the group consisting of Q28R, Q70E, and C122S; 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 provided that such nucleotide sequence comprises at least one SNP selected from the group consisting of c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c and g1009a, 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 provided that such amino acid sequence comprises at least one coding SNP selected from the group consisting of Q28R, Q70E, and C122S; 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 c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c and g1009a, in the IFN γ -5 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

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

60

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.
- 5 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 c42t, g43a, c82t, a123t, g152c, t174c, g292c, a516g, c641g, g798c, and g1009a, in the IFN α -5 gene.
33. A method for identifying a compound among one or more compounds to be tested
- 10 having a biological activity substantially similar to the activity of C122S mutated IFN α -5 gene product, said method comprising the steps of:
- a) 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
 - 15 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;
 - b) Comparing the activity determined in step a) of said compound with the activity of the C122S mutated IFN α -5 gene product.
 - 20 c) 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 C122S mutated IFN α -5 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,
- 25 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 C122S SNP.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

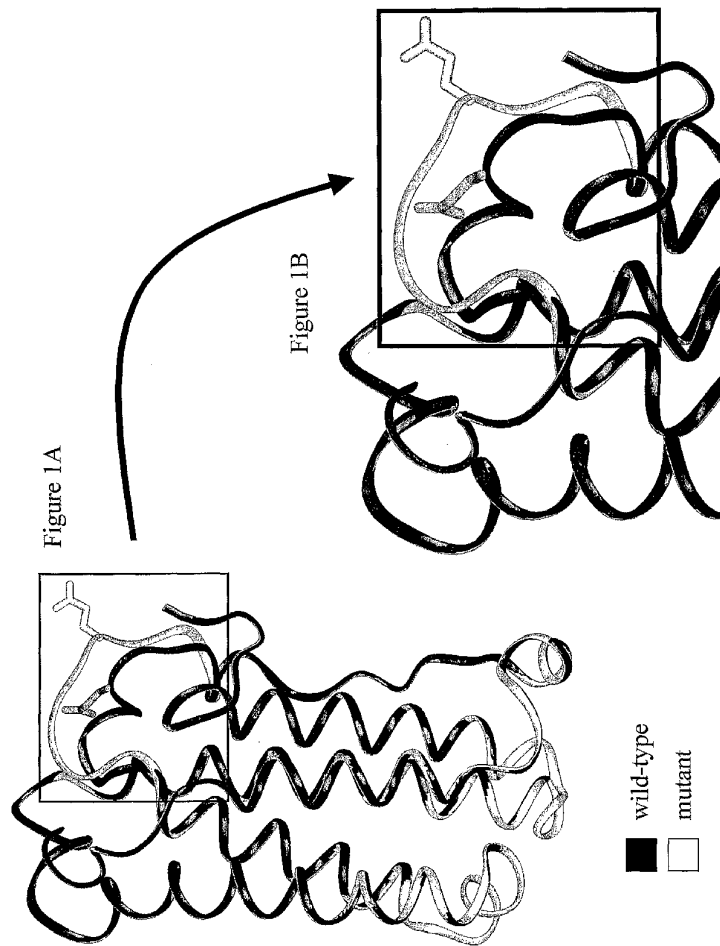
61

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.

WO 03/000896

PCT/EP02/05458

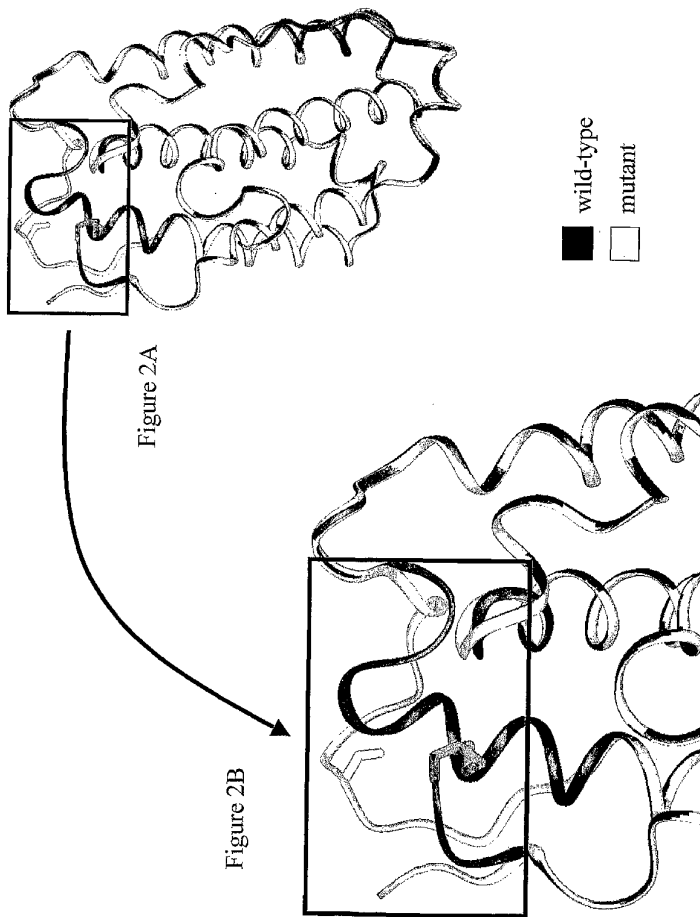
1/5



WO 03/000896

2/5

PCT/EP02/05458

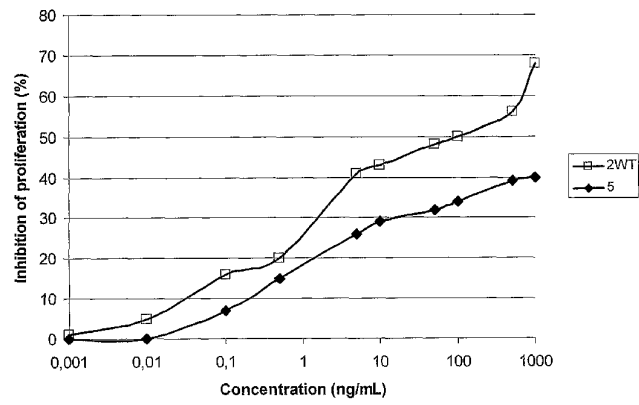


WO 03/000896

3/5

PCT/EP02/05458

Figure 3

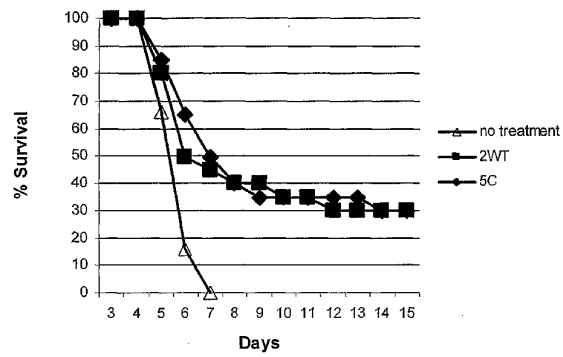


WO 03/000896

4/5

PCT/EP02/05458

Figure 4

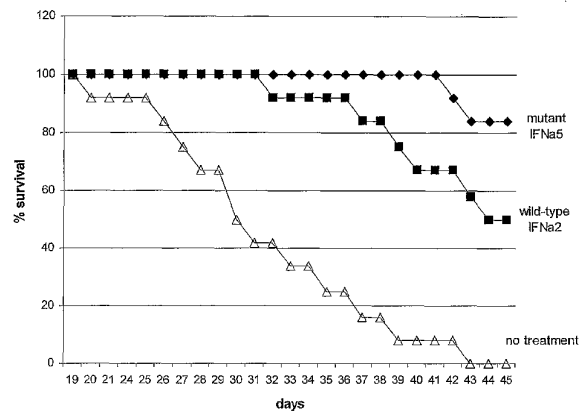


WO 03/000896

5/5

PCT/EP02/05458

Figure 5



WO 03/000896

1/4

PCT/EP02/05458

SEQUENCE LISTING

<110> Genodyssee

5 <120> New polynucleotides and polypeptides of the IFN alpha 5 gene

<130> BIF 022984 EXTENSIONS

10 <140>
<141>

<150> FR 0105919
<151> 2001-05-03

15 <160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 1475
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 1
 cttaatccgg gactgaataa attotatttt acattctatt acgctgcttt taaagcatta 60
 aagaagtaca atattctctc tcgataatgg gtactgtaat gtatatacat cagccaacac 120
 atagtataat tgtgttatta aaatttaaat ggaatttttag tttagaaaaa aatttctctaaa 180
 aagcatatgt ggcagagtga agatgaggtg ataattgtaa aataaataaa ctgagaaaca 240
 ctccgtgtaca totatgtaga aagagcataa aagaagcaa aaagagaagt agaaagtaac 300
 acaaggcatt cagaaaatgg aaactcgtat gtgacctttt taagatctgt gcacaaaaca 360
 aggtcttcag agsagaagcc aaggttcagg gtcactcaat ctcaacagcc cagaagcatc 420
 tggcaacctcc ccaatggcct tgccctttgt ttactgatg gccctggtgg tgetcaactg 480
 caagtcaatc tgttctctgg gctgtgatct gcctcagacc cacagcctga gtaacaggag 540
 gactttgatg ataatggcac aaatgggaag aatctctcct ttctcctgcc tgaaggagag 600
 acatgaacttt ggatttctctc agggaggagtt tgatggcaac cagttccaga aggctcaagc 660
 catctctgtc ccccatgaga tgatccagca gacottcaat ctcttcagca caaaggactc 720
 atctgtactc tgggatgaga caottctaga caaattctac actgaacttt accagcagct 780
 gaatgaactg gaagcctgta tgatgcagga ggttgagagt gaagacaact ctctgatgaa 840
 tgtggactct atcctgactg tgagaaaata ctttcaaaga atcacctctc atctgacaga 900
 gaagaaatac agcccttggt catgggaggt tgtcaagaca gaaatcatga gatcctctc 960
 ttatcagca aacttgcaag aaagattaa gaggaaaggaa tgaactctgg ttcaacatcg 1020
 aaatgattct cattgactag tacaccattt cacactctt gagttctgcc gtttcaata 1080
 ttaatttctg ctatatccat gacttgagtt gaatcaaat ttcaaacgt ttcaacgtg 1140
 ttaagcaaca cttcttttagc tccacagga caaatcttt acagatgac atgccaatct 1200
 atctattcta tctatttacc tatctgtctg tottctatct aatctattta aatatttatt 1260
 tatttataag atttaatta ttttaatta tgtttgttca ggtaatatta catccacctt 1320
 tactttgtgg ctaataaat aaaatagtt ctttatgttt tgtcaactga ttattttgct 1380
 ttgttcatta gatttttact attaatgtt tgtttattct ttaaatgaa actccaagcc 1440
 50 tgattgtata acttgattaa aaacagatgg tacag 1475

<210> 2
<211> 189
<212> PRT
<213> Homo sapiens

WO 03/000896

2/4

PCT/EP02/05458

<400> 2
 Met Ala Leu Pro Phe Val Leu Leu Met Ala Leu Val Val Leu Asn Cys
 1 5 10 15
 5 Lys Ser Ile Cys Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
 20 25 30
 Ser Asn Arg Arg Thr Leu Met Ile Met Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser
 35 40 45
 10 Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
 50 55 60
 15 Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu
 65 70 75 80
 His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
 85 90 95
 20 Ser Ala Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu
 100 105 110
 Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly
 115 120 125
 25 Val Glu Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg
 130 135 140
 30 Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr 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
 35 Leu Ser Ala Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 180 185
 40 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 3
 ggtcactcaa tctcaacagc 20
 50 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 55 ggcagaactc aagaagtgtg 20
 <210> 5

WO 03/000896

3/4

PCT/EP02/05458

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

5 <400> 5
tctgggctgt gatctgctc 20

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

10

<400> 6
15 tgttactcag gctgtgggtc 20

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

20

<400> 7
25 agggaggagt tgaaggcaac 20

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

30

<400> 8
ggcttgagcc ttctggaact 20

35

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

40

<400> 9
gctgaatgac ctggaagcct 20

45

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

50

<400> 10
ctccaacctc ctgcatcata 20

55

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

WO 03/000896

4/4

PCT/EP02/05458

	<400> 11	
	tgtgatetgc ctcagaccca c	21
5	<210> 12	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 12	
	tcattccttc ctccttaac tttcttg	27

【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
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000896 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/19,
C07K 14/56, C12Q 1/68, C12N 15/63, C12P 21/08, G01N
33/68, A61K 38/21, 48/00, 39/395, A61P 3/00, 35/00,
17/00, 19/00, 25/00, 37/00

(21) International Application Number: PCT/EP02/05458

(22) International Filing Date: 2 May 2002 (02.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 01/05919 3 May 2001 (03.05.2001) FR

(71) Applicant (for all designated States except US): GEN-
ODYSSEE [FR/FR]; Parc d'Affaires Technopolis, 3, av-
enue du Canada, Bat. Alpha, Boite postale 810, Les Ulis,
F-91974 Courtaboeuf (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: SANTARELLI; 14, avenue de la Grande Armée,
Boite postale 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, 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 (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

(88) Date of publication of the international search report:
17 July 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/000896 A3

(54) Title: POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN α -5 GENE

(57) Abstract: The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide sequence of the IFN α -5 gene com-
prising new SNPs, and new polypeptides derived from the natural wild-type IFN α -5 protein comprising at least one mutation caused
by at least one SNP of the invention as well as their therapeutic uses.

【手続補正書】

【提出日】平成15年7月9日(2003.7.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離されたポリヌクレオチドであって：

a) 配列番号1と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列、ここにかかるヌクレオチド配列は、c42t、g43a、c82t、a123t、g152c、t174c、g292c、a516g、c641g、g798c、及びg1009aからなる群から選択されたSNPを1つ以上含んで成るという条件を有し；又は

b) a)のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列、の全部又は一部を含んで成り、10以上のヌクレオチドからなり且つ前記SNPを1つ以上含んで成る、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】

前記ヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列(配列番号1)と90%以上の同一性、好ましくは95%以上の同一性、そして更に好ましくは99%以上の同一性を有する、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】

前記配列が、a516g、c641g、g798cからなる群から選択されたコーディングSNPを1つ以上含む条件で、配列番号1の434～1003番目のヌクレオチドを含んで成る、請求項1又は2に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】

前記配列が、g798cからなるコーディングSNPを含む条件で、配列番号1の434～1003番目のヌクレオチドを含んで成る、請求項1又は2に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】

アミノ酸配列(配列番号2)の24～189番目のアミノ酸を含んで成り且つQ28R、Q70E及びC122Sから成る群から選択されたコーディングSNPを1つ以上有するポリペプチド、又は前記SNP(s)を含んで成り且つ同様もしくは実質上同様の生物学的活性を有する前記ポリペプチドの一部をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】

アミノ酸配列(配列番号2)の24～189番目のアミノ酸を含んで成り且つコーディングSNP C122Sを有するポリペプチド、又は前記SNP(s)を含んで成り且つ同様もしくは実質上同様の生物学的活性を有する前記ポリペプチドの一部をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】

ヌクレオチド配列(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もしくは一部を同定もしくは増幅する方法であって、適切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と請求項1に記載のポリヌクレオチドとをハイブリダイズさせることを含んで成る方法。

【請求項8】

ヌクレオチド配列(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もしくは一部をジェノタイピングする方法であって、対象者もしくは対象者集団のゲノムDNA中の注目の領域を増幅し、そしてヌクレオチド配列(配列番号1)中での42、43、82、123、152、174、292、516、641、798及び1009から成る群から選択された1つ以上の位置で対立遺伝子を特定する段階を含んで成る方法。

【請求項 9】

前記ジェノタイピングが、ミニシーケンシングにより行われている請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含んで成る、組み換えベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の組換えベクターを含んで成る宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の宿主細胞を培養培地中で培養し、そして当該培養培地から前記ポリペプチドを分離することを含んで成る、ポリペプチドを分離する方法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項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たポリペプチド。

【請求項 14】

アミノ酸配列（配列番号 2）の 24 ~ 189 番目のアミノ酸を含んで成り且つ Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチド、又は前記 SNP(s) を含んで成り且つ同様もしくは実質上同様の生物学的活性を有する前記ポリペプチドの一部。

【請求項 15】

アミノ酸配列（配列番号 2）の 24 ~ 189 番目のアミノ酸を含んで成り且つ Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

アミノ酸配列（配列番号 2）のアミノ酸 24 ~ 189 を含んで成り、そしてコーディング SNP C122S を有する、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

免疫特異的抗体を獲得する方法であって、請求項 13 に記載のポリペプチドで動物を免疫し、そして前記抗体を前記動物から収集することを含んで成る方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法によりもたらされる免疫特異的抗体。

【請求項 19】

アミノ酸配列（配列番号 2）の全部もしくは一部を含んで成り、そして Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチドの活性を活性化もしくは阻害する因子を、試験される 1 もしくは複数の化合物の中から同定する方法であって、前記方法は：

- 請求項 10 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；
 - 前記宿主細胞と前記試験される化合物とを接触させ；
 - 前記ポリペプチドの活性にもたらす活性化もしくは阻害効果を測定することによって前記活性化もしくは阻害因子を同定する、
- ことを含んで成る方法。

【請求項 20】

アミノ酸配列（配列番号 2）の全部もしくは一部を含んで成り、そして Q28R、Q70E、及び C122S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチドによって活性が増強もしくは阻害される因子を、試験される 1 もしくは複数の化合物の中から同定する方法であって、前記方法は：

- 請求項 10 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；
- 前記宿主細胞と前記試験される化合物とを接触させ；
- 前記因子の活性にもたらす増強もしくは阻害効果を測定することによって前記増強もしくは阻害された因子を同定する、

ことを含んで成る方法。

【請求項 2 1】

対象者の生物学的性質を分析する方法であって、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存在又は不在を特定すること；
 - 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のレベルを測定すること；
 - c) 対象者における請求項 1 3 に記載のポリペプチドの存在又は不在を特定すること；
 - d) 対象者における請求項 1 3 に記載のポリペプチドの濃度を測定すること；
 - e) 対象者における請求項 1 3 に記載のポリペプチドの機能を特定すること、
- を 1 つ以上行うことを含んで成る方法。

【請求項 2 2】

1 0 ヌクレオチド以上からなり且つ c 4 2 t、g 4 3 a、c 8 2 t、a 1 2 3 t、g 1 5 2 c、t 1 7 4 c、g 2 9 2 c、a 5 1 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 c、及び g 1 0 0 9 a からなる群から選択された SNP を 1 つ以上含んで成るという条件のヌクレオチド配列 (配列番号 1) の全部もしくは一部、又は前記ヌクレオチド配列に対して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；

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 (配列番号 2) の 2 4 ~ 1 8 9 番目のアミノ酸を含んで成り且つ Q 2 8 R、Q 7 0 E、及び C 1 2 2 S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチド、又は前記 SNP (s) を含んで成り且つ同様もしくは実質上同様の生物活性を有する前記ポリペプチドの一部；

前記ポリペプチドに対して特異的な抗体；

からなる群から選択された 1 もしくは複数の化合物を含んで成る治療剤。

【請求項 2 3】

個体において、ガン及び腫瘍、感染症、免疫及び自己免疫疾患に関連した疾患、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患からなる群から選択された疾患、並びに化学的治療に関連した障害を予防又は治療するための方法であって、前記個体に対して治療上有効な量の請求項 2 2 に記載の治療剤に、加えて医薬的に許容できる賦形剤を投与することを含んで成る方法。

【請求項 2 4】

個体において、ガン及び腫瘍、感染症、免疫及び自己免疫に関連した疾患、心疾患、代謝性疾患、中枢神経系の疾患からなる群から選択された疾患、並びに化学的治療に関連した障害を治療する医薬を調製するための請求項 2 2 に記載の治療剤の使用。

【請求項 2 5】

前記ガン及び腫瘍が、転移性腎ガン、黒色腫、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、頸部、頭部及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、及び AIDS の場合のカポジ肉腫を含んで成る免疫欠損症に続いて現われる腫瘍を含んで成る、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記ガン及び腫瘍が、転移性腎ガン、黒色腫、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、頸部、頭部及び腎臓のガン、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、及び AIDS の場合のカポジ肉腫を含んで成る免疫欠損症に続いて現われる腫瘍を含んで成る、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 7】

前記代謝性疾患が免疫とは無関係の疾患、例えば、肥満症を含んで成る、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記代謝性疾患が免疫とは無関係の疾患、例えば、肥満症を含んで成る、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 9】

前記感染症がウイルス感染症、例えば、慢性 B 型及び C 型肝炎及び HIV / AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅のような性病を含んで成る、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記感染症がウイルス感染症、例えば、慢性 B 型及び C 型肝炎及び HIV / AIDS、感染性肺炎、並びに陰部疣贅のような性病を含んで成る、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 3 1】

前記中枢神経系の疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病も含んで成る、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記中枢神経系の疾患には、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合性失調症及び鬱病も含んで成る、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 3 3】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患が、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、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 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記免疫及び自己免疫に関連した疾患が、組織又は器官移植の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、リウマチ性関節炎、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 2 4 に記載の使用。

【請求項 3 5】

個体における、傷の治癒、透析された患者の貧血症、及び / 又は骨粗鬆症から成る群から選択された疾患を予防又は治療する方法であって、前記個体に対して治療上有効な量の請求項 2 2 に記載の治療剤に、医薬的に許容できる賦形剤を加えて投与することを含んで成る方法。

【請求項 3 6】

傷の治癒、透析された患者の貧血症、及び / 又は骨粗鬆症から成る群から選択された疾患を治療する医薬を調製するための請求項 2 2 に記載の治療剤の使用。

【請求項 3 7】

請求項 1 3 に記載のポリペプチドの活性を対象者において高める又は下げる方法であって、治療上有効な量の 1 又は複数の：

1 0 ヌクレオチド以上からなり且つ c 4 2 t、g 4 3 a、c 8 2 t、a 1 2 3 t、g 1 5 2 c、t 1 7 4 c、g 2 9 2 c、a 5 1 6 g、c 6 4 1 g、g 7 9 8 c、及び g 1 0 0 9 a からなる群から選択された SNP を 1 つ以上含んで成るという条件のヌクレオチド配列 (配列番号 1) の全部もしくはは一部、又は前記ヌクレオチド配列に対して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；

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、ここで前期宿主細胞は治療される対象者から獲得されて良く；

アミノ酸配列 (配列番号 2) の 2 4 ~ 1 8 9 番目のアミノ酸を含んで成り且つ Q 2 8 R、Q 7 0 E、及び C 1 2 2 S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチド、又は前記 SNP (s) を含んで成り且つ同様もしくは実質上同様の生物学的活性を有する前記ポリペプチドの一部；

前記ポリペプチドに対して特異的な抗体；及び

医薬的に許容できる賦形剤、

を投与することを含んで成る方法。

【請求項 3 8】

請求項 1 3 に記載のポリペプチドの活性を高めるもしくは低下させるため；又は前記個体

のゲノム中に請求項 1 に記載のポリヌクレオチドが存在することに関連した障害もしくは疾患を治療する医薬を調製するための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド又は請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 39】

個体において、当該個体のゲノム中に請求項 1 に記載のポリヌクレオチドが存在することに関連した障害又は疾患を予防もしくは治療するための方法であって、治療上有効な量の 1 又は複数の：

10ヌクレオチド以上からなり且つ c4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c、及び g1 0 0 9 a からなる群から選択された SNP を 1 つ以上含んで成るという条件のヌクレオチド配列 (配列番号 1) の全部もしくは一部、又は前記ヌクレオチド配列に対して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；

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 (配列番号 2) の 24 ~ 189 番目のアミノ酸の全部又は一部を含んで成り且つ Q2 8 R、Q7 0 E、及び C1 2 2 S から成る群から選択されたコーディング SNP を 1 つ以上有する単離されたポリペプチド、又は前記 SNP(s) を含んで成り且つ同様もしくは実質上同様の生物学的活性を有する前記ポリペプチドの一部；

前記ポリペプチドに対して特異的な抗体；及び

医薬的に許容できる賦形剤、

を投与することを含んで成る方法。

【請求項 40】

IFN - 5 遺伝子における c4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c、及び g1 0 0 9 a からなる群から選択された 1 つ以上の SNP と疾患又は疾患に対する耐性との関連性を統計学的に特定する方法であって：

a) 個体集団のジェノタイピングをし；

b) 前記疾患又は疾患に対する耐性の分布を前記個体の群中で特定し；

c) 遺伝子型データと前記疾患又は疾患に対する耐性とを比較し；そして

d) 前記統計的な直接の関連性についての比較を分析する、

ことを含んで成る方法。

【請求項 41】

疾患もしくは疾患に対する耐性の診断もしくは予後診断を促す方法であって、IFN - 5 遺伝子において c4 2 t、g4 3 a、c8 2 t、a1 2 3 t、g1 5 2 c、t1 7 4 c、g2 9 2 c、a5 1 6 g、c6 4 1 g、g7 9 8 c、及び g1 0 0 9 a からなる群から選択される 1 つ以上の SNP を検出することを含んで成る方法。

【請求項 42】

試験される 1 又は複数の化合物の中から、C1 2 2 S 突然変異 IFN - 5 遺伝子産物の活性に実質上類似する生物活性を有する化合物を同定する方法であって、前記方法は：

a) 前記化合物の生物活性、例えば、シグナル伝達、樹状細胞の成熟、CD4⁺ もしくは 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 もしくは in vivo 抗ウィルス活性、悪性 Friend 赤白血病を予め接種されたマウスの抗腫瘍活性、Daudi Burkitt 細胞系統に対する細胞抗増殖活性、TF-1 細胞系統に対する細胞抗増殖活性を測定し；

b) 前記化合物の段階 a) で測定した生物活性と、C1 2 2 S 突然変異 IFN - 5 遺伝子産物の活性とを比較し；

c) 段階 b) で行われた比較に基づき、前記化合物が、C1 2 2 S 突然変異 IFN - 5 遺伝子産物の活性に比較して、実質上類似している、又はより低いもしくはより高い活性を有するかどうかを特定する、

段階を含んで成る方法。

【請求項 43】

試験される前記化合物が、合成ペプチドコンビナトリアルライブラリー、ハイスループットスクリーニングにより同定される、又は配列番号2のポリペプチド、もしくはC122S SNPを含んで成るという条件を有するアミノ酸配列(配列番号2)の位置24～189に含まれたアミノ酸を含んで成るアミノ酸配列と同じ3次構造を有するようにコンピューターによる薬物設計によって設計される、請求項42に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

これらのSNPは、出願人によって、「Process for the determination of one or several functional polymorphism(s) in the nucleotide sequence of a preselected functional candidate gene and its applications」という名称の、2000年12月6日に提出された出願人の仏国特許出願第00105919号(本明細書中で参考文献として引用されている)に記載された決定方法を用いて同定された。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/05458
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/19 C07K14/56 C12Q1/68 C12N15/63 C12P21/08 G01N33/68 A61K38/21 A61K48/00 A61K39/395 A61P3/00 A61P35/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P25/00 A61P37/00 <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K 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) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EM_HUM 'Online! EMBL; 28 January 1986 (1986-01-28) HENCO ET AL.: "Human interferon alpha gene IFN-alpha 5" retrieved from EBI, accession no. HSIFNA5 Database accession no. X02956 XP002191414 cited in the application the whole document A -& DATABASE SWALL 'Online! 21 July 1986 (1986-07-21) HENCO ET AL.: "Interferon alpha-5 precursor" retrieved from EBI, accession no. INA5_HUMAN Database accession no. P01569 XP002191415 the whole document & J. MOL. BIOL., -/-	1,3-5, 9-13 1,3-5, 9-13
<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.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document but published on or after the international filing date *C* 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) *D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *E* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed **I* 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		Date of mailing of the international search report
7 March 2003		28/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5018 Patentlaan 2 NL-2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ceder, D

Form PCT/ISA/210 (amended) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/05458

D.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	vol. 185, 1985, pages 227-260, XP000605295	
X	WO 00 06596 A (HU RENQIU ;US HEALTH (US); BEKISZ JOSEPH B (US); HAYES MARK P (US)) 10 February 2000 (2000-02-10)	1,3-5, 9-13, 21-23, 25,29,30 1-42
A	abstract; claims page 4, line 1 -page 7, line 11	
X	WO 01 25438 A (MAXYGEN INC ;CHEN TEDDY (US); HEINRICHS VOLKER (US); PATTEN PHILLI) 12 April 2001 (2001-04-12)	1,3-5, 9-13,16, 17, 21-23, 25,29,30 1-42
A	abstract; claims	
A	EP 1 077 068 A (INST CIENTIFICO Y TECNOLOGICO) 21 February 2001 (2001-02-21) abstract; claims	1-42
A	CARGILL M ET AL: "Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes" NATURE GENETICS, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 22, July 1999 (1999-07), pages 231-238, XP002121300 ISSN: 1061-4036 abstract	1
A	NICKERSON DEBORAH A ET AL: "PolyPhred: Automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 14, 1997, pages 2745-2751, XP002152564 ISSN: 0305-1048 abstract	1
A	BOLK S ET AL: "HIGH-THROUGHPUT SNP GENOTYPING USING SINGLE-BASE EXTENSION" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, US, vol. 65, no. 4, 1999, page A97 XP000979094 ISSN: 0002-9297 abstract	1
A	WOLFORD ET AL.: "High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)" HUM GENT, vol. 107, 2000, pages 483-487, XP002233862	

1

Form PCT/CA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/05458

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 20165 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST ; HUDSON THOMAS (US); LANDER ERIC S (US);) 14 May 1998 (1998-05-14)	
A	WANG D G ET AL: "Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 280, 1998, pages 1077-1082, XP002089398 ISSN: 0036-8075	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 02/05458
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: — 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).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
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.:	
Remark on Protest		
		<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 05458

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 20, 22-30 and 36-42 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Present claims 35-42 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely it being identifiable by the method of claim 33.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. 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). An attempt is made to define the compound 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, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the polypeptide of claims 12 and 13.

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 02/05458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0006596	A	10-02-2000	
		AU 4845699 A	21-02-2000
		AU 4972299 A	21-02-2000
		WO 0006596 A2	10-02-2000
		WO 0006735 A1	10-02-2000
WO 0125438	A	12-04-2001	
		AU 8001300 A	10-05-2001
		EP 1238082 A2	11-09-2002
		WO 0125438 A2	12-04-2001
EP 1077068	A	21-02-2001	
		ES 2138565 A1	01-01-2000
		AT 214941 T	15-04-2002
		AU 753463 B2	17-10-2002
		AU 3711199 A	29-11-1999
		BR 9911774 A	06-02-2001
		CA 2335645 A1	18-11-1999
		DE 69901099 D1	02-05-2002
		DE 69901099 T2	07-11-2002
		DK 1077068 T3	22-07-2002
		EP 1077068 A1	21-02-2001
		JP 2002514606 T	21-05-2002
		SI 1077068 T1	31-12-2002
		CN 1307482 T	08-08-2001
		WO 9958143 A1	18-11-1999
		ES 2174604 T3	01-11-2002
		PT 1077068 T	31-07-2002
WO 9820165	A	14-05-1998	
		EP 0941366 A2	15-09-1999
		WO 9820165 A2	14-05-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00		4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00		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 1/16	A 6 1 P 1/16		4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04		
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00		
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 11/00	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12		
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00		
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02		
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06		
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/00		
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 21/00	A 6 1 P 21/00		
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 31/12	A 6 1 P 31/12		
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18		
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 37/02	A 6 1 P 37/02		
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04		
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 14/47	C 0 7 K 14/47		
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18		
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 P 21/08		
C 1 2 P 21/08	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	C 1 2 Q 1/68	Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566		

G O 1 N 33/68

G O 1 N 33/68

C 1 2 N 5/00

A

A 6 1 K 37/02

(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,P L,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, ジャン - ルイ

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

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37
 FB02 FB06
 4B024 AA01 AA11 BA23 CA02 DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 EA04
 GA01 GA11 HA08 HA19
 4B063 QA01 QA12 QA17 QA18 QQ02 QQ08 QQ12 QQ47 QQ61 QQ95
 QR08 QR32 QR41 QR42 QR50 QR55 QR62 QR66 QR72 QR77
 QR80 QS03 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX01
 4B064 AG26 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA44
 CA46
 4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA53
 NA14 ZA012 ZA022 ZA122 ZA162 ZA362 ZA512 ZA552 ZA592 ZA682
 ZA702 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972 ZB072 ZB082 ZB092
 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272 ZB312 ZB332 ZC552
 4C085 AA13 AA14 BB11 EE01 EE05
 4C086 AA02 AA03 EA16 MA02 MA05 NA14 ZA01 ZA02 ZA12 ZA16
 ZA36 ZA51 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA70 ZA81 ZA89 ZA94
 ZA96 ZA97 ZB07 ZB08 ZB09 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27
 ZB33 ZC55
 4C087 AA02 BB63 BC83 NA14 ZA01 ZA02 ZA12 ZA16 ZA36 ZA51
 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA70 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96
 ZA97 ZB07 ZB08 ZB09 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA16 DA75 EA20 FA74