

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-14331

(P2007-14331A)

(43) 公開日 平成19年1月25日(2007.1.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 7 6
審査請求 未請求 請求項の数 56 O L 外国語出願 (全 225 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-170738 (P2006-170738)	(71) 出願人	500203709
(22) 出願日	平成18年6月20日 (2006. 6. 20)		アムジェン インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2001-544347 (P2001-544347) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3
原出願日	平成12年12月4日 (2000. 12. 4)		2 0, サウザンド オークス, ワン
(31) 優先権主張番号	60/169, 720	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成11年12月8日 (1999. 12. 8)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100103920
(31) 優先権主張番号	09/724, 860		弁理士 大崎 勝真
(32) 優先日	平成12年11月28日 (2000. 11. 28)	(72) 発明者	アンドリュー・ウェルチャー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 0
			0 1, ベンチュラ, チャーチ ストリート 1 1 7 5
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インターフェロン様分子およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を提供する。

【解決手段】 インターフェロン様 (Interferon-Like) (IFN-L) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子。IFN-Lポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法を提供する。さらに、IFN-Lポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および／または予防のための方法及び薬学的組成物を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 1 または配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

(b) A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサートのヌクレオチド配列；

(c) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(d) (a) ~ (c) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

10

(e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70 % 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 1、もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) の
、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

20

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1、もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサート、(a) または (b) の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2、もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサート、または (a) ~ (c) いずれかの領域；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの
相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

30

(f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、以下；

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

40

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチ

50

ドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)～(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

10

【請求項4】

請求項1、請求項2または請求項3のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】

請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】

真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】

原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

20

【請求項8】

IFN-Lポリペプチドを産生するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項9】

請求項8に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

【請求項10】

請求項8に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、IFN-LポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、ネイティブなIFN-Lポリペプチドに対するプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

30

【請求項11】

請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、同一性パーセントは、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

【請求項12】

化合物がIFN-Lポリペプチド活性またはIFN-Lポリペプチド産生を阻害するかどうかを決定するためのプロセスであって、請求項5、請求項6、または請求項7のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞におけるIFN-Lポリペプチド活性またはIFN-Lポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

40

【請求項13】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号PTA-976中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項14】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号3または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

50

(b) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号 2、もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列、A T C C 受託番号 P T A-976 中の D N A インサートによってコードされるアミノ酸配列、または (a) ~ (c) のいずれかの、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、

10

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 15】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

20

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

30

【請求項 16】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、同一性パーセントは、G A P、B L A S T P、F A S T A、B L A S T A、B L A S T X、B e s t F i t、および S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

40

【請求項 18】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 19】

配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項 18 に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 20】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

50

【請求項 2 1】

ヒト化抗体である、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 2 2】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 2 3】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 2 4】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

10

【請求項 2 5】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 2 6】

C D R 移植抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 2 7】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 2 8】

可変領域フラグメントである、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 2 9】

F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 2 8 に記載の可変領域フラグメント。

20

【請求項 3 0】

配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 3 1】

検出可能標識に結合される、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 3 2】

I F N - L ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

30

【請求項 3 3】

I F N - L ポリペプチド関連の疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、有効量の請求項 1 8 に記載の選択的結合因子を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 3 4】

配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項 3 5】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

40

【請求項 3 6】

請求項 1 8 に記載の抗 I F N - L 抗体またはフラグメントを用いて、I F N - L ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

【請求項 3 7】

請求項 1 3、請求項 1 4、または請求項 1 5 のいずれかに記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 3 8】

前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項 3 7 に記載の組成物。

50

【請求項 39】

前記ポリペプチドが、配列番号 3 または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 40】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項 41】

水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項 40 に記載のポリペプチド。

【請求項 42】

請求項 41 に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリマー（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項 43】

請求項 1、請求項 2 または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 44】

前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 45】

請求項 1、請求項 2 または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項 46】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項 47】

前記異種アミノ酸配列が、IgG 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 46 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 48】

医学的状態を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 49】

処置、予防または改善されている前記医学的状態が、多発性硬化症または免疫調節を要する他の病理である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

被験体において病的状態または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

（a）サンプル中の、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの、発現の存在または発現量を決定する工程；および

（b）該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する工程、を包含する、方法。

【請求項 51】

デバイスであって、以下：

（a）移植に適した膜；および

（b）該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のタンパク質を分泌する、細胞；

を備え、

該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項 5 2】

I F N－L ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項 1 3、請求項 1 4、もしくは請求項 1 5 のいずれかに記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該 I F N－L ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項 5 3】

前記化合物に結合した場合に、前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

動物においてポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 5 5】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項 5 6】

化合物が I F N－L ポリペプチド活性または I F N－L ポリペプチド産生を阻害するかどうかを決定するためのプロセスであって、請求項 5 4 に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝露する工程、および該哺乳動物における I F N－L ポリペプチド活性または I F N－L ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、インターフェロン様 (I n t e r f e r o n－L i k e) (I F N－L) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、I F N－L ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、I F N－L ポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の、診断、処

【背景技術】

【0 0 0 2】

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療因子の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノムの一部および全体への重複配列の集合ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較によって、以前に同定された配列および／または構造の目印に対して相同性の程度を決定することが可能になる。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0 0 0 3】

過去 1 0 年間にわたるゲノム研究における大いなる技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に対する可能性は、未だ広く理解されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド（これらは、治療分子に対して「標的」としてはたらき得る）は、未だ同定されていない。

【0 0 0 4】

従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらを

10

20

30

40

50

コードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【発明の開示】

【0005】

(発明の要旨)

本発明は、新規 I F N - L の核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0006】

本発明は、単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 1 または配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

(b) A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサートのヌクレオチド配列；

(c) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列； 10

(d) (a) ~ (c) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

(e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0007】

本発明はまた、単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70% 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列； 20

(b) 配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサートのヌクレオチド配列、または (a) の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1 もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサート、(a) または (b) の領域であって、ここで、上記ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2 もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、もしくは配列番号 4 のいずれかのヌクレオチド配列、A T C C 受託番号 P T A - 9 7 6 中の D N A インサート、または (a) ~ (c) いずれかの領域； 30

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0008】

本発明はさらに、単離された核酸分子であって、以下；

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列； 40

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列； 50

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a)～(e)のいずれかのヌクレオチド配列； 10

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)～(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【0009】

本発明は、単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号PTA-976中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、 20
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0010】

本発明はまた、単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号3または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、必要に応じてさらにアミノ末端メチオニンを含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号5のいずれかのオルソログ(ortholog)に対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列； 30

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、上記フラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2、もしくは配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列、ATCC受託番号PTA-976中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列、(a)、または(b)の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0011】

本発明はさらに、単離されたポリペプチドであって、以下： 40

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2または配列番号5のい 50

ずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 5 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0012】

I F N-L アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドがまた、提供される。

10

【0013】

本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、および I F N-L ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【0014】

I F N-L ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物がまた、本発明に含まれる。I F N-L 核酸分子は、I F N-L ポリペプチドの発現および I F N-L ポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、I F N-L 核酸分子は、内因性 I F N-L ポリペプチドの発現を阻害する様式で動物に導入される（すなわち、I F N-L ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

20

【0015】

本発明の I F N-L ポリペプチドの誘導体がまた、提供される。

【0016】

本発明の I F N-L ポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストのものであってもアンタゴニストのものであってもよい。

30

【0017】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは選択的結合因子ならびに 1 つ以上の薬学的に受容可能な処方剤を含む薬学的組成物がまた、本発明によって包含される。この薬学的組成物は、治療的に有効な量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0018】

本発明の I F N-L ポリペプチドおよび I F N-L 核酸分子は、疾患および障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を処置、予防、改善、および／または検出するために使用され得る。

40

【0019】

本発明はまた、I F N-L ポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、I F N-L ポリペプチドを試験分子と接触させて、この試験分子のこのポリペプチドに対する結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、I F N-L ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、I F N-L ポリペプチドの発現または I F N-L ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0020】

I F N-L ポリペプチドの発現を調整する方法および I F N-L ポリペプチドのレベル

50

を調節する（すなわち、増加または減少する）方法がまた、本発明によって含まれる。1つの方法は、IFN-Lポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、IFN-Lポリペプチドの発現を調整または調節するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0021】

本発明の別の局面において、IFN-Lポリペプチドは、そのレセプター（「IFN-Lポリペプチドレセプター」）を同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローニングするために広範囲に使用されている。例えば、SimonsenおよびLodish、1994、Trends Pharmacol. Sci. 15: 437-41ならびにTartagliaら、1995、Cell 83: 1263-71を参照のこと。IFN-Lポリペプチドレセプターの単離は、IFN-Lポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性IFN-Lポリペプチドレセプター、抗IFN-Lポリペプチドレセプター選択的結合因子（例えば、抗体またはその誘導体）、低分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれかは、1つ以上の疾患または障害（本明細書中に開示されるものを含む）の処置に有用であり得る。

10

【0022】

（発明の詳細な説明）

20

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において列挙される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

【0023】

（定義）

用語「IFN-L遺伝子」または「IFN-L核酸分子」あるいは「IFN-Lポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号PTA-976におけるDNAインサートのヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むか、またはこれらからなる核酸分子をいう。

30

【0024】

用語「IFN-Lポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの交替形態のうちの1つをいう。

【0025】

用語「IFN-Lポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるIFN-Lポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

【0026】

40

用語「単離された核酸分子」とは、（1）総核酸が供給源細胞から単離される場合に、これが天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された本発明の核酸分子、（2）「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、（3）天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、または（4）より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない、本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、任意の他の混入核酸分子、または天然の環境において見出される他の混入物（これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用に干渉する）を実質的に含まない。

50

【0027】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNAまたはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシー-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン (pseudo isocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシルメチル) ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-エチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2, 6-ジアミノプリン。

10

【0028】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうように使用される。

20

【0029】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、そして挿入された異種核酸配列の発現を、指向および／または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0030】

用語「作動可能に連結された」を用いて、本明細書中では、隣接配列の配置をいい、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成または構築される。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および／または翻訳を行うことが可能であり得る。

30

例えば、コード配列は、このプロモーターがコード配列の転写を指向し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結される。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と連続する必要はない。したがって、例えば、介在性非翻訳の、転写された配列は、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、依然としてこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

【0031】

用語「宿主細胞」を用いて、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいう。この用語には、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。

40

【0032】

用語「IFN-Lポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連するポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、IFN-Lポリペプチドフラグメント、IFN-Lポリペプチドオルソログ、IFN-Lポリペプチド改変体、およびIFN-Lポリペプチド誘導体が挙げられ、これらは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有する。IFN-Lポリペプチドは、本明細書中で定義される成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有し

50

ても有さなくてもよい。

【0033】

用語「IFN-Lポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）での短縮化および／またはカルボキシ末端での短縮化を含むポリペプチドをいう。用語「IFN-Lポリペプチドフラグメント」はまた、IFN-Lポリペプチドオルソログ、IFN-Lポリペプチド誘導体、またはIFN-Lポリペプチド改変体のアミノ末端および／またはカルボキシ末端短縮化、あるいはIFN-Lポリペプチド対立遺伝子改変体またはIFN-Lポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端および／またはカルボキシ末端短縮化をいう。IFN-Lポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。IFN-Lポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮化および／または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなIFN-Lポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、IFN-Lポリペプチドに対する抗体を生成するために使用

10

20

され得ることが理解される。

【0034】

用語「IFN-Lポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連するポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、IFN-Lポリペプチドフラグメント、IFN-Lポリペプチドオルソログ、IFN-Lポリペプチド改変体、およびIFN-Lポリペプチド誘導体が挙げられ、これらは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有する。IFN-Lポリペプチドは、本明細書中で定義される成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

30

【0035】

用語「IFN-Lポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）での短縮化および／またはカルボキシ末端での短縮化を含むポリペプチドをいう。用語「IFN-Lポリペプチドフラグメント」はまた、IFN-Lポリペプチドオルソログ、IFN-Lポリペプチド誘導体、またはIFN-Lポリペプチド改変体のアミノ末端および／またはカルボキシ末端短縮化、あるいはIFN-Lポリペプチド対立遺伝子改変体またはIFN-Lポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端および／またはカルボキシ末端短縮化をいう。IFN-Lポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。IFN-Lポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮化および／または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなIFN-Lポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、IFN-Lポリペプチドに対する抗体を生成するために使用

40

され得ることが理解される。

50

【0036】

用語「IFN-Lポリペプチドオルソログ」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるIFN-Lポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのIFN-Lポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0037】

用語「IFN-Lポリペプチド改変体」は、配列番号2または配列番号5（リーダー配列を有するかまたは有さない）のいずれかに示されるIFN-Lポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および／またはIFN-Lポリペプチドフラグメント）、および／または付加（例えば、内部付加および／またはIFN-L融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むIFN-Lポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、IFN-Lポリペプチド対立遺伝子改変体、IFN-Lポリペプチドオルソログ、およびIFN-Lポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このようなIFN-Lポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるDNA配列から変化するDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1～3、または1～5、または1～10、または1～15、または1～20、または1～25、または1～50、または1～75、または1～100、または100より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および／または欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

【0038】

用語「IFN-Lポリペプチド誘導体」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、本明細書中で定義されるIFN-Lポリペプチドフラグメント、IFN-Lポリペプチドオルソログ、またはIFN-Lポリペプチド改変体をいい、これらは、化学的に改変されている。用語「IFN-Lポリペプチド誘導体」はまた、本明細書中で定義されるIFN-Lポリペプチド対立遺伝子改変体またはIFN-Lポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいい、これは化学的に改変されている。

【0039】

用語「成熟IFN-Lポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したIFN-Lポリペプチドをいう。成熟IFN-Lポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシ末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N連結および／またはO連結グリコシル化など）を含み得る。

【0040】

用語「IFN-L融合ポリペプチド」は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、本明細書中で定義されるIFN-Lポリペプチドフラグメント、IFN-Lポリペプチドオルソログ、IFN-Lポリペプチド改変体、またはIFN-L誘導体のアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミノ酸の融合（例えば、異種タンパク質またはペプチド）をいう。用語「IFN-L融合ポリペプチド」はまた、本明細書中で定義されるIFN-Lポリペプチド対立遺伝子改変体またはIFN-Lポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端での、1つ以上のアミノ酸の融合をいう。

【0041】

用語「生物学的に活性なIFN-Lポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの、少なくとも1つの活性特徴を有するIFN-Lポリペプチドをいう。さらに、IFN-Lポリペプチドは、免疫原としての活性を有し得る；すなわち、このIFN-Lポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0042】

用語「単離されたポリペプチド」とは、（１）供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約５０％から単離された本発明のポリペプチド、（２）「単離されたポリペプチド」が天然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に連結しない（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）、本発明のポリペプチド、（３）天然には連結しないポリペプチドに作動可能に連結（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）する、本発明のポリペプチド、または（４）天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、任意の他の混入ポリペプチドまたは天然の環境において見出される他の混入物（これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用に干渉する）を実質的に含まない。

10

【００４３】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、２つ以上のポリペプチド分子または２つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に依りて、２つ以上のヌクレオチドまたは２つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるように、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、２つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）により取り扱われたギャップ整列（存在する場合）との間の一致の同一パーセントを評価する。

【００４４】

用語「類似性」は、関連した概念であるが、「同一性」とは対照的に、「類似性」は、同一的一致および保存的置換の一致の両方を含む関連性の基準をいう。２つのポリペプチド配列が、例えば１０／２０個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性は、どちらも５０％である。同じ例において、保存的置換であるさらに５つの位置が存在する場合、パーセント同一性は５０％のままであるが、パーセント類似性は７５％（１５／２０）である。したがって、保存的置換が存在する場合、２つのポリペプチド間のパーセント類似性は、これらの２つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

20

【００４５】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出され、そしてヒトによって操作されていない物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された物質をいう。

30

【００４６】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示されるＩＦＮ－Ｌポリペプチドの１つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるＩＦＮ－ＬポリペプチドまたはＩＦＮ－Ｌ核酸分子の量をいう。

【００４７】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのＩＦＮ－Ｌポリペプチド、ＩＦＮ－Ｌ核酸分子、またはＩＦＮ－Ｌ選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な１つ以上の処方物質をいう。

40

【００４８】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る分子または分子の一部をいう。抗原は、１つ以上のエピトープを有し得る。

【００４９】

用語「選択的結合因子」とは、ＩＦＮ－Ｌポリペプチドに特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子の、ヒトＩＦＮ－Ｌポリペプチドに結合し、かつ非ＩＦＮ－Ｌポリペ

50

チドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間変形（例えば、マウスIFN-LポリペプチドおよびラットIFN-Lポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

【0050】

用語「形質導入」とは、通常はファージによる1つの細菌から別の細菌への遺伝子の伝達をいう。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達をいう。

【0051】

用語「トランスフェクション」は、細胞による異種または外因性DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクトされ」ている。多数のトランスフェクション技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら, 1973, *Virology* 52:456; Sambrookら, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); and Churら, 1981, *Gene* 13:197を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

【0052】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、DNAの形質転換は、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソードエレメントとして一時的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたものとみなされる。

【0053】

（核酸分子および／またはポリペプチドの関連性）

関連した核酸分子が、配列番号1または配列番号4のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を包含すること、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を包含することが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかにおけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。このような関連したIFN-Lポリペプチドは、例えば、1以上のN結合型もしくはO結合型のグリコシル化部位の付加および／もしくは欠失、または1以上のシステイン残基の付加および／もしくは欠失を含み得る。

【0054】

関連した核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかのIFN-Lポリペプチドの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または少なくとも約50個のアミノ酸、または少なくとも約75個のアミノ酸、または少なくとも約100個のアミノ酸、または少なくとも約150個のアミノ酸、または少なくとも約200個のアミノ酸、または200個より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、IFN-L核酸分子のフラグメントを包含する。

【0055】

さらに、関連したIFN-L核酸分子はまた、本明細書中で定義したとおりの中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、もしくは配列番号4のいずれかのIFN-L核酸分子またはポリペプチドをコードする分子の十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を包含し、このポリペプチドは、配列番号2も

10

20

30

40

50

しくは配列番号5、または本明細書中に定義したとおりの核酸フラグメント、または本明細書中に定義したとおりのポリペプチドをコードする核酸フラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供されるIFN-L配列を用いてcDNA、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーに関連した配列についてスクリーニングして調製され得る。IFN-LポリペプチドのDNA配列および／またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるとおりの配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【0056】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致のDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは42℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, FritschおよびManiatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) ; Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0057】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響される。他の薬剤は、非特異的および／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、 NaDodSO_4 、(SDS)、ficoll、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH 6.8～7.4で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHからほぼ独立する。Andersonら, Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach 第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0058】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって評価され得る：

$$T_m (^\circ\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / \text{N} - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$
ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中でのナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中での（グアニン+シトシン）塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、1%の不一致毎に約1℃下げ

10

20

30

40

50

られる。

【0059】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは37～50℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび20%ホルムアミドである。例示として、0.015Mナトリウムイオン中での50℃という「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を可能にする。

【0060】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さのDNAの融解温度は、約71℃である。65℃で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、このことは、約6%の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【0061】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについての1M NaCl* 中での融解温度の良好な評価は、以下によって与えられる：

$T_m = A - T$ 塩基対あたり2℃ + $G - C$ 塩基対あたり4℃* 6×塩クエン酸ナトリウム（SSC）中でのナトリウムイオン濃度は、1Mである。Suggsら, Developmental Biology Using Purified Genes 683 (BrownおよびFox編, 1981)を参照のこと。

【0062】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、6×SSC、0.1% SDS中でのそのオリゴヌクレオチドの T_m よりも0℃～5℃低い温度においてである。

【0063】

別の実施形態では、関連した核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2もしくは配列番号5のいずれかに示すとおりのポリペプチドに対して少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかに示されるとおりのヌクレオチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるか、またはヌクレオチド配列は、配列番号2、もしくは配列番号5のいずれかに示されるとおりのポリペプチド配列に対して約75パーセント、もしくは約80パーセント、もしくは約85パーセント、もしくは約90パーセント、もしくは約95、96、97、98、もしくは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

【0064】

核酸配列における相違は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的および／または非保存的改変をもたらし得る。

【0065】

配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する、対応する改変）は、IFN-Lポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生じる。対照的に、IFN-Lポリペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実

10

20

30

40

50

質的な改変は、以下を維持することに対するその影響が顕著に異なる、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得る：(a)例えば、シートもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、(b)標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさ。

【0066】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんどまたは全く影響がないような、標準的残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。

10

【0067】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0068】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

20

【0069】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーに対する交換を包含し得る。このような置換された残基は、非ヒトIFN- γ ポリペプチドと相同なヒトIFN- γ ポリペプチドの領域またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

【0070】

このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー指数(hydrophobic index)が考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて、ヒドロパシー指数を割り当てられている。ヒドロパシー指数は、以下である：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン／シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)。

30

【0071】

タンパク質に対する相互作用的な生物学的機能を確認する際の、ヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において一般的に理解されている(Kyteら、1982, J. Mol. Biol. 157:105-31)。特定のアミノ酸が類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに使用され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ヒドロパシー指数に基づいて変化を起こす際に、ヒドロパシー指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものが、なおより特に好ましい。

40

【0072】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る(特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様

50

に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合) こともまた、当該分野において理解されている。タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される場合に、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【0073】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 ± 1)；グルタミン酸 (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 ± 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリ 10
リン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；およびトリプトファン (-3.4)。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープをまた、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」と呼ばれる。

【0074】

所望のアミノ酸置換 (保存的であれ非保存的であれ) は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、I F N - L ポリ 20
ペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載される I F N - L ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表 I に記載される。

【0075】

【表 1】

表 I

アミノ酸置換

もとの残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

50

【0076】

当業者は、周知技術を用いて配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。活性を崩壊させずに変更され得るその分子の適切な領域を決定するために、当業者は、活性に関して重要であると考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来または他の種由来の、類似した活性を有する類似したポリペプチドが既知の場合、当業者は、IFN-Lポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似したポリペプチドと比較し得る。そのような比較を用いて、当業者は、類似したポリペ

チドの間で保存されているその分子の残基および部分を同定し得る。そのような類似したポリペプチドに対して保存されていない I F N-L ポリペプチドの領域における変化は、I F N-L ポリペプチドの生物学的活性および／または構造に逆の影響をおそらくほとんど与えないことが理解される。当業者はまた、たとえ比較的保存された領域においても、活性を維持しながら天然に存在する残基を化学的に類似したアミノ酸で代用し得る（保存的アミノ酸残基置換）ことを理解する。従って、生物学的活性または構造に対して重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を崩壊させることなく、またはポリペプチド構造に逆の影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0077】

さらに、活性または構造に重要である類似したポリペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を当業者は、再検討し得る。そのような比較を考慮して、当業者は、類似したポリペプチドにおいて活性もしくは構造に重要であるアミノ酸残基に対応する、I F N-L ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、I F N-L ポリペプチドのそのような予測された重要なアミノ酸残基に関して、化学的に類似したアミノ酸置換を選択し得る。 10

【0078】

当業者はまた、類似したポリペプチドにおける三次元構造に関連して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。そのような情報を考慮して、当業者は、三次元構造について I F N-L ポリペプチドのアミノ酸残基のアラインメントを推測し得る。当業者は、タンパク質の表面上であると推測されるアミノ酸残基に対して急激な変更を作製しないように選択し得る。なぜなら、そのような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、各アミノ酸残基において単一アミノ酸置換を含む試験改変体を作製し得る。この改変体は、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングされ得る。そのような改変体を使用して、適切な改変体に関する情報を集め得る。例えば、当業者は、特定のアミノ酸残基に対する変更が、崩壊された活性、不適当に減少された活性、または不適切な活性を生じることを発見した場合、そのような変更を有する改変体は、回避される。言い換えると、そのような慣用的な実験から集められた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が単独または他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。 20

【0079】

多数の科学刊行物が、二次構造の推測に向けられている。M o u l t、C u r r. O p i n. B i o t e c h n o l.、7:422-27、1996、C h o u ら、B i o c h e m i s t r y、13:222-45、1974；C h o u ら、B i o c h e m i s t r y、113:211-22、1974；C h o u ら、A d v. E n z y m o l. R e l a t. A r e a s M o l. B i o l.、47:45-48、1978；C h o u ら、A n n. R e v. B i o c h e m.、47:251-276およびC h o u ら、B i o p h y s. J.、26:367-84、1979を参照のこと）。さらに、コンピュータプログラムが、現在利用可能であり、二次構造の予測によって補助する。二次構造を推測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%よりも大きい配列同一性、または40%よりも大きい配列類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース（P D B）の近年の成長により、二次構造の推測可能性（ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳みの数を含む）の促進がもたらされた。H o l m ら、N u c l e i c. A c i d s. R e s.、27:244-47、1999を参照のこと。所定のポリペプチドもしくはタンパク質における限定された数の折り畳みが存在すること、および一旦構造の臨界の数が決定されると、構造予測が劇的により正確になること、が示唆されている（B r e n n e r ら、C u r r. O p i n. S t r u c t. B i o l.、7:369-76、1997）。 30

【0080】

二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレッディング（t h r e a d i n g）」 50

」(Jones、Curr. Opin. Struct. Biol.、7:377-87、1997; Sipplら、Structure、4:15-9、1996)、「プロフィール分析」(Bowieら、Science. 253:164-70、1991; Gribskovら、Methods. Enzymol.、183:146-59、1990; Gribskovら、Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.、844355-58、1987)、および「進化的連鎖(evolutionary linkage)」(Homeら、前出、およびBrenner、前出を参照のこと)が、挙げられる。

【0081】

好ましいIFN-Lポリペプチド改変体としては、グリコシル化改変体が挙げられ、ここで、グリコシル化部位の数および／または種類は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるアミノ酸配列と比較して変更されている。1つの実施形態において、IFN-Lポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列よりも多いかまたは少ない数のN結合型グリコシル化部位を含む。N結合型グリコシル化部位は、配列:Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xとして示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型炭水化物鎖の付加のための潜在的に新たな部位を提供する。あるいは、この配列を除去する置換は、存在するN結合型炭水化物鎖を除く。また、N結合型炭水化物鎖の再配列が提供され、ここで、一つ以上のN結合型グリコシル化部位(代表的には、天然にある部位)が除去されて一つ以上の新しいN結合型部位が作製される。さらに好ましいIFN-L改変体としては、システイン改変体が挙げられ、ここで、一つ以上のシステイン残基が、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるアミノ酸と比較して、欠失されているか、または別のアミノ酸(例えば、セリン)を置換している。システイン改変体は、IFN-Lポリペプチドが、不溶性封入体の単離の後のように、生物学的に活性なコンフォメーションに折り畳まなければならない場合に有用である。システイン改変体は、一般的に、ネイティブなタンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、そして代表的には、不對システインから生じる相互作用を最少化するために偶数を有する。

【0082】

他の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸の挿入を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチド(そして、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する)をコードするヌクレオチド配列から、あるいは、少なくとも1つのアミノ酸の欠失を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチド(そして、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する)をコードするヌクレオチド配列から構成される／成る。関連する核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチド(そして、ここで、このポリペプチドは、カルボキシ末端切断および／またはアミノ末端切断を有し、そして、さらに配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する)をコードするヌクレオチド配列から構成される／成る。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシ末端切断および／またはアミノ末端切断を有する配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチド(そして、ここで、このポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるポリペプチドの活性を有する)をコードするヌクレオチド配列から構成される／成る。

【0083】

さらに、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のIFN-Lポリペプチド改変体は、相同なポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成し得るか、または異種のポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、これらに限定され

ない：I F N－L 融合タンパク質の検出および／または単離を可能するためのエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその一部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通および細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドまたはその一部分；触媒活性である酵素またはその一部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加するポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはI F N－L ポリペプチド改変体とは異なる治療活性を有するポリペプチド。

【0084】

融合は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のI F N－L ポリペプチド改変体のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでなされ得る。融合は、リンカー分子またはアダプター分子なしで直接的であり得るか、あるいはリンカー分子またはアダプター分子を使用して間接的であり得る。リンカー分子またはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基、代表的には約20～約50個のアミノ酸残基であり得る。リンカー分子またはアダプター分子はまた、DNA制限エンドヌクレアーゼ、またはプロテアーゼの切断部位を有するように設計され得て融合部分の分離を可能にする。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法に従って誘導され得ることが理解される。

【0085】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のI F N－L ポリペプチド改変体は、ヒトI g GのF c領域の一つ以上のドメインに融合される。抗体は、2つの機能的に独立した部分（「F a b」として公知の可変ドメイン（抗原に結合する）および「F c」として公知の定常ドメイン（食細胞による攻撃および補体活性化のようなエフェクター機能に関係する）を含む。F cは、長い血清半減期を有し、一方、F a bは短寿命である（C a p o n ら、N a t u r e、337：525－31、1989）。治療タンパク質と一緒に構築される場合、F cドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはF cレセプター結合、プロテインA結合、補体固定およびおそらく胎盤輸送のような機能を組み込み得る（同書）。表I Iは、当該分野で公知の特定のF c機能の使用を要約する。

【0086】

10

20

30

【表 2】

表Ⅱ

治療タンパク質とのFc融合物

Fcの形態	融合パートナー	治療の影響	参考文献
IgG1	CD30-L の N末端	ボジキン病； 未分化リンパ腫； T細胞白血病	U.S. Patent No. 5,480,981
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症； 移植片拒絶	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF レセプター	敗血症性ショック	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, または IgE (最初のドメインを除く)	TNF レセプター	炎症、 自己免疫障害	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2 の N末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPG の C末端	変形性関節症； 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンの N末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
ヒト Ig Cγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

【0087】

一つの例において、ヒト IgG ヒンジ領域、CH2 領域および CH3 領域の全てまたは一部は、当業者に公知の方法を使用して IFN- γ L ポリペプチドの N 末端または C 末端のいずれかに融合され得る。別の例において、ヒト IgG ヒンジ領域、CH2 および CH3 領域は、IFN- γ L ポリペプチドフラグメント（例えば、IFN- γ L ポリペプチドの予想される細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかと融合し得る。

【0088】

得られる IFN- γ L 融合ポリペプチドは、プロテイン A アフィニティーカラムの使用によって精製され得る。Fc 領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、融合されていない対応物よりも実質的に長い半減期を示すことが見出された。また、Fc 領域への融合は、融合ポリペプチドの二量化／多量体化を可能にする。Fc 領域は、天然に存在する Fc 領域であり得るか、または特定の質（例えば、治療的質、循環時間、凝集の減少など）を改善するために変更され得る。

【0089】

関連する核酸分子およびペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. Lesk 編, Oxford University Press 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, D. W. Smith 編, Academic Press, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin,

A. M. , および Griffin, H. G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G. , Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, M. Gribskov, および J. Devereux 編, M. Stockton Press, 1991; ならびに Carillo 編, SIAM J. Applied Math., 48:1073, 1988 に記載される方法。

【0090】

同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間に最も大きな一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムに記載される。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：GCGプログラムパッケージ（GAP（Devereuxら、Nucleic Acids Res., 12:387, 1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI）を含む）、BLASTP、BLASTN、およびFASTA（Altschulら、J. Mol. Biol., 215:403-10, 1990）。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information（NCBI）および他の供給源（BLAST Manual, Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda, MD; Altschulら、1990 上記）から公に入手可能である。周知のSmith Waterman アルゴリズムもまた同一性を決定するために使用され得る。

【0091】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定の整列スキームは、2つの配列の短い領域のみの一致を生じ得、この小さな整列された領域は、2つの全長配列間に有意な関係がないとしても非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態においては、選択された整列方法（GAPプログラム）は、標的ポリペプチドの少なくとも50個の連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0092】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP（Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI）を使用して、配列同一性の割合が決定される2つのポリペプチドは、それらのそれぞれのアミノ酸の最適の一致（アルゴリズムによって決定される「一致したスパン（matched span）」）について整列される。ギャップオープニングペナルティー（gap opening penalty）（これは、平均ダイアゴナルの3倍として計算され；「平均ダイアゴナル」は、使用される比較マトリクスのダイアゴナルの平均であり；「ダイアゴナル」は、特定の比較マトリクスによってそれぞれの完全なアミノ酸一致に割り当てられるスコアまたは数である）およびギャップエクステンションペナルティー（これは、通常ギャップオープニングペナルティーの1/10である）、ならびにPAM250またはBLOSUM62のような比較マトリクスがアルゴリズムとともに使用される。標準比較マトリクス（PAM250比較マトリクスのついてDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、第5巻、補遺35（3）、1978；BLOSUM62比較マトリクスについてHenikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci USA、89:10915-10919、1992）もまたアルゴリズムによって使用される。

【0093】

ポリペプチド配列の比較に好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：アルゴリズム（Algorithm）：NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443-53（1970）、比較マトリクス（Comparison matrix）：BLOSUM 62、Henikoffら、前出）

ギャップペナルティー (Gap Penalty) : 12 ギャップレングスペナルティー (Gap Length Penalty) : 4 類似性の閾値 : 0。

【0094】

GAPプログラムは、上記パラメーターを用いて有用である。上記パラメーターは、GAPアルゴリズムを使用してポリペプチド比較についてのデフォルトパラメーター（末端ギャップについてペナルティーなしで）である。

【0095】

核酸分子配列比較についての好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる： アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, 前出)

比較マトリクス：一致=+10、不一致=0 ギャップペナルティー：50 ギャップレングスペナルティー：3。 10

【0096】

GAPプログラムはまた、上記パラメーターを用いて有用である。上記パラメーターは、核酸分子比較に付いてのデフォルトパラメーターである。

【0097】

他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較マトリクス、同一性の閾値などが当業者によって使用され得、これには、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む。なされる特定の選択は、当業者に明らかであり、なされる特定の比較（例えば、DNA-DNA間、タンパク質-タンパク質間、タンパク質-DNA間）；さらに、比較が配列の対間である（この場合、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）か、一つの配列と配列の大きなデータベースとの間（この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるか）に依存する。 20

【0098】

（核酸分子）

核酸分子は、IFN-Lポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、種々の方法（化学合成、cDNAまたはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニングおよび／またはcDNAのPCR増幅を含むがこれらに限定されない）で容易に得られ得る。 30

【0099】

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的に、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) および／またはAusubelら編 (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, NY (1994)) に記載される方法である。本発明は、本明細書中に記載される核酸分子およびこのような分子を得るための方法を用意する。

【0100】

IFN-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が一つの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部は、同じ種からのオーソログ遺伝子または関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用され得る。プローブまたはプライマーは、IFN-Lポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源からのcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。 40

【0101】

さらに、配列番号1または配列番号4のいずれかに記載される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用してゲノムライブラリーをスクリーニングし、IFN-Lをコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度または高いストリンジェンシーの条件は、スクリーニングのために使用されてスクリーニングから得られた偽陽性の数を最小にする。 50

【0102】

I F N－L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現クローニング（これは、発現されたタンパク質の性質に基づく陽性クローンの検出を使用する）によって同定され得る。代表的には、核酸ライブラリーは、宿主細胞表面において発現されそして示されるクローン化タンパク質への抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）の結合によってスクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、検出可能な標識を用いて修飾されて所望のクローンを発現するそれらの細胞を同定する。

【0103】

以下に記載される説明に従って行われる組換え発現技術は、これらのポリヌクレオチド 10
を作製し、そしてコードされるポリペプチドを発現するために従われ得る。例えば、I F N－L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、大量の所望のヌクレオチド配列を容易に作製し得る。次いで、この配列を使用して検出プローブまたは増幅プライマーを作製し得る。あるいは、I F N－L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされる I F N－L ポリペプチドは、大量に作製され得る。

【0104】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）である。この方法において、c D N A は、酵素逆転写酵素を使用して、p o l y（A）+ R N A また 20
は全 R N A から調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には、I F N－L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする c D N A の2つの別個の領域に対して相補的である）が、T a q ポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこの c D N A に付加され、そしてこのポリメラーゼが、これら2つのプライマー間のこの c D N A の領域を増幅する。

【0105】

I F N－L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、E n g e l s ら、1989, A n g e w. C h e m. I n t l. E d. 28:716-34 によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル、ホスホルアミ 30
ダイト、およびH－ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、I F N－L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする D N A は、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、I F N－L 遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードする D N A フラグメントは、A T G を有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されるか否かに依存して、I F N－L ポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。 40

【0106】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞における I F N－L ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択される I F N－L ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先性のための「E c o _ h i g h. C o d」のようなコドン度数表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、そして U n i v e r s i t y o f W i s c o n s i n P a c k a g e V e r s i o n 9.0 (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p, M a d i s o n, W I) によって提供される。他の有用な 50

コドン度数表としては、「C e l e g a n s _ h i g h . c o d」、「C e l e g a n s _ l o w . c o d」、「D r o s o p h i l a _ h i g h . c o d」、「H u m a n _ h i g h . c o d」、「M a i z e _ h i g h . c o d」、および「Y e a s t _ h i g h . c o d .」が挙げられる。

【0107】

いくつかの場合において、I F N - L ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望であり得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマー（単数または複数）が所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、P C R 増幅、または他の適切な方法を使用して生成し得る（変異誘発技術の記載に関しては、S a m b r o o k ら、前出、および A u s u b e l ら、前出を参照のこと）。E n g e l s ら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

10

【0108】

（ベクターおよび宿主細胞）

I F N - L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である）。I F N - L ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および／または真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、I F N - L ポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および／またはホスホリル化）されるか否かに一部依存する。そうである場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、M e t h . E n z . , 185 巻 (D . V . G o e d d e l , 編, A c a d e m i c P r e s s 1990) を参照のこと。

20

【0109】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のためならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のために配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

30

【0110】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、I F N - L ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；オリゴヌクレオチド配列は、p o l y H i s（例えば、h e x a H i s）、別の「タグ」（例えば、F L A G、H A（赤血球凝集素インフルエンザウイルス））または市販の抗体が存在するm y c をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、I F N - L ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対して抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたI F N - L ポリペプチドから除去され得る。

40

【0111】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または

50

合成であり得るか、あるいは隣接配列は、I F N-Lポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0112】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、I F N-L遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

10

【0113】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、P C Rを使用して、そして／あるいは適切なオリゴヌクレオチドならびに／または同じもしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むD N Aのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子（単数または複数）を含み得る大きな片のD N Aから単離され得る。単離は、適切なD N Aフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Q i a g e n（登録商標）カラムクロマトグラフィー（C h a t s w o r t h、C A）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明かである。

20

【0114】

複製起点は、代表的に、市販から購入された原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数に対するベクターの増幅は、いくつかの場合において、I F N-Lポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドp B R 3 2 2（New England Biolabs, Beverly, MA）からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点（例えば、S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（V S V）、またはH P VまたはB P Vのようなパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングのために有用である。一般的に、複製成分の起点は、哺乳動物発現ベクター（例えば、S V 4 0起点は、ただそれが初期プロモーターを含むので、しばしば、使用される）を必要としない。

30

【0115】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化され得るか、またはベクターの一部として市販で購入され、これは、本明細書中に記載されるような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

40

【0116】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、（a）原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるか；（b）細胞の栄養要求性の欠損を補うか；（c）あるいは複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

50

【0117】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生により大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の連続的な生成の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように独特に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とIFN- γ ポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のIFN- γ ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。 10

【0118】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてShine-Dalgarno配列（原核生物）またはKozak配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるIFN- γ ポリペプチドのプロモーターの3'側およびコード配列の5'側に配置される。Shine-Dalgarno配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン（すなわち、高いA-G含有量を有する）である。多くのShine-Dalgarno配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、原核生物ベクターを使用して容易に合成され得る。 20

【0119】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞からIFN- γ ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、IFN- γ 核酸分子のコード領域に位置するか、または直接IFN- γ ポリペプチドコード領域の5'末端に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性であるシグナル配列の任意が、IFN- γ 核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、IFN- γ 核酸分子に対して同種（天然）または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大部分において、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からのIFN- γ ポリペプチドの分泌は、分泌されたIFN- γ ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入されたIFN- γ 核酸分子の一部であり得る。 30

【0120】

IFN- γ ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなIFN- γ ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列またはIFN- γ ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなIFN- γ ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセスしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンIIリーダーのグループから選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌について、ネイティブなIFN- γ ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、 α 因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列が満足であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。 40

【0121】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のシグナルペプチド（presence）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列（pro-sequence）を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最後のタンパク質産物は、1位に（成熟タンパク質の最初のア 50

ミノ酸に対して)、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、所望のIFN-Lポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

【0122】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、IFN-L遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない（大部分のcDNAについて）場合、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびIFN-L遺伝子に関してイントロンの位置は、イントロンが効果的に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、IFN-L cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側で、poly-A転写終止配列の5'側である。好ましくは、イントロン（単数または複数）は、コード配列を妨害しないように、cDNAの1つの側または他の側（すなわち、5'側または3'側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまたここに含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

10

20

【0123】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、IFN-Lポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約100~1000bp）の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、通常、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）の1つにグループ化される。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくつかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答してそれらの制御下で、DNAからの転写の増加したレベルを開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対してほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、IFN-LポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなIFN-Lプロモーター配列は、IFN-L核酸分子の増幅および／または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

30

【0124】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン（trp）プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた、適切である。これらの配列は、公開されており、その結果、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNAにそれらの配列を連結し得る。

40

【0125】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターとの使用に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイル

50

ス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0126】

IFN- γ 遺伝子発現を制御する際に関心があり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40初期プロモーター領域（Bernois and Chambon, 1981, Nature 290:304-10）；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長い終末反復に含まれるプロモーター（Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-97）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1444-45）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42）； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Villa-Komaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75:3727-31）；またはtacプロモーター（DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80:21-25）。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている以下の動物転写制御領域もまた関心がある：脾臓腺房細胞において活性なエラスターゼI遺伝子制御領域（Swift et al., 1984, Cell 38:639-46；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409（1986）；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515）；脾臓 β 細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, Nature 315:115-22）；リンパ球において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-58；Adames et al., 1985, Nature 318:533-38；Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436-44）；精巣、乳房、リンパ球、および肥満細胞において活性なマウス乳腺腫瘍ウイルス制御領域（Leder et al., 1986, Cell 45:485-95）；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-76）；肝臓において活性な α -フェトプロテイン遺伝子制御領域（Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol., 5:1639-48；Hammer et al., 1987, Science 235:53-58）；肝臓において活性な α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域（Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-71）；骨髓性細胞において活性な β -グロビン遺伝子制御領域（Mogram et al., 1985, Nature 315:338-40；Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94）；脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリンベースのタンパク質遺伝子制御領域（Readhead et al., 1987, Cell 48:703-12）；骨格筋において活性なミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域（Sani, 1985, Nature 314:283-86）；ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域（Mason et al., 1986, Science 234:1372-78）。

【0127】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のIFN- γ ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシスに作用するエレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置に非依

存性である。これらは、転写ユニットに対して5'側および3'側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテインおよびインシュリン）。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化について例示的に増強するエレメントである。エンハンサーは、IFN-L核酸分子に対して5'位または3'位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'位側に配置される。

【0128】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書中に記載される隣接配列の1つ以上がすでにベクター内にない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0129】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)、pEGFP-N2 (Clontech、Palo Alto、CA)、pETL (BlueBacII、Invitrogen)、pDSR-alpha (PCT公開番号WO 90/14363) ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL、Grand Island、NY) が挙げられる。

【0130】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならぬことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems、La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPOTM TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA)、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA) が挙げられる。

【0131】

ベクターが構築され、そしてIFN-Lポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。IFN-Lポリペプチドに対する発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の種類の機能である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、前出に記載される。

【0132】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞 (例えば、E. coli) または真核生物宿主細胞 (例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、IFN-Lポリペプチドを合成し、これは、続いて、培養培地から

10

20

30

40

50

(宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合) 収集され得るか、直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される(そのポリペプチドが分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性(例えば、グリコシル化またはリン酸化)に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾、および生物学的に活性な分子に折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0133】

多数の適切な宿主細胞が当該分野で公知であり、そして多くのものが American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA から入手可能である。例としては、哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、CHO DHFR⁻細胞(Urlaubら、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 97: 4216-20)、ヒト胎児腎臓(HEK) 293細胞もしくは293T細胞または3T3細胞が挙げられるが、これらに限定されない。適切な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物産生および精製のための方法は、当該分野で公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1細胞株およびCOS-7細胞株ならびにCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、形質転換された細胞株を含む、霊長類細胞株およびげっ歯類細胞株が挙げられる。正常な二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養に由来する細胞株、ならびに一次外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子が遺伝子型的に欠損していてもよいし、または優性に作用する選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa細胞、マウスL-929細胞、Swiss、Balb-cもしくはNIHマウスに由来する3T3株、またはBHKハムスター細胞株もしくはHaKハムスター細胞株。各々これらの細胞株は、タンパク質発現の分野の当業者に公知であり、そしてタンパク質発現の分野の当業者にとって利用可能である。

【0134】

本発明に適切な宿主細胞として同様に有用であるのは、細菌細胞である。例えば、E. coliの種々の株(例えば、HB101、DH5、DH10、およびMC1061)が、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の株もまた、本方法において使用され得る。

【0135】

当業者に公知の酵母細胞の多くの株もまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0136】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、1993、Biotechniques 14: 810~17; Lucklow、1993、Curr. Opin. Biotechnol. 4: 564~72; およびLucklowら、1993、J. Virol., 67: 4566~79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen) である。

【0137】

グリコシル化IFN- γ ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物(例えば、ウシまたはヤギ)を使用し得、そしてその動物の乳汁中の本発明のグリコシル化ポリペプチドを入手し得る。IFN- γ ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、一般に、植物中で生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞にて産生されるものと異なり、そしてヒト治療用途に適切でないグリコシル化産生物を生じ得る。

【0138】

(ポリペプチド産生)

I F N－L ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞が、当業者に周知の標準培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、その細胞の増殖および生存に必要な栄養素すべてを含む。E. coli 細胞を培養するのに適切な培地は、例えば、Luria Broth (LB) および／または Terrific Broth (TB) である。真核生物細胞を培養するのに適切な培地は、ロズウェルパークメモリアル研究所培地 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640) (RPMI 1640)、最小必須培地 (Minimal Essential Medium) (MEM) および／またはダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DMEM) が挙げられ、これら全ては、培養される特定の細胞株により必要とされる血清および／または増殖因子が補充され得る。昆虫培養に適切な培地は、必要な場合にはイーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物および／またはウシ胎仔血清を補充した、グレース培地である。

10

20

30

40

50

【0139】

代表的には、トランスフェクトまたは形質転換された細胞の選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、この培地に補充物として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミド上に存在する選択マーカーエレメントにより決定される。例えば、その選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリンおよびネオマイシンが挙げられる。

【0140】

宿主細胞により産生される I F N－L ポリペプチドの量は、当該分野で公知の標準的方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定はしないが、ウェスタンブロット分析、SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および／または活性アッセイ (例えば、DNA 結合ゲルシフトアッセイ) が挙げられる。

【0141】

I F N－L ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地にて見出され得る。しかし、I F N－L ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、I F N－L ポリペプチドは細胞質および／または核 (真核生物宿主細胞について) あるいは細胞質ゾル (グラム陰性細菌宿主細胞について) に存在する。

【0142】

宿主細胞の細胞質および／または核 (真核生物宿主細胞について) あるいは細胞質ゾル (グラム陰性細菌宿主細胞について) に存在する I F N－L ポリペプチドについては、細胞内物質 (グラム陰性細菌についての封入体を含む) が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および／または超音波処理によって、ペリプラズム／細胞質の中身を放出するように溶解され得、それに続いて遠心分離され得る。

【0143】

I F N－L ポリペプチドが細胞質ゾルにおいて封入体を形成した場合、その封入体は、しばしば、内側細胞膜および／または外側細胞膜に結合し得、従って、遠心分離後に、主にペレット物質中に見出される。次いで、このペレット物質は、極端な pH 状態で処理され得るか、またはカオトロピック剤 (例えば、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体) を還元剤 (例えば、ジチオスレイトール (アルカリ性 pH) もしくはトリスカルボキシエチルホスフィン (酸性 pH)) の存在下で用いて処理されて、封入体を遊離、ばらばらにおよび可溶化し得る。可溶化形態の I F N－L ポリペプチドは、次いで、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。I F N－L ポリペプチドを単離することが所望される場合、単離は、本明細書中に記載される方法および Marston ら、1990、Meth. Enz. 182: 264-75 に記載される方法

のような、標準的方法を使用して達成され得る。

【0144】

いくつかの場合において、IFN-Lポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でないかもしれない。そのポリペプチドを「リフォールディング」する、すなわち、その3次構造に変換してジスルフィド結合を生じるための種々の方法が、生物学的活性を回復するために使用され得る。このような方法は、可溶化されたポリペプチドを通常は7を超えるpHに、特定の濃度のカオトロープの存在下で曝すことを包含する。カオトロープの選択は、封入体可溶化のために使用される選択に非常に類似するが、通常このカオトロープは、より低い濃度で使用され、そして可溶化に使用されるカオトロープと必ずしも同じではない。ほとんどの場合、リフォールディング／酸化溶液はまた、還元剤を含むかまたは還元剤に加えてその酸化形態を特定の比で含んで、特定の酸化還元ポテンシャルを生じ、それによりそのタンパク質のシステイン架橋の形成を生じるようなジスルフィドシャッフリングを可能にする。一般的に使用される酸化還元カップルのいくつかとしては、システイン／シスタミン、グルタチオン(GSH)／ジチオビスGSH、塩化銅(II)、ジチオスレート(DTT)／ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール(bME)／ジチオ-b(ME)が挙げられる。多くの場合、共溶媒が、リフォールディングの効率を高めるために使用され得るかまたは必要であり得、そしてこの目的に使用されるさらに一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

10

【0145】

封入体が、IFN-Lポリペプチドの発現の際に有意な程度まで形成されない場合は、そのポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。そのポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、上清からさらに単離され得る。

20

【0146】

溶液からのIFN-Lポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。そのポリペプチドが、そのカルボキシル末端もしくはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグを含む(IFN-Lポリペプチド／ヘキサHis)かまたはFLAG(Eastman Kodak Co.、New Haven、CT)もしくはmyc(Invitrogen、Carlsbad、CA)のような他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、カラムマトリックスがそのタグに対して高い親和性を有するアフィニティークラムにその溶液を通すことによって、1工程のプロセスで精製され得る。

30

【0147】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して高い親和性および特異性で結合する。従って、ニッケルのアフィニティークラム(例えば、Qiagen(登録商標)ニッケルカラム)が、IFN-Lポリペプチド／ポリHisの精製に使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、10.11.8節(Ausubelら編、Green Publishers Inc. and John Wiley and Sons 1993)を参照のこと。

40

【0148】

さらに、IFN-Lポリペプチドは、IFN-Lポリペプチドを特異的に認識しそして結合し得る、モノクローナル抗体を使用して精製され得る。

【0149】

精製のための他の適切な手段としては、限定はしないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動(ネイティブゲル電気泳動を含む)およびその後のゲル溶出、ならびに分取等電点電気泳動(「IsoPrime」マシン／技術、Hoefler Scientific、San Francisco、CA)が挙げられる。いくつかの場合、2つ以上のこれらの精製技術が、純度の上昇を達成するために組み

50

合わされ得る。

【0150】

I F N-Lポリペプチドはまた、当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）により調製され得、その公知技術は、例えば、Merrifieldら、1963、J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら、1985、Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132、ならびにStewartおよびYoung Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984)に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るし、または含まずに合成され得る。化学的に合成されたI F N-Lポリペプチドは、これらの参考文献に示される方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。科学的に合成されたI F N-Lポリペプチドは、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応するI F N-Lポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると予測され、従って、組換えI F N-Lポリペプチドもしくは天然のI F N-Lポリペプチドと交換可能に使用され得る。

【0151】

I F N-Lポリペプチドを得る別の手段は、そのI F N-Lポリペプチドが天然で見出される生物学的サンプル（例えば、供給源組織および／または流体）からの精製を介する。このような精製は、本明細書中に記載のようなタンパク質精製のための方法を使用して実行され得る。精製の間のI F N-Lポリペプチドの存在は、例えば、組換え産生されたI F N-Lポリペプチドもしくはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用して、モニターされ得る。

【0152】

核酸およびポリペプチドを産生するためのさらなる多数の方法が、当該分野で公知であり、そしてその方法は、I F N-Lポリペプチドに対する特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:12297-12303、を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。また、Roberts、1999、Curr. Opin. Chem. Biol. 3:263-273も参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を果たし得るオリゴヌクレオチドを得る方法を記載する。この手順は、各々が5'ランダム配列、所定の中心配列、および3'ランダム配列を有する、オリゴヌクレオチドの不均質プールを産生することを包含する。生じた不均質プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞集団に導入される。次いで、この細胞の部分集団が、所定の生物学的機能を示す部分集団についてスクリーニングされる。この部分集団から、所望の生物学的機能を果たし得るオリゴヌクレオチドが、単離される。

【0153】

米国特許第5,763,192号、同第5,814,476号、同第5,723,323号および同第5,817,483号は、ペプチドもしくはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率的(stochastic)遺伝子もしくはそのフラグメントを産生すること、次いでこれらの遺伝子を、その確率的遺伝子によりコードされる1つ以上のタンパク質を産生する宿主細胞に導入することによって、なされる。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドもしくはポリペプチドを産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0154】

ペプチドもしくはポリペプチドを産生するための別の方法は、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として公知である、Athersys, Inc.により出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650)に記載され、このプロセスは、インサイチュ組換え方法による内因性遺伝子発現の活性化もしくは遺伝子の過剰発現

を包含する。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同組換えもしくは非正統的 (i l l e g i t i m a t e) 組換えによってその遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞に調節配列を組み込むことによって、活性化もしくは増加される。標的 DNA は、まず、放射線に供され、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、最終的には遺伝子の前の途切れ目に位置し、その遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドもしくはポリペプチドの発現を生じる。

【0155】

これらの方法がまた、包括的 I F N - L ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、このライブラリーが続いて種々のアッセイ (例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイ、および生物全体アッセイ (例えば、植物、マウスなど)) における高スループット表現型スクリーニングに使用され得ることが、理解される。 10

【0156】

(合成)

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子が組換え手段および他の手段によって産生され得ることが当業者に理解される。

【0157】

(選択的結合因子)

用語「選択的結合因子」とは、1 以上の I F N - L ポリペプチドに対する特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的 I F N - L ポリペプチド選択的結合因子は、I F N - L ポリペプチドの特定の部分を結合し得、それによって、I F N - L ポリペプチドレセプターへの I F N - L ポリペプチドの結合を阻害する。 20

【0158】

I F N - L ポリペプチドを結合する選択的結合因子 (例えば、抗体および抗体フラグメント) は、本発明の範囲内にある。抗体は、ポリクローナル (単一特異的なポリクローナルを含む) 抗体、モノクローナル抗体 (m A b)、組換え抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体 (例えば、C D R グラフト化抗体)、ヒト抗体、単鎖抗体および／または二特異性抗体、ならびにそれらのフラグメント、改変体または誘導体であり得る。抗体フラグメントは、I F N - L ポリペプチドのエピトープに結合する抗体の部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって生成される、F a b フラグメントおよび F (a b ') フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換え D N A 技術 (例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現) によって精製されるフラグメントが挙げられる。 30

【0159】

I F N - L ポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、一般に、I F N - L およびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって、動物 (例えば、ウサギまたはマウス) において産生される。I F N - L ポリペプチドを、キャリアタンパク質に結合体化することが有用であり得、このキャリアタンパク質は、免疫される種において免疫原性である (例えば、キーホールリンベットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリンまたはダイズトリプシンインヒビター)。また、凝集因子 (例えば、ミョウバン) も、免疫応答を増強するために使用される。免疫後、動物を採血し、そして血清を、抗 I F N - L 抗体力価についてアッセイする。 40

【0160】

I F N - L ポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養物中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、K o h l e r ら、1975、N a t u r e 256 : 495 - 497 のハイブリドーマ法、およびヒト B 細胞ハイブリドーマ法 (K o z b o r、1984、J. I m m u n o l. 133 : 3001 ; B r o d e u r ら、M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d 50

Applications、51～63頁(Marcel Dekker, Inc., 1987))が挙げられる。IFN-Lポリペプチドと反応性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。

【0161】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、ここで、重鎖(H)および／または軽鎖(L)の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同であり、鎖の残りの部分は、別の種に由来するかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同である。このような抗体のフラグメントもまた、それらが、
10 所望の生物学的活性を示す限り、含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81:6851-6855を参照のこと。

【0162】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来のそのヒト化抗体に1以上のアミノ酸残基が導入されている。ヒト化は、例えば、齧歯目の相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部を、ヒト抗体の対応する領域で置換することによる、当該分野で記載される方法(Jonesら、1986、Nature
20 321:522-52; Riechmannら、1988、Nature 332:323-327; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-1536)によって、行われ得る。

【0163】

IFN-Lポリペプチドを結合する、ヒト抗体もまた、本発明に含まれる。内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用して、このような抗体は、必要に応じてキャリアに結合体化されたIFN-Lポリペプチド抗原(すなわち、少なくとも6個連続するアミノ酸を有する)で免疫することによって産生される。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:2551-2555; Jakobovitsら、1993、Nature 362:255-258; Bruggermannら、1993、Year in Immunol. 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をその中でコードする内因性遺伝子座を不活化し、ヒト重鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座を、そのゲノム内に導入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物(完全未満の補体の改変を有する)を交雑育種して、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得る。免疫原を投与した場合、これらのトランスジェニック動物は、これらの抗原に免疫特異的な可変領域を含む、(例えば、マウスよりもむしろ)ヒトのアミノ酸配列を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,54
40 5,807号、PCT出願番号PCT/US91/245、PCT/GB89/01207、ならびにEP546073B1およびEP546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるような、宿主細胞における組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞における発現によって産生される。

【0164】

代替的な実施形態において、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーにおいて生成され得る(Hoogenboomら、1991、J. Mol. Biol. 227:381; Marksら、1991、J. Mol. Biol. 222:581)。これらのプロセスは、糸状バクテリオファージの表面上での抗体レパートリーのディスプレイ、引き続いて、選択された抗原に対するそれらの結合によるファージの選択によって免疫選択を
50

模倣する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364（これは、このようなアプローチを用いたMPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性でかつ機能的アゴニスト抗体の単離を記載する）に記載される。

【0165】

キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、およびヒト化抗体は、代表的には、組換え方法により産生される。これらの抗体をコードする核酸は、宿主細胞に導入され、そして本明細書中に記載される材料および方法を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）において発現される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、宿主細胞における組換えDNAの発現によるか、または本明細書中に記載のハイブリドーマ細胞における発現により産生され得る。

10

【0166】

本発明の抗IFN- γ 抗体は、IFN- γ ポリペプチドの検出および定量について、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的サンドイッチアッセイおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）において用いられ得る。抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でIFN- γ ポリペプチドを結合する。

【0167】

診断適用に関しては、特定の実施形態において、抗IFN- γ 抗体は、代表的には検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを生じ得る任意の部分である。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}I または ^{67}Ga ）、蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）（Bayerら、1990, Meth. Enz. 184: 138-163）であり得る。

20

【0168】

競合結合アッセイは、限定された量の抗IFN- γ 抗体との結合について試験サンプル分析物（IFN- γ ポリペプチド）と競合する標識された標準物質（例えば、IFN- γ ポリペプチドまたはその免疫学的に反応性の部分）の能力に依存する。試験サンプル中のIFN- γ ポリペプチドの量は、この抗体に結合する標準物質の量に逆比例する。結合する標準物質の量の測定を容易にするために、抗体は、代表的には、競合の前または後に不溶化され、その結果、この抗体に結合する標準物質および分析物は、結合しないままの標準物質および分析物から簡単に分離され得る。

30

【0169】

サンドイッチイムノアッセイは、代表的には、2つの抗体（各々、検出され、そして／または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分（すなわち、エピトープ）に結合し得る）の使用に関する。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、代表的には、固体支持体に固定化された第1の抗体に結合され、その後、第2の抗体が分析物に結合し、このようにして不溶性の3部分で構成される複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体検出可能な部分で標識され得るか（例えば、直接サンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定され得る（間接サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）であり、この場合、この検出可能な部分は酵素である。

40

【0170】

抗IFN- γ 抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボイメージングのために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流に投与され得、そしてこの宿主においてこの標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、電離放射線、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、

50

動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

【0171】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、I F N-Lポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、I F N-Lポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでI F N-Lポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%で、I F N-Lポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、I F N-Lポリペプチド結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得、これにより、インビトロまたはインビボにおいてI F N-Lポリペプチド活性を阻害または排除し得る、抗I F N-Lポリペプチド抗体であり得る。アゴニストおよびアンタゴニストの抗I F N-Lポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【0172】

本発明はまた、I F N-L選択的結合因子（例えば、抗体）を含むキットおよび生物学的サンプル中でI F N-Lポリペプチドレベルを検出するのに有用である他の試薬に関する。このような試薬としては、検出可能な標識、血清ブロック剤、ポジティブコントロールサンプルおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬が挙げられ得る。

【0173】

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが、理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列（例えば、mRNA）とハイブリダイゼーションするための標識として作用する、単一の核酸種の複数のコピーを含む。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、mRNAは、最初に細胞サンプルまたは組織サンプルから抽出され、次いで、酵素標識されたcDNAから蛍光標識されたcDNAに変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各標的核酸分子に特異的に結合する標識されたcDNAの量を定量することによって視覚化される。この方法において、数千の遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットの並行様式で定量され得る。

【0174】

このハイスループット発現プロファイリングは、本発明のI F N-L分子に関連して広範の適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療のための標的として、I F N-L疾患関連遺伝子の同定および確認；関連するI F N-L分子およびそのインヒビターの分子毒性；臨床試験のための集団の階層化および代替マーカーの生成；ならびにハイスループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を援助することによって、関連するI F N-Lポリペプチド小分子薬物探索を増強すること。

【0175】

（化学的誘導体）

I F N-Lポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、開示が本明細書中に記載される場合、当業者によって調製され得る。I F N-Lポリペプチド誘導体は、このポリペプチドへ天然に結合する分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、天然に結合した化学的な基の1以上の除去によって形成される分子を含み得る。配列番号2、もしくは配列番号5、または他のI F N-Lポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例え

ば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0176】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2 kDaと約100 kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、上記の分子量より多いか、上記の分子量よりいくらか少ない重量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 kDaと約50 kDaとの間、より好ましくは、約12 kDaと約40 kDaとの間、そして最も好ましくは、約20 kDaと約35 kDaとの間である。

10

【0177】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N連結炭水化物またはO連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレングリコール（PEG）（これは、モノポリエチレングリコール（ C_1-C_{10} ）、アルコキシポリエチレングリコール、またはアリアルオキシポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されたPEGの形態を含む）、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6 kDのデキストラン））、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ（N-ビニルピロリジン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシ/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびビニルアルコール。共有結合したIFN-Lポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

20

【0178】

一般に、化学的誘導は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般的に、以下の工程を包含する：（a）配列番号2もしくは配列番号5、または他のIFN-Lポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）とポリペプチドを反応させる工程、ならびに（b）反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1つの実施形態において、IFN-Lポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一ポリマー分子部分を有する。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

30

【0179】

ポリペプチドのペグ化（pegylation）は、当該分野で公知の任意のペグ化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Francisら, 1992, Focus on Growth Factors 3:4-10; 欧州特許第0154316号および0401384号; ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有さねばならない。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有さねばならない。例えば、反応性アルデヒドは、水溶性であるポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドか、またはモノ C_1-C_{10} アルコキシもしくはそのアリアルオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

40

【0180】

50

別の実施形態において、I F N－Lポリペプチドは、ビオチンに化学的に結合され得る。次いで、このビオチン／I F N－Lポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、4価のアビジン／ビオチン／I F N－Lポリペプチド分子が得られる。I F N－Lポリペプチドはまた、ジニトロフェノール（D N P）またはトリニトロフェノール（T N P）に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗D N Pまたは抗T N P－I g Mで沈澱されて、10価の十量体の結合体を形成する。

【0181】

一般に、本発明のI F N－Lポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、I F N－Lポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるI F N－Lポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強もしくは減少した生物学的活性、または他の特徴（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。

10

【0182】

（遺伝子操作された非ヒト動物）

マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、ネイティブなI F N－Lポリペプチドをコードする遺伝子は崩壊（すなわち「ノックアウト」）され、I F N－Lポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するか、または完全に破壊される。このような動物は、米国特許第5, 557, 032号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

20

【0183】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、この動物のネイティブな形態のI F N－L遺伝子または異種I F N－L遺伝子のいずれかが、これらの動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5, 489, 743号およびP C T公開番号W O 9 4 / 2 8 1 2 2号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【0184】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明の1以上のI F N－Lポリペプチドのプロモーターは、（例えば、相同的な組換え方法を使用することによって）活性化されるかまたは不活性化されるかのいずれかであり、1以上のネイティブなI F N－Lポリペプチドの発現のレベルを改変する。

30

【0185】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、I F N－L遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるI F N－Lポリペプチドの量は、動物を薬物候補物に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物での薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現により、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患状態または病理学的状態と関連し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少させる薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害する能力を試験し得る。別の例において、ポリペプチドのフラグメントのような、特定の代謝産物の産生は、疾患状態または病理学的状態を生じるか、あるいは疾患状態または病理学的状態と関連する。このような場合、このような代謝産物の産生を減少させる薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害する能力を試験し得る。

40

【0186】

（I F N－Lポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ）

いくつかの状態において、I F N－Lポリペプチドの活性の調節因子である分子（すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。I F N－Lポリペプチドを調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるように、1以上の

50

スクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式またはインビトロ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【0187】

「試験分子」とは、IFN- γ ポリペプチドの活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）能力に関する評価の下にある分子を言う。最も一般的に、試験分子は、IFN- γ ポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、IFN- γ 遺伝子発現に影響を与えることによってか、またはIFN- γ ポリペプチド結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、IFN- γ ポリペプチド活性を間接的に調節し得ることがまた、意図される。1つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数でIFN- γ ポリペプチドと結合する。

10

【0188】

IFN- γ ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、IFN- γ ポリペプチドは、試験分子とIFN- γ ポリペプチドとの相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の範囲が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

【0189】

特定の実施形態において、IFN- γ ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または小分子量の分子であり得、これらは、IFN- γ ポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。IFN- γ ポリペプチドの発現を調節する分子は、IFN- γ ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるかまたはIFN- γ ポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子を含み、そしてこの分子は、発現のアンチセンス調節因子として作用する。

20

【0190】

一旦、試験化合物がIFN- γ ポリペプチドと相互作用するとして同定されると、この分子は、IFN- γ ポリペプチド活性を増加または減少させるその能力についてさらに評価され得る。試験分子とIFN- γ ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形式で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、IFN- γ ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてIFN- γ ポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するための1つ以上のアッセイによって決定される。

30

【0191】

試験分子とIFN- γ ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むIFN- γ ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0192】

IFN- γ ポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのIFN- γ ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、IFN- γ ポリペプチドのその結合パートナーに対する結合の速度および／または程度を増加または減少させる試験分子の能力に関して、この試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1アッセイにおいて、IFN- γ ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中で免疫化される。次いで、放射標識したIFN- γ ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したIFN- γ ポリペプチド結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一時に一方をか（いずれかの順序で）または同時に、添加され得る。インキ

40

50

ュベーション後に、このウェルは洗浄され、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射性が計数され、結合パートナーが I F N - L ポリペプチドに結合する程度が決定され得る。代表的に、分子は、濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの 1 以上のエレメントを欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対して I F N - L ポリペプチド結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識した I F N - L ポリペプチドとともにインキュベートし、そして I F N - L ポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、第 18 章 (A u s u b e l ら、編、G r e e n P u b l i s h e r s I n c. ならびに W i l e y および S o n s 1995) を参照のこと。 10

【0193】

放射性標識に対する代替として、I F N - L ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) またはアルカリホスファターゼ (A P)（これらは、比色定量的に検出され得る））に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。I F N - L ポリペプチドまたは I F N - L ポリペプチド結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体はまた、A P または H R P に連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーション後に、検出目的のために使用され得る。 20

【0194】

I F N - L ポリペプチドまたは I F N - L ポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定化され得る。基材-タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そして I F N - L ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、試験分子および相補タンパク質がカラムを通過されることによって、カラム内に固定化され得る。I F N - L ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。 30

【0195】

I F N - L ポリペプチド結合タンパク質と I F N - L ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、B I A c o r e アッセイシステム (P h a r m a c i a, P i s c a t a w a y, N J)）である。B I A c o r e システムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、I F N - L ポリペプチドまたは I F N - L ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器に位置する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的に 40
かのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面と物理的に結合する分子量の変化に基づいて評価され得、この分子量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0196】

いくつかの場合において、2 つ以上の試験化合物と一緒に、I F N - L ポリペプチドと I F N - L ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが望ましくあり得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される。 50

【0197】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、I F N-LポリペプチドとI F N-Lポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する影響について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0198】

I F N-LポリペプチドとI F N-Lポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少する化合物はまた、I F N-LポリペプチドまたはI F N-Lポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得ることができ、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。I F N-Lポリペプチドの、I F N-Lポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験化合物の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、I F N-Lポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに特徴付けするために有利に使用され得る。

【0199】

細胞培養物はまた、薬物候補物の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補物は、I F N-L遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるI F N-LポリペプチドまたはI F N-Lポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補物への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物への薬物候補物の実質的な影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物への特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補物の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を妨害または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補物の能力が試験され得る。

【0200】

（内部移行タンパク質）

t a t タンパク質配列（H I V由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、F a l w e l l ら、1994、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 91:664-68を参照のこと。例えば、H I V t a t タンパク質の11アミノ酸の配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号18）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはT A T P D Tを称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。S c h w a r z e ら、1999、S c i e n c e 285:1569-72；およびN a g a h a r a ら、1998、N a t . M e d . 4:1449-52を参照のこと。これらの手順において、F I T C 構築物（F I T C 標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号19）（これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光活性化分類（F A C S）分析によって検出される。t a t - β -g a l 融合タンパク質で処置された細胞は、 β -g a l 活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む）において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度広がり、そういうものとして、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0201】

従って、t a t タンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために

使用され得ることが理解される。例えば、t a t タンパク質配列を使用して、I F N－L アンタゴニスト（例えば、抗 I F N－L 選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、I F N－L 分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「I F N－L 分子」は、本明細書中に記載されるような、I F N－L 核酸分子および I F N－L ポリペプチドの両方をいう。所望ならば、I F N－L タンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。S t r a u s , 1 9 9 9 , S c i e n c e 2 8 5 : 1 4 6 6 - 6 7 をまた参照のこと。

【0202】

（I F N－L ポリペプチドを用いた細胞供給源の同定）

10

本発明の特定の実施形態に従って、I F N－L ポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定し得ることが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定の実施形態において、I F N－L ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗 I F N－L ポリペプチド抗体を使用して、細胞における I F N－L ポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

【0203】

（I F N－L ポリペプチド組成物および投与）

20

治療組成物は、本発明の範囲内である。このような I F N－L ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量の I F N－L ポリペプチドまたは I F N－L 核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の 1 以上の I F N－L ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方剤との混合物中に、含み得る。

【0204】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0205】

30

薬学的組成物は、例えば、p H、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、解離または放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム（s o d i u m h y d r o g e n - s u l f i t e））、緩衝液（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、T r i s - H C l、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（エチレンジアミン四酢酸（E D T A））、複合体化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピルβ－シクロデキストリン）、フィラー、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、味付け剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、表面活性剤または湿潤剤（例えば、プルオニック（p l u r o n i c）；P E G；ソルビタンエステル；ポリソルビテート（例えば、p o l y s o r b a t e 2 0 ま

40

50

たは polysorbate 80) ; トリトン ; トロメタミン ; レシチン ; コレステロールまたはチロキサポール (tyloxapal))、安定性増強剤 (例えば、スクロースまたはソルビトール)、張度増強剤 (例えば、ハロゲン化アルカリ金属 (好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム)、またはマンニトール、ソルビトール)、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences (第18版, A. R. Gennaro, 編, Mack Publishing Company 1990を参照のこと。

【0206】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、IFN-L分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。 10

【0207】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理学的な生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充されている。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH7.0-8.5のTris緩衝液または約pH4.0-5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、IFN-Lポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出) と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、IFN-Lポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。 20

【0208】

このIFN-Lポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達 (例えば、経口的に) のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術内にある。 30

【0209】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたは多少より低いpH (典型的に、約5~約8のpH範囲内) にこの組成物を維持するために使用される。

【0210】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のIFN-L分子を含む発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、IFN-L分子が、滅菌で、等張溶液として処方され、適切に保存される。 40
なお別の調製は、所望の分子と、薬剤 (例えば、注入可能なミクロスフィア、生体侵食 (bio-erodible) 薬剤、ポリマー化合物 (ポリ乳酸またはポリグリコール酸のような)、ビーズまたはリポソーム) との処方物に関係し、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御されたまたは持続された放出を提供する。ヒアルロン酸がまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

【0211】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、IFN-Lポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。IFN-Lポリペ 50

チドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧体と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号WO 94/20069にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

【0212】

特定の処方物が、経口投与され得ることがまた意図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与されるIFN-Lポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身分解が最小化される場合、胃腸管内での点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、IFN-Lポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、味付け剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、およびバインダーがまた、使用され得る。

10

【0213】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のIFN-Lポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては以下を含むが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

20

【0214】

さらなるIFN-Lポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続または制御送達処方物中にIFN-Lポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体侵食マイクロスフィアあるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性マイクロ粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

【0215】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスを含む。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸と γ -エチルーL-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, Biopolymers 22:547-56）、ポリ（2-ヒドロキシエチルーメタクリレート）（Langerら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92；および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

30

40

【0216】

インビボ投与のために使用されるIFN-Lの薬学的組成物は、代表的に滅菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前に、またはそれに続いてのいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。

50

【0217】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

【0218】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（*lysyring* 10 *e*））を含むキットが含まれる。

【0219】

治療的に使用されるIFN- γ の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、IFN- γ 分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および一般的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（*titer*）、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約100 mg/kg 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約100 mg/kg まで；または1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約100 mg/kg まで；または5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約100 mg/kg までの範囲であり得る。

【0220】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのIFN- γ 分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。典型的に、臨床家は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、経時的な単一用量として、2以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量-応答データの使用を介して確認され得る。 30

【0221】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する：経口的に；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介して；徐放性系によって；または移植デバイスによって。所望される場合、これらの組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0222】

あるいはまたはさらに、組成物は、その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され 40 得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボーラスまたは連続的な投与を介し得る。

【0223】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、IFN- γ ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から除去された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、または器官が引き続いて患者に移植して戻された後にIFN- γ ポリペプチドの薬学的組成物に曝露される。

【0224】

他の場合において、IFN- γ ポリペプチドは、本明細書中に記載される方法を使用して、遺伝的に操作されて、IFN- γ ポリペプチドを発現および分泌する特定の細胞を移 50

植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子によって細胞の破壊を防止する。

【0225】

本明細書中において議論されるように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を1つ以上のIFN- γ ポリペプチドで処理することが、望ましくあり得る。このことは、細胞膜に対して透過性の形態である場合には、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。 10

【0226】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写に対してサイレントなIFN- γ 遺伝子（すなわち、過少発現される遺伝子）を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のIFN- γ ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0227】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。Kucherlapati, 1989, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol. 36:301。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため（Thomasら、1986, Cell 44:419-28; ThomasおよびCapecci, 1987, Cell 51:503-12; Doetschmanら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:8583-87）、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため（Doetschmanら、1987, Nature 330:576-78）の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号；欧州特許第9193051号および同第505500号；PCT/US90/07642、ならびにPCT公開番号WO 91/09955）に記載されている。 20 30

【0228】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的DNAに付着させることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的（相同）であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、そして従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。 40

【0229】

IFN- γ ポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域（例えば、隣接配列）が、標的DNAのこれらの断片に付着する。例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のIFN- γ ポリペプチドをコードするDNAの転写に影響を与えるに十分な近さおよび配向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの部分を制御する。従って、所望のIFN- γ ポリペプチドの発現は、IFN- γ 遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、 50

むしろ、I F N－L 遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するD N A 調節セグメントと結合した標的D N A（目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む）の使用によって、達成され得る。

【0230】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位を含むD N Aの導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体（ゲノム）D N Aに導入される（ここで、D N A構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結する）。染色体D N Aへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化

10

【0231】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、通常は得られたままの細胞においてサイレントな（発現されていない）遺伝子の活性化（または発現させる）、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少（排除を含む）させる。

20

【0232】

細胞の内在性I F N－L 遺伝子からのI F N－L ポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列（例えば、C r e／l o x P、F L P／F R T）（S a u e r, 1994, C u r r. O p i n. B i o t e c h n o l., 5: 521-27; S a u e r, 1993, M e t h o d s E n z y m o l., 225: 890-900）を、細胞の内在性ゲノムI F N－L ポリペプチドコード領域の上流（すなわち、5'側）に配置する工程を包含する。ゲノムI F N－L ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムI F N－L ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込み得る（B a u b o n i s および S a u e r, 1993, N u c l e i c A c i d s R e s. 21: 2025-29; O' G a r m a n ら, 1991, S c i e n c e 251: 1351-55）。転写を増加させることが知られている任意の側方配列（例えば、エンハンサー／プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性I F N－L 遺伝子からの新たなまたは増加したI F N－L ポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で一体化する。

30

【0233】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノムI F N－L ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同組換えを使用することである。適切な組換え酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え事象（欠失、転化、および転移）を生じ（S a u e r, 1994, C u r r. O p i n. B i o t e c h n o l., 5: 521-27; S a u e r, 1993, M e t h o d s E n x y m o l., 225: 890-900）、これは、細胞の内在性I F N－L 遺伝子からの新規なまたは増加したI F N－L ポリペプチド産生を生じる新しいかまたは改変された転写ユニットを作製する。

40

【0234】

細胞の内在性I F N－L 遺伝子からのI F N－L ポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性I F N－L 遺伝子からの新

50

たなまたは増加した I F N - L ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こし、そして／または遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサ）の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的 D N A 結合ドメインを含むポリペプチド）を、細胞の内在性 I F N - L 遺伝子からの新たなまたは増加した I F N - L ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【0235】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用な D N A 構築物に関する。特定の実施形態において、例示的な D N A 構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）調節配列、（c）エキソン、および（d）不対スプライスドナー部位。D N A 構築物中の標的配列は、エレメント（a）～（d）の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（d）は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、D N A 構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的配列、（b）調節配列、（c）エキソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター部位。ここで、標的配列は、エレメント（a）～（f）の組込みを指向し、その結果、（b）～（f）のエレメントは、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同組換えが生じる細胞染色体 D N A の予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、調節配列の 3' であり、そしてスプライスドナー部位は、このエキソンの 3' である。

【0236】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中で記載される I F N - L ポリペプチドの核酸配列）が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的な D N A の部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブの D N A の適切な制限等によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、D N A 複製の間に生じる場合、この D N A の部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、O k a z a k i フラグメントとして作用し、そして D N A の新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、I F N - L ポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

【0237】

I F N - L ポリペプチド細胞治療（例えば、I F N - L ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態の I F N - L ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このような I F N - L ポリペプチド産生細胞は、I F N - L ポリペプチドの天然産物である細胞であり得るか、または組換え細胞であって、その I F N - L ポリペプチドを産生する能力が、所望のポリペプチドをコードする遺伝子または I F N - L ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。I F N - L ポリペプチドを投与されている患者における強力な免疫学的反応を最小化するために、異種のポリペプチドの投与と共に生じる場合、I F N - L ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒト I F N - L ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、I F N - L ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒト I F N - L ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0238】

移植細胞は、周辺組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、I F N - L ポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細

胞の崩壊を防止する)の形態で患者に移植され得る。あるいは、I F N-Lポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

【0239】

生きた細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、B a e t g eら(P C T公開番号W O 9 5 / 0 5 4 5 2およびP C T / U S 9 4 / 0 9 2 9 9)は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に回収可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするD N A配列を含む組換えD N A分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、生きた細胞由来の分子のレシピエント内の特定の部位への送達を提供する。さらに、米国特許第4, 8 9 2, 5 3 8号;同第5, 0 1 1, 4 7 2号;および同第5, 1 0 6, 6 2 7号を参照のこと。生きた細胞をカプセル化するためのシステムは、P C T公開番号W O 9 1 / 1 0 4 2 5 (A e b i s c h e rら)に記載される。P C T公開番号W O 9 1 / 1 0 4 7 0 (A e b i s c h e rら);W i n nら、1 9 9 1, E x p e r. N e u r o l. 1 1 3 : 3 2 2 - 2 9 ; A e b i s c h e rら、1 9 9 1, E x p e r. N e u r o l. 1 1 1 : 2 6 9 - 7 5 ; およびT r e s c oら、1 9 9 2, A S A I O 3 8 : 1 7 - 2 3 もまた参照のこと。

10

20

【0240】

I F N-Lポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るI F N-LポリペプチドをコードするI F N-L遺伝子(ゲノムD N A、c D N Aおよび/または合成D N Aのいずれか)を使用して、「遺伝子治療D N A構築物」を形成することである。このプロモーターは、内在性I F N-L遺伝子に対してホモ接合性またはヘテロ接合性であり得る。ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療D N A構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されたD N A分子(例えば、相同組換えのために有用な内在性配列)、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞に対する選択優位性を提供し得るD N A分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なD N A分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子(例えば、細胞標的化のため)、細胞特異的内部移行因子、ベクターからの発現を増強させる転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

30

【0241】

遺伝子治療D N A構築物は、次いで、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して細胞に導入され得る(エキソビボまたはインビボのいずれか)。遺伝子治療D N A構築物を導入するための1つの手段は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターの使用による。特定のベクター(例えば、レトロウイルスベクター)は、D N A構築物を細胞の染色体D N Aに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体D N Aに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療D N A構築物は、細胞質に残る。

40

【0242】

さらに他の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるI F N-L遺伝子の制御された発現のために含められ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して作動状態にされる。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質(例えば、D N A結合タンパク質または転写活性化タンパク質)を二量化する低分子二量化剤またはラパログ(r a p a l o g)の使用を包含する(P C T公開番号W O 9 6 / 4 1 8 6 5、W O 9 7 / 3 1 8 9 8およびW O 9

50

7 / 3 1 8 9 9を参照のこと)。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0243】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体における凝集タンパク質の残留を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去し、それによって凝集体またはクラスターを特異的に破壊し、その結果、このタンパク質が細胞から分泌され得る、薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得る。Aridorら、2000, Science 287: 816-17およびRiveraら、2000, Science 287: 826-30を参照のこと。

10

【0244】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。Mifepristone (RU486)は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子のダイマーを形成することによって、転写を活性化し、次いで、核に至り、DNAに結合する。このリガンド結合ドメインは、レセプターが天然のリガンドに結合する能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5, 364, 791号、ならびにPCT公開番号WO96/40911およびWO97/10337に記載される。

20

【0245】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核にトランスロケーションし、特異的なDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含む。エクジソン系はさらに、米国特許第5, 514, 578、およびPCT公開番号WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162に記載される。

30

【0246】

別の制御手段は、陽性テトラサイクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異したtetリプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節製トランス活性化因子タンパク質を生じた変異したtet R-4アミノ酸の変化、すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でtetオペレーターに結合する）を含む。このような系は、米国特許第5, 464, 758号、同第5, 650, 298号、および同第5, 654, 168号に記載される。

【0247】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第5, 741, 679号および同第5, 834, 186号（Innovir Laboratories Inc.）に記載される。

40

【0248】

インビボ遺伝子治療は、IFN-Lポリペプチドをコードする遺伝子を、IFN-L核酸分子の局所注射によって、または他の適切なウイルス性もしくは非ウイルス性の送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Hefti, 1994, Neurobiology 25: 1418-35。例えば、IFN-Lポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに含まれ得る（例えば、Johnson, PCT公開番号WO95/34670; PCT出願番号PCT/US95/07178を参照のこと）。組換えAAVゲノムは、典型的に

50

、機能的プロモーターに作動可能に連結した I F N－L ポリペプチドをコードする D N A 配列およびポリアデニル化配列に隣接する A A V 逆方向末端反復を含む。

【0249】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、および乳頭腫ウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。米国特許第5, 672, 344号は、組換え神経栄養性H S V－1ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子転移系を記載する。米国特許第5, 399, 346号は、治療タンパク質をコードするD N Aセグメントを挿入するためにインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第5, 631, 236号（アデノウイルスベクターを含む）、同第5, 672, 510号（レトロウイルスベクターを含む）、同第5, 635, 399号（サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む）に記載される。

10

【0250】

非ウイルス性送達法としては、リポソーム媒介移入、裸のD N A送達（直接注射）、レセプター媒介移入（リガンド－D N A複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈澱、および微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療材料および方法はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサープロモーター、部位特異的組込みのために設計されたD N A配列、親細胞に対する選択優位性を提供し得るD N A配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブな選択系および発現制御系（安全性の指標）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的内部移行因子およびベクターによる発現を増強させる転写因子ならびにベクター製造の方法を含み得る。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、米国特許第4, 970, 154号（エレクトロポレーション技術を含む）、同第5, 679, 559号（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する）、同第5, 676, 954号（リポソームキャリアを含む）、同第5, 593, 875号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）、および同第4, 945, 050号（生物学的に活性な粒子がある速度で細胞に噴霧され、それによりこの粒子がこの細胞の表面を貫通し、そしてこの細胞の内側に組み込まれるプロセスを記載する）、およびP C T公開番号W O 96／40958（核リガンドを含む）に記載される。

20

30

【0251】

I F N－L 遺伝子治療または細胞治療がさらに、同じか異なる細胞における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることもまた企図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、この細胞は、単一の移植可能デバイス（例えば、上記のカプセル化膜）に含められ得るか、あるいはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0252】

遺伝子治療によって細胞における内在性I F N－Lポリペプチドの発現を増加させる手段は、I F N－Lポリペプチドプロモーターに1つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここでエンハンサーエレメントは、I F N－L遺伝子の転写活性を増加させるように働き得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することを所望する組織に基づいて選択される－その組織でプロモーター活性化を与えることが知られているエンハンサーエレメントが選択される。例えば、I F N－Lポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「作動状態になる（turned on）」場合、l c kプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、I F N－Lポリペプチドプロモーターを含むD N Aフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターお

40

50

よび／または5'および／または3'隣接配列に挿入され得る)。「相同組換え構築物」として公知のこの構築物は、次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0253】

遺伝子治療はまた、内在性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、IFN- γ ポリペプチド発現を減少させるために使用され得る。このような改変は、典型的に、相同組換え方法によって達成される。例えば、不活性化のために選択されたIFN- γ 遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および／または置換するように操作され得る。例えば、プロモーターの転写活性化因子のTATAボックスおよび／または結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、それにより対応するIFN- γ 遺伝子の転写を抑制し得る。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写活性化因子結合部位の欠失は、IFN- γ ポリペプチドプロモーター(調節されるIFN- γ 遺伝子と同じかまたは関連の種由来)のすべてまたは関連の部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび／または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および／または挿入によって変異される。結果として、TATAボックスおよび／または活性化因子結合部位は、減少した活性を有するか、または完全に不活性にされる。この構築物(これはまた、典型的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接したネイティブの(内在性)5'および3'DNA配列に対応する少なくとも約500塩基のDNAを含む)は、直接または本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞に(エキソビボまたはインビボのいずれかで)導入され得る。典型的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組込みは、相同組換えによってであり、ここで、このプロモーター構築物の5'および3'DNA配列は、内在性染色体DNAへのハイブリダイゼーションによって、改変プロモーター領域を組み込むのを助けるのに役立ち得る。

【0254】

(治療的使用)

IFN- γ の核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストを使用して、本明細書中に記載の疾患、障害または状態を含む、多くの疾患、障害または状態を処置、診断、回復または予防し得る。

【0255】

IFN- γ ポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストには、IFN- γ ポリペプチド活性を調節し、そしてこのIFN- γ ポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加させるまたは減少させるかのいずれかの分子が含まれる。アゴニストまたはアンタゴニストは、IFN- γ ポリペプチドと相互作用しそしてこれによってその活性を調節する、補因子(例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子)であり得る。ポリペプチドの潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストとしては、IFN- γ タンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むIFN- γ ポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態のいずれかと反応する、抗体が挙げられる。IFN- γ ポリペプチド発現を調節する分子としては、代表的に、発現のアンチセンスレギュレーターとして作用し得る、IFN- γ ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

【0256】

IFN- γ ポリペプチドは、公知のインターフェロンに対するIFN- γ ポリペプチドの相同性に基づいて、癌細胞の増殖および維持を制御する際に役割を果たし得る。従って、IFN- γ の核酸分子、ポリペプチドならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、癌の診断および／または処置のために有用であり得る。このような癌の例としては、慢性骨髄性白血病、毛様細胞性白血病、カポジ肉腫、黒色腫、肺癌、脳の癌、乳癌、造血系の癌、前立腺癌、卵巣癌および精巣癌が挙げられるがこれらに限定されない。他の癌は、本発明の範囲に包含される。

【0257】

I F N - L ポリペプチドは、公知のインターフェロンに対する I F N - L ポリペプチドの相同性に基づいて、免疫系の調節に役割を果たし得る。従って、I F N - L の核酸分子、ポリペプチドならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、免疫系の機能不全の診断および／または処置のために有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：多発性硬化症、慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎（*ps i o r i a t i c a r t h r i t i s*）、炎症性関節炎、変形性関節炎、炎症性関節疾患、自己免疫疾患、狼瘡、糖尿病、炎症性腸疾患、移植拒絶、および対宿主性移植片病。免疫系の機能不全によって影響を受ける他の疾患は、本発明の範囲に包含される。

【0258】

10

I F N - L ポリペプチドは、公知のインターフェロンに対する I F N - L ポリペプチドの相同性に基づいて、ウイルス感染および微生物感染の制御に役割を果たし得る。従って、I F N - L の核酸分子、ポリペプチドならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、感染の診断および／または処置のために有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：肝炎、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルスおよび慢性肉芽腫症（*g r a n u l a m a t o u s*）。感染によって引き起こされる他の疾患は、本発明の範囲に包含される。

【0259】

I F N - L ポリペプチドは、公知のインターフェロンに対する I F N - L ポリペプチドの相同性に基づいて、骨形成および骨維持の制御に役割を果たし得る。従って、I F N - L の核酸分子、ポリペプチドならびにアゴニストおよびアンタゴニストは、骨の疾患の診断および／または処置のために有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：骨粗鬆症、大理石骨砂、骨形成不全、パジェット病、歯周病および高カルシウム血症。他の骨障害は、本発明の範囲に包含される。

20

【0260】

I F N - L ポリペプチドは、公知のインターフェロンに対する I F N - L ポリペプチドの相同性に基づいて、不適切な細胞増殖に役割を果たし得る。従って、I F N - L の核酸分子、ポリペプチドならびにアゴニストおよびアンタゴニストは、異常な細胞増殖が存在する疾患の診断および／または処置のために有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：動脈硬化症および血管再狭窄。不適切な細胞増殖によって影響を受ける他の疾患は、本発明の範囲に包含される。

30

【0261】

特定の実施形態では、本発明は、分泌型もしくは可溶性のヒト *f a s* 抗原またはその組換え型（P C T 公開番号 W O 9 6 / 2 0 2 0 6 ; M o u n t z ら, 1 9 9 5 , J . I m m u n o l . , 1 5 5 : 4 8 2 9 - 3 7 ; および欧州特許第 5 1 0 6 9 1 号）と組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）I F N - L ポリペプチドの使用に関する。P C T 公開番号 W O 9 6 / 2 0 2 0 6 は、分泌型ヒト *f a s* 抗原（I g 融合タンパク質を含めて、ネイティブおよび組換え型）、可溶性組換え型ヒト *f a s* 抗原をコードするのを担う遺伝子を単離するための方法、この遺伝子を適切なベクターおよび細胞型にクローニングするための方法、ならびにこの遺伝子を発現してインヒビターを産生する方法を開示する。欧州特許第 5 1 0 6 9 1 号は、可溶性 *f a s* 抗原を含めて、ヒト *f a s* 抗原をコードする核酸、この核酸を発現するためのベクター、およびこのベクターでトランスフェクトされた形質転換体を教示する。非経口的に投与される場合、分泌型または可溶性 *f a s* 抗原融合タンパク質の用量は各々、一般に、約 $1 \mu g / k g$ ~ 約 $1 0 0 \mu g / k g$ である。

40

【0262】

本明細書中に引用される疾患および障害の処置は、疼痛および炎症の制御のための第 1 線の薬物の使用を包含し得る；これらの薬物は、非ステロイド性抗炎症薬物（N S A I D）として分類される。第 2 の処置は、コルチコステロイド、徐作用性抗リウマチ薬物（S A A R D）または疾患改変（D M）薬物を包含する。以下の化合物に関する情報は、*The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*（第 1 6

50

版、1992) および *Pharmaprojects* (PJB Publications Ltd) に見出され得る。

【0263】

特定の実施形態では、本発明は、本明細書中に引用される疾患および障害（急性および慢性の炎症（例えば、リウマチ病）ならびに対宿主性移植片病を包含する）の処置のための、IFN- γ ポリペプチドおよび1以上のNSAIDのうちのいずれかの使用に関する。NSAIDは、その抗炎症作用を、少なくとも部分的に、プロスタグランジン合成の阻害に負う（GoodmanおよびGilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*（第7版、1985））。NSAIDは、少なくとも9つの群に特徴付けられ得る：（1）サリチル酸誘導体、（2）プロピオン酸誘導体、（3）酢酸誘導体、（4）フェナム酸誘導体、（5）カルボン酸誘導体、（6）酪酸誘導体、（7）オキシカム（oxicam）、（8）ピラゾールおよび（9）ピラズロン。

10

【0264】

別の特定の実施形態では、本発明は、1以上のサリチル酸誘導体、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）IFN- γ ポリペプチドの使用に関する。このようなサリチル酸誘導体、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なその塩は、以下を包含する：アセトアミノサロール、アロキシプリン、アスピリン、ベノリラート、ブロモサリゲニン、アセチルサリチル酸カルシウム、トリサリチル酸コリンマグネシウム、サリチル酸マグネシウム、サリチル酸コリン、ジフルニサル、エテルサラート、フェンドサール、ゲンチジン酸、サリチル酸グリコール、サリチル酸イミダゾール、アセチルサリチル酸リジン、メサラミン、サリチル酸モルホリン、サリチル酸1-ナフチル、オルサラジン、パルサルミド、アセチルサリチル酸フェニル、サリチル酸フェニル、サラセタミド、サリチルアミドO-酢酸、サルサラート、サリチル酸ナトリウムおよびスルファサラジン。類似の鎮痛特性および抗炎症特性を有する、構造的に関連したサリチル酸誘導体もまた、このグループによって包含されることが意図される。

20

【0265】

さらなる特定の実施形態では、本発明は、1以上のプロピオン酸誘導体、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）IFN- γ ポリペプチドの使用に関する。このようなプロピオン酸誘導体、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なその塩は、以下を包含する：アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、デキスインドプロフェン、フェノプロフェン、フルノキサプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、フルクロプロフェン、イブプロフェン、イブプロフェンアルミニウム、イブプロキサム、インドプロフェン、イソプロフェン、ケトプロフェン、ロキソプロフェン（loxoprofen）、ミロプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピケトプロフェン、ピメプロフェン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、プロチジン酸、ピリドキシプロフェン（pyridoxipirofen）、スプロフェン、チアプロフェン酸およびチオキサプロフェン。類似の鎮痛特性および抗炎症特性を有する、構造的に関連したプロピオン酸誘導体もまた、このグループによって包含されることが意図される。

30

40

【0266】

なお別の特定の実施形態では、本発明は、1以上の酢酸誘導体、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）IFN- γ ポリペプチドの使用に関する。このような酢酸誘導体、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なその塩は、以下を包含する：アセメタシン、アルクロフェナク、アムフェナク、ブフェキサマック、シンメタシン、クロピラク、デルメタシン（delmetacin）、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、エトドラク、フェルビナク、フェンクロフェナク、フェンクロラク、フェンクロジン酸、フェ

50

ンチアザク、フロフェナク、グルカメタシン、イブフェナック、インドメタシン、イソフェゾラク、イソキセバック、ロナゾラク、メチアジン酸、オキサメタシン、オキシピナク（oxpinac）、ピメタシン、プログルメタシン、スリンダク、タルメタシン、チアラミド、チオピナク、トルメチン、トルメチンナトリウム、ジドメタシンおよびゾメピラク。類似の鎮痛特性および抗炎症特性を有する、構造的に関連した酢酸誘導体もまた、このグループによって包含されることが意図される。

【0267】

別の特定の実施形態では、本発明は、1以上のフェナム酸誘導体、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）IFN-Lポリペプチドの使用に関する。このようなフェナム酸誘導体、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なその塩は、以下を包含する：エンフェナム酸、エトフェナマート、フルフェナム酸、イソニキシン、メクロフェナム酸、メクロフェナム酸ナトリウム、メトフェナム酸（medofenamic acid）、メフェナム酸、ニフルム酸、タルニフルマート、テロフェナマート、トルフェナム酸およびウフェナマート。類似の鎮痛特性および抗炎症特性を有する、構造的に関連したフェナム酸誘導体もまた、このグループによって包含されることが意図される。

10

【0268】

さらなる特定の実施形態では、本発明は、1以上のカルボン酸誘導体、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）IFN-Lポリペプチドの使用に関する。使用され得るカルボン酸誘導体、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なその塩は、以下を包含する：クリダナク、ジフルニサル、フルフェニサル、イノリジン（inoridine）、ケトロラクおよびチノリジン。類似の鎮痛特性および抗炎症特性を有する、構造的に関連したカルボン酸誘導体もまた、このグループによって包含されることが意図される。

20

【0269】

なお別の特定の実施形態では、本発明は、1以上の酪酸誘導体、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）IFN-Lポリペプチドの使用に関する。酪酸誘導体、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なその塩は、以下を包含する：ブマジゾン、ブチブフェン、フェンブフェンおよびキセンブシン。類似の鎮痛特性および抗炎症特性を有する、構造的に関連した酪酸誘導体もまた、このグループによって包含されることが意図される。

30

【0270】

別の特定の実施形態では、本発明は、1以上のオキシカム、プロドラッグエステル、または薬学的に受容可能なその塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置または同時処置）IFN-Lポリペプチドの使用に関する。オキシカム、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なその塩は、以下を包含する：ドロキシカム、エノリカム、イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム、テノキシカムおよび4-ヒドロキシルー1, 2-ベンゾチアジン1, 1-ジオキシド4-(N-フェニル)-カルボキサミド。類似の鎮痛特性および抗炎症特性を有する、構造的に関連したオキシカムもまた、このグループによって包含されることが意図される。

40

【0271】

さらに別の特定の実施形態において、本発明は、IFN-Lポリペプチドの、任意の1つ以上のピラゾール、プロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能なそれらの塩と組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）使用に関する。使用され得るピラゾール、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なそれらの塩には：ジフェナミゾールおよびエピリゾールが挙げられる。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するピラゾールもまた、この群に包含されることが意図される。

【0272】

さらなる特定の実施形態において、本発明は、IFN-Lポリペプチドの、任意の1つ以上のピラズロン、プロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能なそれらの塩と組み合

50

わせた（前処置、後処置、または同時処置）使用に関する。使用され得るピラゾロン、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なそれらの塩には：アパゾン、アザプロパゾン、ベンズピペリロン、フェブラゾン、モフェブタゾン、モラゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、ピペブゾン、プロピルフェナゾン、ラミフェナゾン、スキシブゾン、およびチアゾリノブタゾンが挙げられる。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するピラゾロンもまた、この群に包含されることが意図される。

【0273】

別の特定の実施形態において、本発明は、IFN-Lポリペプチドの、任意の以下の1つ以上のNSAIDと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）使用に関する。

ε-アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン、アニトラザフェン、アントラフェニン、ベンダザック、ベンダザックリシネート、ベンジダミン、ベプロジン、プロペラモール、ブコローム、ブフェゾラク、シプロカゾン、クロキシマート、ダジダミン、デボキサメト、デトミジン、ジフェンピラミド (difenpiramide)、ジフェンピラミド (difenpyramide)、ジフィサラミン、ジタゾール、エモルファゾン、ファネチゾールメシラート、フェンフルミゾール、フロクタフェニン、フルミゾール、フルニキシン、フルプロカゾン、フォピルトリン、フォスフォサル、グアイメサル、グアイアゾレン、イソニキシン (isonixirn)、レフェタミンHCl、レフルノミド、ロフェミゾール、ロチファゾール、リシクロニキシナート、メセクラゾン、ナブメトン、ニクチンドール、ニメスリド、オルゴテイン、オルパノキシン、オキサセプロール、オキサパドール、パラニリン、ペリソキサル、ペリソキサルクエン酸塩、ピフォキシム、ピプロキセン、ピラゾラク、ピルフェニドン、プロカゾン、プロキサゾール、チエラビンB、チフラミゾール、チメガジン、トレクチン、トルパドール、トリプトアミド、ならびに会社コード番号で称されるNSAID（例えば、480156S、AA861、AD1590、AFP802、AFP860、AI77B、AP504、AU8001、BPPC、BW540C、CHINOIN127、CN100、EB382、EL508、F1044、FK-506、GV3658、ITF182、KCNTETI6090、KME4、LA2851、MR714、MR897、MY309、ONO3144、PR823、PV102、PV108、R830、RS2131、SCR152、SH440、SIR133、SPAS510、SQ27239、ST281、SY6001、TA60、TAI-901（4-ベンゾイル-1-インダンカルボン酸）、TVX2706、U60257、UR2301、およびWY41770。NSAIDと類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するNSAIDもまた、この群に包含されることが意図される。

【0274】

さらに別の特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載の疾患および障害（リウマチ病、対宿主性移植片病、および多発性硬化症のような急性炎症および慢性炎症を含む）の処置のための、IFN-Lポリペプチドの、任意の1つ以上のコルチコステロイド、プロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能なそれらの塩と組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）使用に関する。コルチコステロイド、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なそれらの塩には：ヒドロコルチゾンおよびヒドロコルチゾンに由来する以下のような化合物が挙げられる。21-アセトキシプレグネノロン、アルクロメラゾン、アルゲストン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、ブデソニド、クロロプレドニゾン、クロベタゾール、プロピオン酸クロベタゾール、クロベタゾン、酪酸クロベタゾン、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチコステロン、コルチゾン、コルチバゾール、デフラザコン、デソニド、デスオキシメラゾン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフロコルトロン、ジフルプレドナート、エノキソロン、フルアザコート、フルクロロニド、フルメタゾン、フルメタゾンピバレート、フルニソリド、フルシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオロシノロンアセトニド、フルオコルチンブチル、フルオコルトロン、ヘキサ酸フルオコルトロン、吉草酸ジフルコルトロン、フルオロメトロン、酢酸フルペロロン、酢酸フルプレドニデン、フルプレドニゾロ

ン、フルランデノリド、フォルモコルタール、ハルシノニド、ハロメタゾン、酢酸ハロブレドン、ヒドロコルタメート、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾン、コハク酸ヒドロコルチゾン 21-ナトリウム、ヒドロコルチゾンテブテート、マジプレドン、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾロン、モメタゾンフロエート、パラメタゾン、プレドニカルバート、プレドニゾロン、21-ジエドリアミノ酢酸プレドニゾロン、リン酸プレドニゾロンナトリウム、コハク酸プレドニゾロンナトリウム、21-m-スルホ安息香酸プレドニゾロンナトリウム、21-ステアログリコレートプレドニゾロンナトリウム、プレドニゾロンテブテート、21-トリメチル酢酸プレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニバル、プレドニリデン、21-ジエチルアミノ酢酸プレドニリデン、チキソコルトール、トリウムシノロン、トリウムシノロンアセトニド、トリウムシノロンベネトニド、およびトリアミシノロンヘキサセトニド。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するコルチコステロイドもまた、この群に包含されることが意図される。

【0275】

別の特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載の疾患および障害（リウマチ病、宿主対移植片疾患、および多発性硬化症のような急性炎症および慢性炎症を含む）の処置のための、IFN- γ ポリペプチドの、任意の1つ以上の遅効性の抗リウマチ薬物（SARD）または疾患改変性抗リウマチ薬物（DMARD）、プロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能なそれらの塩と組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）使用に関する。SARDまたはDMARD、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なそれらの塩には：アロクブレイドナトリウム、オーラノフィン、金チオグルコース、金チオグリカニド、アザチオプリン、ブレキナルナトリウム、ブシラミン、3-金チオ-2-プロパノール-1-スルホン酸カルシウム、クロラムブシル、クロロキン、クロブザリト、クプロキソリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ダブソン、15-デオキシスベルグアリン、ジアセレイン、グルコサミン、金塩（例えば、シクロキン金塩、金チオリンゴ酸ナトリウム、金チオ硫酸ナトリウム）、ヒドロキシクロロキン、硫酸ヒドロキシクロロキン、ヒドロキシ尿素、ケブゾン、レバミゾール、ロベンザリト、メリチン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ミゾリビン、ミコフェノール酸モフェチル、ミロラール、ナイトロジェンマスタード、D-ペニシラミン、ピリジノールイミダゾール（例えば、SKNF86002およびSB203580）、ラパマイシン、チオール類、チモポイエチン、およびピンクリスチン。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するSARDまたはDMARDもまた、この群に包含されることが意図される。

【0276】

別の特定の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載の疾患および障害（急性炎症および慢性炎症を含む）の処置のための、IFN- γ ポリペプチドの、任意の1つ以上のCOX2インヒビター、プロドラッグエステルまたは薬学的に受容可能なそれらの塩と組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）使用に関する。COX2インヒビター、プロドラッグエステルおよび薬学的に受容可能なそれらの塩の例としては、例えば、セレコキシブが挙げられる。類似の鎮痛および抗炎症特性を有する、構造的に関連するCOX2インヒビターもまた、この群に包含されることが意図される。

【0277】

さらに別の特定の実施形態において、本発明は、急性および慢性炎症を含む、本明細書中に記載される疾患および障害の処置のための、1つ以上の抗菌剤、プロドラッグエステル、またはその薬学的に受容可能な塩のいずれかと組み合わせた（前処置、後処置、または同時処置）、IFN- γ ポリペプチドの使用に関する。抗菌剤としては、例えば、ペニシリン、セファロスポリンおよび他の β -ラクタム、アミノ配糖体、アゾール、キノロン類、マクロライド、リファマイシン、テトラサイクリン、スルホンアミド、リンコサミド（lincosamide）およびポリミキシンの広範なクラスが挙げられる。ペニシリンは、以下を含むがこれらに限定されない：ペニシリンG、ペニシリンV、メチシリン、

ナフシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フロキサシリン、アンピシリン、アンピシリン／スルバクタム、アモキシリン、アモキシリン／クラブラン酸、ヘタシリン、シクラシリン (cyclacillin)、バカンピシリン、カルベニシリン、カルベニシリンインダニル (carbenicillin indanyl)、チカルシリン、チカルシリン／クラブラン酸、アズロシリン、メズロシリン、ピペラシリン (peperacillin)、およびメシリナム。セファロスポリンおよび他のβ-ラクタムとしては、以下を含むがこれらに限定されない：セファロチン、セファピリン、セファレキシン、セフラジン、セファゾリン、セファドロキシル、セファクロール、セファマンドール、セフォテタン、セフォキシチン、セルロキシム (ceruroxime)、セフォニシド、セフォラジン (ceforadine)、セフィキシム、セフォタキシム、モキサラクタム、セフチゾキシム、セトリアキソン (cetriaxone)、セフォペラゾン (cephoperazone)、セフトジジム、イミペネムおよびアズトレオナム。アミノ配糖体としては、以下を含むがこれらに限定されない：ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ネチルマイシン、カナマイシンおよびネオマイシン。アゾールとしては、フルコナゾールを含むがこれに限定されない。キノロン類としては、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、エノキサシン、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシンおよびテマフロキサシンを含むがこれらに限定されない。マクロライドとしては、エリスロマイシン (erythromycin)、スピラマイシンおよびアジスロマイシンを含むがこれらに限定されない。リファマイシンとしては、リファンピンを含むがこれに限定されない。テトラサイクリンとしては、スピサイクリン (spicycline)、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン、デメクロサイクリン、デオキシサイクリン (deoxycycline)、グアメサイクリン (guamecycline)、リメサイクリン、メクロサイクリン、メタサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、ペニメピサイクリン (penimepicycline)、ピパサイクリン、ロリテトラサイクリン、サンサイクリン、セノサイクリン (senocyclin) およびテトラサイクリンを含むがこれらに限定されない。スルホンアミドとしては、スルファニルアミド、スルファメトキサゾール、スルファセタミド、スルファジアジン、スルフィソキサゾールおよびコートリモキサゾール (トリメトプリム／スルファメトキサゾール) を含むがこれらに限定されない。リンコサミドとしては、クリンダマイシンおよびリンコマイシンを含むがこれらに限定されない。ポリミキシン (ポリペプチド) としては、ポリミキシンBおよびコリスチンを含むがこれらに限定されない。

【0278】

IFN-Lポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適切であるように、1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および／または化学療法剤と組み合わせて（同時にまたは連続的に）使用され得る。

【0279】

望ましくないレベルのIFN-Lポリペプチドによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。望ましくないレベルとしては、過剰レベルのIFN-Lポリペプチド、および正常以下 (sub-normal) のレベルのIFN-Lポリペプチドが挙げられる。

【0280】

（IFN-L核酸およびIFN-Lポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）を使用して、IFN-L遺伝子および関連遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）により行われ得る。

【0281】

IFN-L核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、哺乳動物組織または体液サンプル中のIFN-L核酸分子の存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイ

10

20

30

40

50

ゼーションプローブとして有用であり得る。

【0282】

他の方法はまた、1つ以上のIFN-Lポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）またはIFN-L mRNAに対して、相補的かつハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。例えば、アンチセンスDNAまたはRNA分子（これらは、IFN-L遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する）は、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるIFN-L遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各IFN-L遺伝子の開始部位（5'末端）に相補的である。このアンチセンス分子が次いで、対応するIFN-L mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は、防止されるかまたは低減される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるIFN-Lポリペプチドの減少または不在に関連する情報を提供する。

10

【0283】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上のIFN-Lポリペプチドの優性ネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択されたIFN-Lポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAは、調製され得、そして本明細書中に記載されるウイルスまたは非ウイルスの方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的にはその生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

20

【0284】

さらに、IFN-Lポリペプチド（生物学的に活性でも活性でなくても）免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、抗体が誘発され得る少なくとも1つのエピトープを含有する。IFN-Lポリペプチドに結合する選択的結合因子（本明細書中に記載されるような）は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中のIFN-Lポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体をまた使用して、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む多数の疾患および障害を、予防、処置、または診断し得る。これらの抗体は、IFN-Lポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を低減するかまたは遮断するように、IFN-Lポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合してIFN-Lポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を増加し得る（IFN-Lポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む）。

30

【0285】

本発明のIFN-Lポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを使用して、IFN-Lポリペプチドレセプターをクローン化するために使用され得る。放射性標識（¹²⁵I）IFN-Lポリペプチドまたはアフィニティ/活性タグ化IFN-Lポリペプチド（例えば、Fc融合物またはアルカリホスファターゼ融合物）を、結合アッセイにおいて使用して、IFN-Lポリペプチドレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離されたRNAは、cDNAに変換され得、哺乳動物発現ベクターにクローン化され、そして哺乳動物細胞（例えば、COSまたは293細胞）にトランスフェクトされて発現ライブラリーを作製する。放射性標識またはタグ化されたIFN-Lポリペプチドは、次いで、アフィニティリガンドとして使用されて、このライブラリーから、その表面上にIFN-Lポリペプチドレセプターを発現する細胞のサブセットを同定および単離し得る。DNAは、次いでこれらの細胞から単離され得、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトされて二次発現ライブラリー（ここで、IFN-Lポリペプチドレセプターを発現する細胞の画分は、元のライブラリーよりも何倍も高い）を作製し得る。この富化プロセスは、IFN-Lポリペプチドレセプターを含有する単一の組換えクローンが単離されるまで繰り返し反復され得る。IFN-Lポリペプチドレセプターの単離は、IFN-Lポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニス

40

50

トおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性 I F N - L ポリペプチドレセプター、抗 I F N - L ポリペプチドレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれ、そしてこれらは、本明細書中に記載される疾患または障害の 1 つ以上を、処置、予防、または診断するために使用され得る。

【0286】

p S P O R T 1 (G i b c o B R L) 中にサブクローニングされ、そして E . c o l i D H 1 0 B 株にトランスフェクトされた、ヒト I F N - L ポリペプチドをコードする c D N A の寄託 (受託番号 P T A - 9 7 6 を有する) を、1999 年 1 1 月 2 3 日付けで、アメリカン タイプ カルチャー コレクション、バージニア 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9 , マナサス, ユニバーシティ プールバード 1 0 8 0 1 に行った。 10

【0287】

以下の実施例は、例示目的のみのために意図され、いかようにも、本発明の範囲を限定するとは解釈されるべきではない。

【0288】

(実施例 1 : ラット I F N - L ポリペプチド遺伝子のクローニング)

概して、S a m b r o o k ら (前出) に記載されるような材料および方法を、ラット I F N - L ポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングおよび分析するために使用した。

【0289】

ラット I F N - L ポリペプチドをコードする配列を、コンピューター支援分析 (c o m p u t e r - a s s i s t e d a n a l y s i s) と組み合わせて大規模無作為 c D N A 配列決定によって、ラット胎盤 c D N A ライブラリーから単離した。ラット胎盤 c D N A ライブラリーを構築するために、ラット胚 (1 7 日齢) [E 1 7] 胎盤 m R N A を、標準的な方法によって調製した (C h o m c z y n s k i および S a c c h i , 1 9 8 7 , A n a l . B i o c h e m . 1 6 2 : 1 5 6) 。 S u p e r s c r i p t P l a s m i d c D N A k i t (G i b c o B R L) を使用して合成した後、ラット c D N A を、p S P O R T 1 ベクター (G i b c o B R L) の S a l I および N o t I 部位にサブクローニングした。 20

【0290】

ラット I F N - L ポリペプチドについての全長 c D N A の配列分析によって、この遺伝子が、191 アミノ酸のタンパク質をコードする 573 b p のオープンリーディングフレームを含むことが示された (図 1 A ~ 1 B) 。このラット I F N - L ポリペプチド配列は、シグナルペプチドを含むことが予測されている (図 1 A 、下線によって示される推定シグナルペプチド) 。ラット I F N - L ポリペプチド配列は、G e n B a n k データベースにおけるタンパク質配列とのラット I F N - L ポリペプチド配列の比較後に、インターフェロンタンパク質ファミリーの新規なメンバーであるとして同定された。 30

【0291】

(実施例 2 : ヒト I F N - L ポリペプチド遺伝子のクローニング)

概して、S a m b r o o k ら (前出) に記載されるような材料および方法を、ヒト I F N - L ポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングおよび分析するために使用した。 40

【0292】

インターフェロン遺伝子ファミリーの既知のメンバーのゲノム構造を調べることによって、このファミリーのメンバーが、固有のイントロン不在 (i n t r o n l e s s) 構造を共有することが明らかにされた。従って、ヒト I F N - L ポリペプチドをコードする配列を、ラット I F N - L ポリペプチド遺伝子由来のプロブを用いてヒトゲノム D N A ライブラリーをスクリーニングすることによって単離した。

【0293】

放射性ラット I F N - L プロブを、ラット I F N - L ポリペプチド c D N A のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅によって作製した。ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を、P e r k i n - E l m e r 9 6 0 0 サーモサイクラー (P E B i o s y s t e m s , F 50

oster City, CA) および以下の反応条件を使用して実施した: 20 ng のラット IFN- γ L ポリペプチド cDNA、各々 20 pmol のプライマー 1795-01 (5'-A-T-G-A-C-A-C-T-G-A-A-G-T-A-T-T-T-A-T-G-G-3'; 配列番号 20) および 1795-02 (5'-A-T-T-C-A-T-G-T-T-G-A-G-T-A-G-T-T-T-G-T-A-3'; 配列番号 21)、各々 1 mmol の dATP, dTTP, dGTP、0.01 mmol の dCTP、100 μ Ci の 32 P-dCTP、4 mM の MgCl₂、1×PCR 緩衝液、ならびに 5 U の Taq ポリメラーゼ (PE Biosystems)。「コールド (cold)」PCR 反応 (すなわち、放射性標識化 dCTP の存在下において実施されず、かつ平衡状態の dNTP 混合物を使用する反応) を、標識化反応と同時に調製した。増幅反応を、94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間、および 72°C で 1 分間の 45 サイクルで実施した。プールされた標識化および非標識化のプローブを、Quick Spin G-50 カラム (Qiagen) を使用して精製し、100°C で 10 分間煮沸し、そして氷上にて 20 分間冷却し、次いで、ハイブリダイゼーション溶液に添加した。少なくとも 5×10⁵ cpm/ μ L の特異的活性を有するプローブを、この方法を使用して作製した。

【0294】

ヒト IFN- γ L ポリペプチドをコードする配列を、ヒトゲノム DNA ライブラリー (Stratagene, カタログ番号 946206) をスクリーニングすることによって単離した。一次スクリーニングのために、1×10⁶ 個のクローンを、50,000 コロニー/プレートの密度でプレーティングし、そして標準的な技術を使用して、ニトロセルロースフィルターに転写した。ポジティブクローンを、分析前に再スクリーニングした。

【0295】

ラット IFN- γ L プローブを、30%ホルムアミド、5×SSC、2×デンハルト溶液、10 μ g/mL のサケ精子 DNA、0.2% SDS、2 mM EDTA、および 0.1% ピロリン酸塩中において 42°C で一晩、このフィルターにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを、1×SSC および 0.1% SDS 中において室温で 30~60 分間洗浄し、次いで、0.2×SSC および 0.1% SDS 中において 55°C で 15 分間洗浄した。

【0296】

3 個のポジティブクローンを、一次スクリーニングおよび二次スクリーニングの後に回収し、そして、 λ ファージ DNA を、固体プレート培養方法によって調製した。Not I 挿入物を、このクローンから切り出し、そして pSPORT1 (GibcoBRL) 中に連結し、そして引き続き、これらの連結物を使用して、E. coli DH10 株を形質転換した。形質転換後、プラスミドを、Spin Column plasmid prep kit (Qiagen) を使用して回収した。

【0297】

3 個のポジティブゲノム DNA クローン由来のプラスミドを、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングにおいて利用したラット IFN- γ L プローブを使用するサザンブロット分析によって分析した。回収したプラスミド DNA を Hind III で消化した後、消化されたフラグメントを、アガロースゲルにおいて分解し、次いで、ナイロンメンブレンに転写した。ハイブリダイゼーション条件は、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングにおいて利用された条件と同一であった。サザンブロット分析によって、3 個のポジティブゲノムクローンは、同一のゲノム挿入物を含む可能性が高いことが示された。ラット IFN- γ L プローブとハイブリダイズするフラグメントを、引き続き、配列決定分析のために、pSPORT1 中にサブクローニングした。この分析によって、3 個のポジティブゲノム DNA クローンは、同一のゲノム挿入物を含むことが確認された。

【0298】

ヒト IFN- γ L ポリペプチドをコードする配列を含む 3 個のゲノムクローンの配列分析によって、この遺伝子が、207 アミノ酸のタンパク質をコードする 621 pb のオープンリーディングフレームを含むことが示された (図 2A~2B)。このヒト IFN- γ L ポ

リペプチド配列は、シグナルペプチドを含むことが予測された（図2A、下線によって示される推定シグナルペプチド）。IFN- γ ポリペプチドの配列分析は、このタンパク質が、分泌されるサイトカイン分子であることを強く示唆している。

【0299】

64%の類似性が、ヒトIFN- γ 遺伝子のオープンリーディングフレームとラットIFN- γ cDNAのオープンリーディングフレームとの間で観察された。図3は、ヒトIFN- γ ポリペプチド（配列番号2）と、ヒトIFN- β （配列番号7）と、ラットIFN- γ ポリペプチド（配列番号4）とのアミノ酸配列アラインメントを示す。ヒトIFN- γ ポリペプチドは、ヒトIFN- β に対して30%同一性である。ヒトIFN- γ ポリペプチドは、ラットIFN- γ ポリペプチドに対して40.5%同一性であり、そして50%類似性である。ヒトIFN- γ ポリペプチド中の5つすべての推定システイン残基は、ラットIFN- γ ポリペプチド中のそれらのシステイン残基と完全に一致する。

【0300】

（実施例3：IFN- γ mRNA発現）

IFN- γ mRNAの発現的発現パターンを、いくつかの異なる段階のマウスおよびラットの胚においてIFN- γ ポリペプチド転写物の存在を検出するための³²P-標識化全長ラットcDNAプローブを使用するノーザンブロット分析によって決定した。ラット胎盤cDNAライブラリーの構築のために使用されたのと同じ技術を使用して、ラットおよびマウスの胚からRNAを単離した。ノーザンブロットを、40%ホルムアミド、5×SSC、1mM EDTA、および0.1%中において、42℃にて4時間、プレハイブリダイゼーションした。このブロットを、ラットIFN- γ プローブを添加したことを除いて同じ溶液中において、42℃にて一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、ブロットを、1×SSCおよび0.1% SDS中において60℃にて30分間洗浄した。

【0301】

IFN- γ mRNAの発現を、標準的な技術を使用するRT-PCRによって、種々のヒト組織において試験した。ヒトIFN- γ mRNAは、脾臓、小腸、前立腺、子宮、甲状腺および胎盤において検出された。

【0302】

IFN- γ mRNAの発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化した。正常胚および成体マウス組織のパネルを4%パラホルムアミド中で固定し、パラフィンに包埋し、そして5μmに切片化した。切片化した組織を、0.2M HCl中で透過処理し、プロテイナーゼKで消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化した。切片を、ハイブリダイゼーション溶液（300mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH 8.0、5mM EDTA、1×デンハルト溶液、0.2% SDS、10mM DTT、0.25mg/ml tRNA、25μg/ml ポリA、25μg/ml ポリCおよび50%ホルムアミド）中で1時間60℃でプレハイブリダイズし、次いで、10%デキストランおよび2×10⁴ cpm/μlの³²P-標識アンチセンスリボプローブ（ヒトIFN- γ 遺伝子に相補的）を含有する同じ溶液中で60℃で一晩ハイブリダイズする。標準的技術を用いて、ヒトIFN- γ cDNA配列を含有するクロンのインビトロ転写によって、このリボプローブを得る。

【0303】

ハイブリダイゼーション後、切片を、ハイブリダイゼーション溶液中でリンスし、RNase Aで処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで0.1×SSC中で55℃で30分間洗浄する。次いで、切片をNTB-2エマルジョン（Kodak, Rochester, NY）に浸し、4℃に3週間曝し、発色させ、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色する。組織形態学およびハイブリダイゼーションシグナルを、脳（矢状断面1つおよび冠状断面2つ）、胃腸管（食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸、および遠位結腸）、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、脾臓、唾液腺、雄性および雌性生殖器（雌性の卵巣、卵管、および子宮；な

10

20

30

40

50

らびに雄性の精巣、精巣上体、前立腺、精囊および輸精管)、B A TおよびW A T (皮下、腎臓周囲)、骨 (大腿)、皮膚、乳房、および骨格筋についての暗野かつ標準のイルミネーションによって同時に分析する。

【0304】

(実施例4: I F N-Lポリペプチドの生成)

(A. 細菌における I F N-Lポリペプチドの発現)

P C Rを用いて、ヒトまたはラットのいずれかの I F N-LポリペプチドをコードするテンプレートD N A配列を、この配列の5'および3'末端に対応するプライマー (表1)を用いて増幅し、これは、増幅したD N A産物の発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を組み込んだ。増幅後に、P C R産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的な組換えD N A技術を用いて発現ベクターp A M G 2 1 (A T C C番号98113)へ連結した。P C Rインサートとベクター配列の連結後、連結反応混合物を使用して、エレクトロポレーションによってE. c o l i宿主株 (例えば、A m g e n株番号2596)中に形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン薬物耐性について選択した。選択したコロニー由来のプラスミドD N Aを、単離し、そしてD N A配列決定に供して適切なインサート (挿入物)の存在を確認した。

10

【0305】

ラット I F N-Lポリペプチド細菌発現ベクターを構築するために、I F N-L核酸配列をプライマー1825-22および1825-21を用いてc D N Aテンプレートから増幅した。これらのプライマーによる増幅後に得られたP C R産物を、p A M G 2 1のN d e I部位およびB a m H I部位に挿入し、次いで連結反応を細菌形質転換において用いた。得られた細菌クローンをA m g e n株番号3729と名付けた。図4は、A m g e n株番号3729のp A M G 2 1インサートのヌクレオチド配列およびこのインサートによってコードされる予測アミノ酸配列を示す。

20

【0306】

ラット I F N-Lポリペプチド細菌発現ベクター (ここでは、位置180のシステインがセリン残基で置換された)を、プライマー1825-22および1909-56を用いて構築した。これらのプライマーによる増幅後得られたP C R産物を、p A M G 2 1のN d e I部位およびB a m H I部位に挿入し、次いで連結反応を細菌形質転換において用いた。

30

【0307】

【表 3】

Table I

配列 ID	オリゴヌクレオチド ID	配列
22	1825-22	5'-GAATAACATATGTGTATATCTCGATCATACTATCTTGGAGATATG-3'
23	1825-21	5'-CCGCGGATCCATTAAATTCATGTTTCAGCAGTTTGTAAAAAATACTGAAACAACGACGAAATTTCC-3'
24	1909-56	5'-CCGCGGATCCATTAAATTCATGTTTCAGCAGTTTGTAAAAAATACTGAAAGAACGACGAAATTTCC-3'
25	1967-32	5'-TTGATCTAGAAAGGAGGAATAACATATGTGTAACTGCTGAACGTTTCCCTGCGTCGTGTTACCTGG-3'
26	1982-14	5'-CCGCGGATCCATTATTTACGACGGAAACAGAGCGGTAAATTTGTAAAAGTAGTACAGGCAACGACGATTTCC-3'
27	1967-33	5'-CCGCGGATCCATTATTTACGACGGAAACAGAGCGGTAAATTTGTAAAAGTAGTACAGAGAACGACGATTTCC-3'
28	2103-87	5'-AAGGAGCATATGCTGGACTGTAACTGCTGAACGTTTCAC-3'
29	1200-54	5'-GTTATTGCTCAGCGGTGGCA-3'

【0308】

得られた細菌クローンを Amgen 株番号 3858 と名付けた。図 5 は、Amgen 株番号 3858 の pAMG21 インサートのヌクレオチド配列およびこのインサートによってコードされる予測アミノ酸配列を示す。

【0309】

10

20

30

40

50

ヒト I F N - L ポリペプチド細菌発現ベクターを構築するために、I F N - L 核酸配列をプライマー 1 9 6 7 - 3 2 および 1 9 8 2 - 1 4 を用いて c D N A テンプレートから増幅した。これらのプライマーによる増幅後に得られた P C R 産物を、p A M G 2 1 の X b a I 部位および B a m H I 部位に挿入し、次いで連結反応を細菌形質転換において用いた。得られた細菌クローンを A m g e n 株番号 4 0 4 7 と名付けた。図 6 は、A m g e n 株番号 4 0 4 7 の p A M G 2 1 インサートのヌクレオチド配列およびこのインサートによってコードされる予測アミノ酸配列を示す。

【0310】

ヒト I F N - L ポリペプチド細菌発現ベクター（ここでは、位置 1 9 3 のシステインがセリン残基で置換された）を、プライマー 1 9 6 7 - 3 2 および 1 9 6 7 - 3 3 を用いて構築した。これらのプライマーによる増幅後得られた P C R 産物を、p A M G 2 1 の X b a I 部位および B a m H I 部位に挿入し、次いで連結反応を細菌形質転換において用いた。得られた細菌クローンを A m g e n 株番号 3 9 6 9 と名付けた。図 7 は、A m g e n 株番号 3 9 6 9 の p A M G 2 1 インサートのヌクレオチド配列およびこのインサートによってコードされる予測アミノ酸配列を示す。

【0311】

ヒト I F N - L ポリペプチドの N 末端改変を発現しているヒト I F N - L ポリペプチド細菌発現ベクターを、プライマー 1 9 6 7 - 3 2 および 1 9 6 7 - 3 3 によって株番号 4 0 4 7 からプラスミドを増幅することによって構築した。これらのプライマーによる増幅後得られた P C R 産物を、p A M G 2 1 の N d e I 部位および B a m H I 部位に挿入し、次いで連結反応を細菌形質転換において用いた。得られた細菌クローンを A m g e n 株番号 4 1 8 2 と名付けた。図 8 は、A m g e n 株番号 4 1 8 2 の p A M G 2 1 インサートのヌクレオチド配列およびこのインサートによってコードされる予測アミノ酸配列を示す。

【0312】

I F N - L ポリペプチドを生成するために、形質転換された宿主細胞を、まず、I F N - L ポリペプチドの導入前に、5 0 μ g / m L のカナマイシンを含有する T e r r i f i c B r o t h 培地で 3 0 ° C でインキュベートする。I F N - L ポリペプチドの発現を、3 0 n g / m L の N - (3 - オキソヘキサノイル) - d l - ホモセリンラク톤の添加、それに続く 3 0 ° C かまたは 3 7 ° C での 6 時間のインキュベーションによって、誘導した。I F N - L ポリペプチドの発現を、培養物、細菌ペレットの再懸濁および溶解物の遠心分離、ならびに、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価した。

【0313】

E . c o l i が産生した I F N - L ポリペプチドに相当する、S D S ポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そして N 末端アミノ酸配列を、本質的に M a t s u d a i r a ら、1 9 8 7 , J . B i o l . C h e m . 2 6 2 : 1 0 ~ 3 5 に記載のように決定した。

【0314】

I F N - L ポリペプチドを、以下の通り精製した。まず、細胞を高圧均質化によって、水中で溶解し、封入体を遠心分離によって収集した。次いで、可溶化した封入体を種々の折り畳み (r e f o l d) 条件に供した。

【0315】

(B . I F N - L ポリペプチド哺乳動物発現ベクターの構築)

ヒトとラットの両方の I F N - L ポリペプチドのネイティブタンパク質およびネイティブタンパク質 F c 融合バージョンを、C H O 2 9 3 のいずれかの哺乳動物発現系において生成した。I F N - L ポリペプチドをコードするテンプレート D N A 配列を、5 ' および 3 ' 末端に対応するプライマーを用いて P C R によって増幅した (表 2) 。

【0316】

I F N - L ポリペプチド発現ベクターを構築するために、I F N - L 核酸配列を以下に

記載するように増幅した。ラット I F N - L 核酸配列を 3 つのプライマーの対の 1 つ（順方向プライマー 1 8 4 7 - 7 7、および 1 8 4 7 - 8 8、1 8 9 6 - 5 6、または 1 8 9 6 - 5 7 のいずれか）を用いて得た。ラット I F N - L ポリペプチド F c 融合構築物を、第 1 のセットのプライマー（これは、H i n d I I I および N o t I クローニング部位を取り込み、そして終止コドンを取り込まなかった）で調製された P C R 産物をクローニングすることによって生成した。第 2 のセットのプライマー（これは、H i n d I I I および S a l I クローニング部位ならびに 2 つの終止コドンを組み込んだ）で調製された P C R 産物を、p D S R α にクローニングすることによって、または第 3 のセットのプライマー（これは、H i n d I I I および N o t I クローニング部位ならびに 2 つの終止コドンを組み込んだ）で調製された P C R 産物を、p D S R 4 にクローニングすることによって、ラット I F N - L 可溶ポリペプチドを生成した。 10

【 0 3 1 7 】

【表 4】

Table II

配列 ID	オリゴヌクレオチド ID	配列
30	1847-77	5'-CCCAAGCTTACCATGACACTGAAGTATTATG-3'
31	1847-78	5'-AAGGAAAAAGCGCGCCGATTCATGTTGAGTAG-3'
32	1896-56	5'-ACGCGTCGACTCATCAATTCATGTTGAGTAGTTTG-3'
33	1896-57	5'-AAGGAAAAAGCGCGCCGCTCATCAATTCATGTTGAGTAG-3'
34	1954-45	5'-ACGCGTCGACTTATTATTTCCTCCTGAATAG-3'
35	1954-46	5'-AAGGAAAAAGCGCGCCTTATTATTTCCTCCTGAATAGAGC-3'
36	1955-44	5'-CCCAAGCTTACCATGACAGCACCACCTGATATG-3'
37	1954-47	5'-CCCAAGCTTACCATGATTCAAAAAGTGTGTTGTGGC-3'
38	1954-48	5'-AAGGAAAAAGCGCGCCGCGGCCCTCGATTTTCCTCCTGAATAGAGCTGTAA-3'
39	1954-49	5'-AAGGAAAAAGCGCGCCGCTTTTCCTCCTGAATAGAGCTGTAA-3'

【0318】

ヒトIFN- γ L 核酸配列を、3つのプライマーの対の1つ（順方向1854-48および1854-49、および順方向プライマー1855-44、および1854-45または1854-46のいずれか）を用いて得た。ヒトIFN- γ LポリペプチドFc融合構築物を、第1のセットのプライマー（これは、Not I クローニング部位を取り込み、そして終止コドンを取り込まなかつ、そして第Xa因子切断部位を取り込んだ）で調製されたPCR産物をクローニングすることによって生成した。第2のセットのプライマー（これは、Hind III およびSal I クローニング部位ならびに2つの終止コドンを組み込んだ）で調製されたPCR産物を、pDSR α にクローニングすることによって、ま

10

20

30

40

50

たは第3のセットのプライマー（これは、H i n d I I IおよびN o t I クローニング部位ならびに2つの終止コドンを組み込んだ）で調製されたPCR産物を、p D S R 4にクローニングすることによって、ヒトI F N-L可溶ポリペプチドを生成した。第2の順方向プライマー（1954-47）をまた、1955-44の代わりに使用し、2つの開始コドンを保する構築物を生成した。

【0319】

PCR増幅を、P e r k i n-E l m e r 9600サーモサイクラーおよび以下の反応条件を用いて実施した：ラットまたはヒトI F N-Lポリペプチドc D N A 20ng、各適切なプライマー20pmol、d N T P 1mmol、M g C l₂ 4mM、1×PCR緩衝液、およびT a qポリメラーゼ 5U（P E B i o s y s t e m s）。増幅反応を、94℃で30秒間、50℃で30秒間、および72℃で1分間4サイクルの間実施し、続いて94℃で30秒間、55℃で30秒間、そして72℃で1分間26サイクルの間実施した。

10

【0320】

PCR産物をQ i a g e n PCR精製スピncラムを用いて精製し、次いで、適切な制限エンドヌクレアーゼによる消化に供した。消化後、フラグメントをアガロースゲル上で分離し、Q i a g e nゲル精製スピncラムを用いて精製し、そして適切なベクターに連結した。連結物を、E. c o l i株D H 10に形質転換した。選択された形質転換株の配列分析後、大規模なプラスミド貯蔵物を、組織培養トランスフェクションのために調製した。

20

【0321】

（C. 哺乳動物細胞におけるI F N-Lポリペプチドの発現および精製）

リポフェクチンまたはリン酸カルシウムプロトコルのいずれかを用いて、293 E B N A細胞またはC H O細胞中に、I F N-Lポリペプチド発現構築物を導入した。

【0322】

生成されるI F N-Lポリペプチドに対する機能的研究を行うため、ハイグロマイシン選択293 E B N Aクローニングのプールから大量の馴化培地を生成した。この細胞を500cm N u n c T r i p l e F l a s k s中で、80%コンフルエンスになるまで培養し、その後、培地を回収する1週間前に無血清培地に切り換えた。馴化培地を回収し、そして精製まで-20℃に凍結した。

30

【0323】

馴化培地を下記のとおり、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。この培地を解凍し、次いで0.2μmフィルターに通した。プロテインGカラムをP B Sでp H 7.0に平衡化し、次いで濾過した培地をロードした。このカラムをA₂₈₀の吸収がベースラインに達するまでP B Sで洗浄した。0.1M G l y c i n e-H C lを用いてp H 7.2でI F N-Lポリペプチドを、カラムから溶出し、直ちに1M T r i s-H C lを用いてp H 8.5で中和した。I F N-Lポリペプチドを含有する画分をプールし、P B S中で透析し、そして-70℃で貯蔵した。

【0324】

ヒトI F N-Lポリペプチド-F c融合ポリペプチドの第X a因子切断について、アフィニティークロマトグラフィー精製したタンパク質を、50mM T r i s-H C l、100mM N a C l、2mM C a C l₂中でp H 8.0で透析する。制限プロテアーゼ第X a因子を、透析したタンパク質に1/100（w/w）で添加し、そしてこのサンプルを室温で一晩消化した。

40

【0325】

（実施例5：I F N-Lポリペプチドの生物学的活性）

I F N-Lポリペプチドのリン酸化を、以下のようにアッセイした。細胞株を、実施例4Cにおいて生成したラットI F N-L F c融合ポリペプチド1μg/mLか、またはコントロール溶液に、37℃で15分間暴露した。I F N-Lポリペプチド暴露後、細胞を溶解し、そして細胞タンパク質を回収し、そしてS D S-P A G Eによって分離した。

50

次いで、分離したタンパク質を抗 p T y r 抗体を用いてウエスタンブロットによって分析した。いくつかの細胞株は、I F N - L F c 融合ポリペプチドへの暴露後、細胞タンパク質リン酸化において増加を示した。

【0326】

(実施例6：抗 I F N - L ポリペプチド抗体の生成)

I F N - L ポリペプチドに対する抗体を、生物学的合成または化学的合成によって生成した、精製タンパク質または I F N - L ペプチドを用いて免疫することによって獲得し得る。抗体を生成するための適切な手順は、Hudson および Bay、Practical Immunology (第二版、Blackwell Scientific Publications) に記載の手順を含む。

10

【0327】

抗体生成のための1つの手順において、動物(代表的には、マウスまたはウサギ)に、I F N - L 抗原(例えば、I F N - L ポリペプチド)を注射し、そして、ハイブリドーマ産生のため、E L I S A によって決定した十分な血清力価レベルを有する動物を、選択する。免疫した動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁液として調製し、これから脾臓細胞を回収する。脾臓細胞をマウスミエローマ細胞(例えば、S p 2 / 0 - A g 1 4 細胞)に融合し、D M E M (200 U / m L ペニシリン、200 μ g / m L 硫酸ストレプトマイシン、および4 m M グルタミン含有)中でまずインキュベートし、次いで、H A T 選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を各融合ウェルから取り出し、そしてE L I S A によって、抗 I F N - L

20

【0328】

抗 I F N - L を得るため、別の手順をまた、使用し得る。この手順は例えば、ヒト抗体の生成のためのヒト I g 遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー(例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって生成されるライブラリーなど)のスクリーニングである。

【0329】

(実施例7：トランスジェニックマウスにおける I F N - L ポリペプチドの発現)

I F N - L ポリペプチドの生物学的活性を評価するため、肝臓特異的 A p o E プロモーターの制御下で、I F N - L ポリペプチド / F c 融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達により、I F N - L ポリペプチドの機能に関する情報である、病理的変化を生じることが期待される。同様に、 β アクチンプロモーターの制御下で、全長 I F N - L ポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達により、偏在性発現を生じることが期待される。

30

【0330】

これらの構築物を生成するために、P C R を用いて、所望の配列の5'および3'末端に対応し、そしてプライマーを用いて I F N - L ポリペプチドをコードするテンプレート D N A 配列を増幅し、そしてこの配列は、発現ベクター内への増幅産物の挿入を可能にするために制限酵素部位を組み込む。増幅後、P C R 産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組み換え D N A 技術を用いて発現ベクター中に連結する。例えば、増幅した I F N - L ポリペプチド配列を、Graham ら、1997、Nature Genetics, 17: 272~74 および Ray ら、1991 Genes Dev. 5: 2265~73 に記載のように、ヒト β アクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

40

【0331】

連結(ライゲーション)後、反応混合物を用いて、E. coli 宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミド D N A を単離して、D N A 配列決定に供し、適切なインサートの存在および変異が存在しないことを確認する。I F N - L ポリペプチド発現ベクターを、2回の C s C l 密度勾配遠心分離を通じて精製し、適切な制限酵素で切断し、そし

50

て、I F N - L ポリペプチド導入遺伝子を含む直線フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを、5 mM T r i s (p H 7 . 4) および 0 . 2 mM E D T A 中で、2 m g / m L の濃度で、再懸濁する。

【0332】

B D F 1 × B D F 1 交配マウス由来の単一細胞胚を、記載 (P C T 公開番号 W O 9 7 / 2 3 6 1 4) のように注射する。胚を、C O ₂ インキュベーター中で一晩培養し、そして 1 5 ~ 2 0 の 2 細胞胚を偽妊娠 C D 1 雌性マウスの卵管に移す。マイクロインジェクションした胚の着床から得た子孫を、以下のように、ゲノム D N A サンプル中に取り込んだ導入遺伝子の P C R 増幅でスクリーニングする。耳切片を 2 0 m L の耳緩衝液 (2 0 mM T r i s , p H 8 . 0 , 1 0 mM E D T A , 0 . 5 % S D S , および 5 0 0 m g / m L 10
プロテイナーゼ K) 中で、5 5 °C で一晩消化する。次いで、このサンプルを 2 0 0 m L の T E で希釈し、そして 2 m L の耳サンプルを、適切なプライマーを用いる P C R 反応中で用いる。

【0333】

8 週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理分析のため、屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そして T o t a l R N A E x t r a c t i o n K i t (Q i a g e n) を用いて、脾臓から、総細胞 R N A を単離し、そして導入遺伝子発現を、R T - P C R によって決定する。脾臓から回収した R N A を、以下のように、S u p e r S c r i p t ^{T M} P r e a m p l i f i c a t i o n S y s t e m (G i b c o - B R L) を用いて c D N A に変換する。適切なプライマー (発現ベクター配 20
列に位置し、そして I F N - L ポリペプチド導入遺伝子の 3 ' 側である) を用いて、導入遺伝子転写物から c D N A 合成をプライムする。トランスジェニック創始動物およびコントロール由来の 1 0 m g の総脾臓 R N A を、1 mM のプライマーとともに、1 0 分間 7 0 °C でインキュベートし、そして氷上に置く。次いで、反応物に、1 0 mM T r i s - H C l , p H 8 . 3 , 5 0 mM K C l , 2 . 5 mM M g C l ₂ , 1 0 mM の各 d N T P , 0 . 1 mM D T T , および 2 0 0 U の S u p e r S c r i p t I I 逆転写酵素を補充する。4 2 °C で 5 0 分間のインキュベーション後、7 2 °C で 1 5 分間加熱することによって反応を停止し、2 U の R N a s e H を用いて 2 0 分間 3 7 °C で消化する。次いで、サンプルを I F N - L ポリペプチドに特異的なプライマーを用いる P C R によって増幅する。

【0334】

(実施例 8 : トランスジェニックマウスにおける I F N - L ポリペプチドの生物学的活性) 30

安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルオロラン (i s o f l u o r a n e) によって麻酔し、そして心臓穿刺によって採血する。サンプルを、血液学および血清化学分析に供する。X 線撮影を、最終的な放血後に行う。肉眼での解剖の際に、主な内臓器官を、重量分析に供する。

【0335】

肉眼での解剖後、組織 (すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋) を取出し、そして 1 0 % 緩衝化 Z n - ホルマリン中で組織学的検査の 40
ために固定する。固定後、組織をパラフィンブロック中で処理し、そして 3 m m の切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、次いで組織学的分析に供する。

【0336】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下の通りに B 細胞特異的抗体および T 細胞特異的抗体による免疫組織学的分析に供する。ホルマリンで固定したパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。切片を 3 % 過酸化水素でクエンチし、P r o t e i n B l o c k (L i p s h a w , P i t t s b u r g h , P A) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウス B 2 2 0 および C D 3 (H a r l a n , I n d i a n a p o l i s , 50

IN) 中でインキュベートする。抗体結合を、色素原 (chromagen) として DAB (BioTek, Santa Barbara, CA) を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (BioGenex, San Ramon, CA) によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

【0337】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロールの同腹仔由来の脾臓および胸腺の MLN および切片を取出す。シリンジの平らな末端を用いて 100 mm ナイロン性細胞ストレーナー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) の底に対してこの組織を穏やかに粉砕することによって単細胞懸濁物を調製する。細胞を 2 回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の約 1×10^6 細胞を、20 μ L 容量において 0.5 μ g CD16/32 (Fc γ II/III) Fc ブロックで 10 分間インキュベートする。次いで、サンプルを、FITC または PE に結合体化した、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4 または CD8 に対するモノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) の 0.5 μ g 抗体を有する、100 μ L 容量の PBS (Ca⁺ および Mg⁺ を欠く)、0.1% ウシ血清アルブミンおよび 0.01% アジ化ナトリウム中で 2~8℃ で 30 分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いで FACSscan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーによって分析する。

10

【0338】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、改変および修飾が当業者に思い浮かぶことが理解される。それゆえ、添付の特許請求の範囲が、特許請求される本願発明の範囲内に入る全てのこのような等価な改変物を包含することが意図される。

20

【図面の簡単な説明】

【0339】

【図1A】ラット IFN- γ 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1)、およびラット IFN- γ ポリペプチドの推定のアミノ酸配列 (配列番号2) を示す。推定シグナルペプチドが示されている (下線)。

【図1B】ラット IFN- γ 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1)、およびラット IFN- γ ポリペプチドの推定のアミノ酸配列 (配列番号2) を示す。推定シグナルペプチドが示されている (下線)。

30

【図2A】ヒト IFN- γ 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号4)、およびヒト IFN- γ ポリペプチドの推定のアミノ酸配列 (配列番号5) を示す。予想されるシグナルペプチドが示されている (下線)。

【図2B】ヒト IFN- γ 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号4)、およびヒト IFN- γ ポリペプチドの推定のアミノ酸配列 (配列番号5) を示す。予想されるシグナルペプチドが示されている (下線)。

【図3】ヒト IFN- γ ポリペプチド (huIFN- γ ; 配列番号5)、ヒト IFN- β (huIFN- β ; 配列番号7)、ラット IFN- γ ポリペプチド (raIFN- γ ; 配列番号2) のアミノ酸配列アラインメント、およびそれらのアミノ酸位置を示す。これらはある程度の類似性 (cons) を共有する；

40

【図4】Amgen 株 #3729 の NdeI-BamHI-pAMG21 インサートのヌクレオチド配列 (配列番号8) およびこのインサートによってコードされる推定アミノ酸配列 (配列番号9) を示す。

【図5】Amgen 株 #3858 の NdeI-BamHI-pAMG21 インサートのヌクレオチド配列 (配列番号10) およびこのインサートによってコードされる推定アミノ酸配列 (配列番号11) を示す。

【図6】Amgen 株 #4047 の XbaI-BamHI-pAMG21 インサートのヌクレオチド配列 (配列番号12) およびこのインサートによってコードされる推定アミノ酸配列 (配列番号13) を示す。

50

【図 7】 Amgen 株 # 3969 の XbaI-BamHI-pAMG21 インサートのヌクレオチド配列（配列番号 14）およびこのインサートによってコードされる推定アミノ酸配列（配列番号 15）を示す。

【図 8】 Amgen 株 # 4182 の NdeI-BamHI-pAMG21 インサートのヌクレオチド配列（配列番号 16）およびこのインサートによってコードされる推定アミノ酸配列（配列番号 17）を示す。

【図 1 A】

Fig. 1A

```

gggtgttcta gatatttttc ctttgaaga aatactgagc accaaggctg ag atg aca 58
                                     Met Thr
                                     1
ctg aag tat tta tgg ctg gtc gcc ctc gtc gct cta tac att tca ccc 106
Leu Lys Tyr Leu Trp Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Tyr Ile Ser Pro
5      10      15
atc cag tct cag aac tgt gtc tat ctg gat cat acc atc ttg gaa aac 154
Ile Gln Ser Gln Asn Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn
20      25      30
atg aaa ctt ctg agc agc atc agg acc acc ttt ccc tta aga tgt cta 202
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu
35      40      45
aaa gat atc acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc 250
Lys Asp Ile Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val
55      60      65
cag cat gtc aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct 298
Gln His Val Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser
70      75      80
ctg gcg cta att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca 346
Leu Ala Leu Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr
85      90      95
gag gaa cgc ttg gaa cgt atc aga tgc gga ctt ttc aaa caa gtc cag 394
Glu Glu Arg Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln
100     105     110
caa gct cga gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag 442
Gln Ala Arg Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu
115     120     125     130
gac agt aca tca caa cat cct cac tca gag gcc ttc aag gca gtc tac 490
Asp Ser Thr Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr
135     140     145
ctg gaa ttg aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat 538
Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn
150     155     160
aag aaa tac agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtc gtc gaa ata aga 586
Lys Lys Tyr Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg
165     170     175
aga tgt ttc agt ata ttt tac aaa cta ctc aac atg aat tgagaatcat 635
Arg Cys Phe Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
180     185     190
ccagcttcaa gcaagaactt agatagaagt tgtgactgct caaatgtcc caagaacgct 695

```

【図 1 B】

Fig. 1B

```

tgattctaag gctattgcga gctgctgct acacacttcg gacgcaagac ttttcaaggt 755
cagggttcaa ggtagtacag tcaaaggaag tcttatgtta agcaaaagaa aaatttcagt 815
ggaaaagcta gcagaaatgt caactgttca aaaaaacaac ttatggatta tggcattgac 875
gttactagca aaaaaataa aacaaaaaaa aacaaaaa 913

```

【図 2 A】

Fig. 2A

```

aagcttaatt taacaaaatt ggaacaaact aaactatact gtgtcttggt gacctagcaa 60
tcaataatc acagtcattt ggtcaatgct tatgattaac tcaatgagac aggatgtttg 120
gctatagcac caggtacaaa aaatatattt tcatgaagga tcaactccctc ttatgtaata 180
gatttgggtg agtgagtgag tgagtgagtg catggactca cagcttttgg ctttctgaaa 240
taccctgcat cagctctgtt atgatgatcc cttagtctgt ggatggatca tccaggcatt 300
taaggttaaca cgatggttaat tctttgctca tttttcaggg aaaaaaaa gttatcatt 360
ccaaagtcgg catagtccac cgaagtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaag cctcagagcg 420
aaaggaaagg ggccgcaccc ttggttaact gtgaaatgac gaatgagaaa actcctcctg 480
ctgaagatat tcaagtatat aaaggcacat gaaggaatac tcaaacatc attgtcatat 540
acacatcttc tggatttttt agcttgcata aaaa atg agc acc aaa cct gat atg 595
Met Ser Thr Lys Pro Asp Met
1 5
att caa aag tgt ttg tgg ctt gag atc ctt atg ggt ata ttc att gct 643
Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala
10 15 20
ggc acc cta tcc ctg gac tgt aac tta ctg aac gtt cac ctg aga aga 691
Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg
25 30 35
gtc acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt 739
Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe
40 45 50 55
cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag 787
Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu
60 65 70
ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc 835
Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe
75 80 85
tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc 883
Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe
90 95 100
aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat 931
Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp
105 110 115
cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa 979
Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu
120 125 130 135

```

【図 3】

Fig. 3

```

1 50
huIFN-L MSTKPDMIQK CLWLEILMGI FIAGTSLDLC NLLNVHLRRV TWONLEHLSS
raIFN-L -----MTLK YLWLVALVAL YISPIQSQC . . . . .YVLDHT ILENMKLLSS
huIFN-β -----MTNK CLQLIALLLC FSTTALSMSY NLLGFLQRSS NFQCQKLLWQ
cons -----MT-K CLWL-AL--- FI---LS--C NLL-V-LR-- --QN-KLLSS

51 100
huIFN-L MSNSFFVECL RENIAFELFQ EFLQTQPMK RDIKAFYEM SLOAFNIFS.
raIFN-L IRTTFPLRLC KDITDFEPQ EILLVQVRK KDKAVTYHI SSLALIIISL
huIFN-β LNGRLEY CL KDRNFDLPE EIKOLOCFQK EDAALTIYEM LQNIPIFRQ
cons ----FP--CL KD--FE-PQ EILQY-Q--K -DIK---YEM S--AF-IFS

101 150
huIFN-L OHTFKYWKER HLKIQIGLD QQAREYLNQCL EEDENENEDM KEMKENEMKP
raIFN-L KDSISLATEE RLERIRSGLF KQVQARECM VDEENKNT. .EDSTSQHHPH
huIFN-β DSSSTGWNET IVENLLANVY HQINHLKTVL .EEKLEKEDF TRGK.....
cons --S--W-E- -LE-I--GL- -Q--L--CL -EEDENED- -E-K-----

151 200
huIFN-L SEARVPOLSS LELARYFHRI DNFLKEKKYS DCWEIVRVRE IRRCLYIFYK
raIFN-L SEGFL..KAVY LELNKYFRI RKFLVNKYS FCWAEIVRVE IRRCSIFYK
huIFN-β .....LMSS LHLKRYGRI LHLKAREYS HCWITVRVE ILRFYFINR
cons SE-----S LEL-RVF-RI --FLK-KRYS -CAW-IVRVE IRRCFY-FYK

201
huIFN-L FTALFRRK
raIFN-L LILNMN---
huIFN-β LTGYLRN-
cons LT---R--

```

【図 2 B】

Fig. 2B

```

aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa 1027
Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu
140 145 150
gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac 1075
Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His
155 160 165
agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg 1123
Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp
170 175 180
gag att gtc cga gtg gaa atc aga aga tgt ttg tat tac ttt tac aaa 1171
Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys
185 190 195
ttt aca gct cta ttc agg agg aaa taaggtatat ttttgaatt aaaattcctt 1225
Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
200 205
ttcctccga aatctcttct tcttctctct cctccatctt ctttttaagg attgttgtgc 1285
tgtctgttaa gctgtctctc agttggactg gtgacctcg aacatcagg acactcacct 1345
ctctaaggag aggtaatgcc aaccatctct aggggtacca agagtctct tagaaagtct 1405
ttaagacatt tttaaaggaa taagattccc tctctgtctt cttctattct ctttgtctct 1465
tttgtgtgac cattttgaaa gagctttgct atataacca cctgtggact tccaagac 1525
aatggctaga ggataggag cagagaatgt tgcaaaatgg taacattca atgacttaac 1585
tgtttgtctg ccaaggttgc ttactctatg aaaaattcagc acattaaaag agcttatata 1645
tgtctccctag agtcaatact cttgcatttt cccctctctg ctccgggggga aaaaggttga 1705
cattttgtgc ccatttctct ctcagcttgg ttgtttgaa ttgatgcttg tggatgtgta 1765
tttcattact ttaagagtga agatccatag tgaatttga tggatgtgtg aattagacga 1825
ccattaagct t 1836

```

【図 4】

Fig. 4

```

cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt 48
Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu
1 5 10 15
ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc 96
Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile
20 25 30
acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac tgc cag cat gtg 144
Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val
35 40 45
aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct ctg gcg cta 192
Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu
50 55 60
att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc 240
Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg
65 70 75
ttg gaa cgt atc aga tgc gga ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cga 288
Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg
80 85 90 95
gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca 336
Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr
100 105 110
tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg 384
Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu
115 120 125
aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat aag aaa tac 432
Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr
130 135 140
agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tgt ttc 480
Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe
145 150 155
agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc 520
Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
160 165

```

【図 5】

Fig. 5

```

cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt 48
Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu
1 5 10 15

ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc 96
Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile
20 25 30

acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg 144
Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val
35 40 45

aaa aag gac atc aag gca gtc acc tat cat atc tct tct ctg gcg ctg 192
Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu
50 55 60

att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc 240
Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg
65 70 75

ttg gaa cgt atc cgt tct ggt ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cgt 288
Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg
80 85 90 95

gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca 336
Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr
100 105 110

tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg 384
Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu
115 120 125

aac aag tat ttc ttc cgt atc cgt aag ttc ctg gta aat aag aaa tac 432
Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr
130 135 140

agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa aat cgt cgt tct ttc 480
Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Ser Phe
145 150 155

agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc 520
Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Asn Met Asn
160 165

```

【図 6】

Fig. 6

```

tctagaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt 51
Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg
1 5 10

cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca 99
Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser
15 20 25

ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa 147
Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln
30 35 40

gag ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc 195
Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala
45 50 55

ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc 243
Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr
60 65 70

ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctg aaa caa atc caa ata gga ctt 291
Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu
75 80 85 90

gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat 339
Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Asp Glu Asn
95 100 105

gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aag aat gag atg aaa ccc tca 387
Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser
110 115 120

gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc 435
Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe
125 130 135

cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc 483
His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Tyr Ser Asp Cys Ala
140 145 150

tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac 531
Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr
155 160 165 170

aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 568
Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
175

```

【図 7】

Fig. 7

```

tctagaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt 51
Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg
1 5 10

cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca 99
Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser
15 20 25

ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa 147
Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln
30 35 40

gag ttc ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc 195
Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala
45 50 55

ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc 243
Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr
60 65 70

ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctg aaa caa atc caa ata gga ctt 291
Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Glu Ile Gln Ile Gly Leu
75 80 85 90

gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat 339
Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn
95 100 105

gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aag aat gag atg aaa ccc tca 387
Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser
110 115 120

gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc 435
Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe
125 130 135

cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc 483
His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Tyr Ser Asp Cys Ala
140 145 150

tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tct ctg tac tac ttt tac 531
Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Tyr
155 160 165 170

aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 568
Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
175

```

【図 8】

Fig. 8

```

cat atg ctg gac tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt cgt gtt acc 48
His Met Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr
1 5 10

tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt cct gta 96
Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val
20 25 30

gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag ttt ctg 144
Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu
35 40 45

caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc tat gaa 192
Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu
50 55 60

atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc aaa tat 240
Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr
65 70 75 80

tgg aaa gag aga cac ctg aaa caa atc caa ata gga ctt gat cag caa 288
Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln
85 90 95

gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa aat gaa 336
Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu
100 105 110

gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa gcc agg 384
Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg
115 120 125

gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac agg ata 432
Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile
130 135 140

gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg gag att 480
Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile
145 150 155 160

gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac aaa ttt acc 528
Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr
165 170 175

gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 568
Ala Leu Phe Arg Arg Lys
180

```

【配列表】

2007014331000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C 0 8 7
C 0 7 K 14/555 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 14/555	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 P	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/38 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 47/32 (2006.01)	A 6 1 K 47/38	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 デュアンジ・ウェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 0, サウザンド オークス, キャンパス ドライブ 3 8 8 5

(72)発明者 マイケル・ケリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 0, サウザンド オークス, サン ドーバル プレイス 7 9 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA22 BA57 CA04 DA02 DA05 DA11 EA02 EA04
FA02 GA01 GA11 HA01 HA03 HA11
4B063 QA01 QA08 QA18 QQ05 QQ13 QR33 QR59 QS05 QS36 QX02
4B064 AG08 AG27 CA01 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA91Y AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 CC01 CC07 CC50 EE06A EE23A EE25A EE30A EE31A FF68
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 BA35
CA18 CA23 MA05 NA13 NA14 ZA012 ZB072
4C086 AA01 AA02 AA03 EA18 MA01 MA02 MA04 MA05 NA13 NA14
ZA01 ZB07
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 CA44 MA05 NA13 NA14 ZA01 ZB07
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA15 DA76 EA20 EA50
FA72 FA74

【外国語明細書】

Specification

Title of Invention

INTERFERON-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

Field of the Invention

The present invention relates to Interferon-Like (IFN-L) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also relates to selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing IFN-L polypeptides. The invention further relates to pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with IFN-L polypeptides.

Background of the Invention

Technical advances in the identification, cloning, expression, and manipulation of nucleic acid molecules and the deciphering of the human genome have greatly accelerated the discovery of novel therapeutics. Rapid nucleic acid sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented rates and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping sequences into partial and entire genomes and the identification of polypeptide-encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a database compilation of known amino acid sequences allows one to determine the extent of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks. The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid molecule provides a polypeptide product for structural and functional analyses. The manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides may confer advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

In spite of the significant technical advances in genome research over the past decade, the potential for the development of novel therapeutics based on the human genome is still largely unrealized. Many genes encoding potentially beneficial polypeptide therapeutics or those encoding polypeptides, which may act as "targets" for therapeutic molecules, have still not been identified.

Accordingly, it is an object of the invention to identify novel polypeptides,

and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

Summary of the Invention

The present invention relates to novel IFN-L nucleic acid molecules and encoded polypeptides.

The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4;
- (b) the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976;
- (c) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (d) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (c); and
- (e) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (c).

The invention also provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, or (a);
- (c) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein

the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic;

(d) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, or any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (d); and

(f) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (d).

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded

polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (f); and

(h) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (e).

The present invention provides for an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and

(b) the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976.

The invention also provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 6, optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an ortholog of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) a fragment of the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic; and

(e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5,

the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, or any of (a) - (c).

The invention further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and

(e) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

Also provided are fusion polypeptides comprising IFN-L amino acid sequences.

The present invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells comprising the recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a

method of producing an IFN-L polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced.

A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding an IFN-L polypeptide is also encompassed by the invention. The IFN-L nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of an IFN-L polypeptide, which may include increased circulating levels. Alternatively, the IFN-L nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that prevents expression of endogenous IFN-L polypeptide (*i.e.*, generates a transgenic animal possessing an IFN-L polypeptide gene knockout). The transgenic non-human animal is preferably a mammal, and more preferably a rodent, such as a rat or a mouse.

Also provided are derivatives of the IFN-L polypeptides of the present invention.

Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the IFN-L polypeptides of the invention. Such antibodies and peptides may be agonistic or antagonistic.

Pharmaceutical compositions comprising the nucleotides, polypeptides, or selective binding agents of the invention and one or more pharmaceutically acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleotides or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents.

The IFN-L polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, and/or detect diseases and disorders, including those recited herein.

The present invention also provides a method of assaying test molecules to identify a test molecule that binds to an IFN-L polypeptide. The method comprises contacting an IFN-L polypeptide with a test molecule to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises determining whether such test molecules are agonists or antagonists of

an IFN-L polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of IFN-L polypeptide or on the activity of IFN-L polypeptide.

Methods of regulating expression and modulating (*i.e.*, increasing or decreasing) levels of an IFN-L polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding an IFN-L polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of an IFN-L polypeptide may be administered. Examples of these methods include gene therapy, cell therapy, and anti-sense therapy as further described herein.

In another aspect of the present invention, the IFN-L polypeptides may be used for identifying receptors thereof ("IFN-L polypeptide receptors"). Various forms of "expression cloning" have been extensively used to clone receptors for protein ligands. *See, e.g.*, Simonsen and Lodish, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:437-41 and Tartaglia *et al.*, 1995, *Cell* 83:1263-71. The isolation of an IFN-L polypeptide receptor is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the IFN-L polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble IFN-L polypeptide receptors, anti-IFN-L polypeptide receptor-selective binding agents (such as antibodies and derivatives thereof), small molecules, and antisense oligonucleotides, any of which can be used for treating one or more disease or disorder, including those disclosed herein.

Brief Description of the Figures

Figures 1A-1B illustrate the nucleotide sequence of the rat IFN-L gene (SEQ ID NO: 1) and the deduced amino acid sequence of rat IFN-L polypeptide (SEQ ID NO: 2). The predicted signal peptide is indicated (underlined);

Figures 2A-2B illustrate the nucleotide sequence of the human IFN-L gene (SEQ ID NO: 4) and the deduced amino acid sequence of human IFN-L polypeptide (SEQ ID NO: 5). The predicted signal peptide is indicated (underlined);

Figure 3 illustrates the amino acid sequence alignment of human IFN-L polypeptide (huIFN-L; SEQ ID NO: 5), human IFN- β (huIFN- β ; SEQ ID NO: 7), rat IFN-L polypeptide (raIFN-L; SEQ ID NO: 2), and those amino acid positions which share some similarity (cons);

Figure 4 illustrates the nucleotide sequence of the *Nde* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 8) of Amgen strain #3729 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 9) encoded by this insert;

Figure 5 illustrates the nucleotide sequence of the *Nde* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 10) of Amgen strain #3858 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 11) encoded by this insert;

Figure 6 illustrates the nucleotide sequence of the *Xba* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 12) of Amgen strain #4047 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 13) encoded by this insert;

Figure 7 illustrates the nucleotide sequence of the *Xba* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 14) of Amgen strain #3969 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 15) encoded by this insert;

Figure 8 illustrates the nucleotide sequence of the *Nde* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 16) of Amgen strain #4182 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 17) encoded by this insert.

Detailed Description of the Invention

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All references cited in this application are expressly incorporated by reference herein.

Definitions

The terms "IFN-L gene" or "IFN-L nucleic acid molecule" or "IFN-L polynucleotide" refer to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, a nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, and nucleic acid molecules as defined herein.

The term "IFN-L polypeptide allelic variant" refers to one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

The term "IFN-L polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of IFN-L polypeptide amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when total nucleic acid is isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refers to a DNA or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-

methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "vector" is used to refer to any molecule (*e.g.*, nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

The term "expression vector" refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of

expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "IFN-L polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 and related polypeptides. Related polypeptides include IFN-L polypeptide fragments, IFN-L polypeptide orthologs, IFN-L polypeptide variants, and IFN-L polypeptide derivatives, which possess at least one activity of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. IFN-L polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino-terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "IFN-L polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. The term "IFN-L polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of IFN-L polypeptide orthologs, IFN-L polypeptide derivatives, or IFN-L polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by IFN-L polypeptide allelic variants or IFN-L polypeptide splice variants. IFN-L polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of an IFN-L polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids. Such IFN-L polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to IFN-L polypeptides.

The term "IFN-L polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to IFN-L polypeptide amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. For example, mouse and human IFN-L polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "IFN-L polypeptide variants" refers to IFN-L polypeptides comprising amino acid sequences having one or more amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or IFN-L polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or IFN-L fusion polypeptides) as compared to the IFN-L polypeptide amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (*e.g.*, IFN-L polypeptide allelic variants, IFN-L polypeptide orthologs, and IFN-L polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such IFN-L polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

The term "IFN-L polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, IFN-L polypeptide fragments, IFN-L polypeptide orthologs, or IFN-L polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified. The term "IFN-L polypeptide derivatives" also refers to the polypeptides encoded by IFN-L polypeptide allelic variants or IFN-L polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

The term "mature IFN-L polypeptide" refers to an IFN-L polypeptide lacking a leader sequence. A mature IFN-L polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller

polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like. Exemplary mature IFN-L polypeptides are depicted by the amino acid sequences of SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 6.

The term "IFN-L fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, IFN-L polypeptide fragments, IFN-L polypeptide orthologs, IFN-L polypeptide variants, or IFN-L derivatives, as defined herein. The term "IFN-L fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by IFN-L polypeptide allelic variants or IFN-L polypeptide splice variants, as defined herein.

The term "biologically active IFN-L polypeptides" refers to IFN-L polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. In addition, an IFN-L polypeptide may be active as an immunogen; that is, the IFN-L polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "identity," as known in the art, refers to a relationship between the sequences of two or more polypeptide molecules or two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also

means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecules or polypeptides, as the case may be, as determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer program (*i.e.*, "algorithms").

The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity," "similarity" refers to a measure of relatedness which includes both identical matches and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the same example, there are five more positions where there are conservative substitutions, then the percent identity remains 50%, but the percent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the percent similarity between two polypeptides will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of an IFN-L polypeptide or IFN-L nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the IFN-L polypeptides as set forth herein.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the IFN-L polypeptide, IFN-L nucleic acid molecule, or IFN-L selective binding agent as a pharmaceutical composition.

The term “antigen” refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, and additionally capable of being used in an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more epitopes.

The term “selective binding agent” refers to a molecule or molecules having specificity for an IFN-L polypeptide. As used herein, the terms, “specific” and “specificity” refer to the ability of the selective binding agents to bind to human IFN-L polypeptides and not to bind to human non-IFN-L polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat IFN-L polypeptides.

The term “transduction” is used to refer to the transfer of genes from one bacterium to another, usually by a phage. “Transduction” also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

The term “transfection” is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been “transfected” when the exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. *See, e.g., Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986); and Chu et al., 1981, Gene 13:197.* Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

The term “transformation” as used herein refers to a change in a cell’s genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A

cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Such related IFN-L polypeptides may comprise, for example, an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites or an addition and/or a deletion of one or more cysteine residues.

Related nucleic acid molecules also include fragments of IFN-L nucleic acid molecules which encode a polypeptide of at least about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids, or more than 200 amino acid residues of the IFN-L polypeptide of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

In addition, related IFN-L nucleic acid molecules also include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the IFN-L nucleic acid molecule of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the IFN-L sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of IFN-L polypeptide that exhibit significant identity

to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength, and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 65-68°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used – however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinyl-pyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, NaDodSO₄, (SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. See Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

Factors affecting the stability of DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting

temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - 600/N - 0.72(\% \text{formamide})$$

where N is the length of the duplex formed, $[\text{Na}^+]$ is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, %G+C is the percentage of (guanine+cytosine) bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the melting temperature is reduced by approximately 1°C for each 1% mismatch.

The term “moderately stringent conditions” refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under “highly stringent conditions” is able to form. Examples of typical “moderately stringent conditions” are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 50-65°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 20% formamide at 37-50°C. By way of example, “moderately stringent conditions” of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between “highly stringent conditions” and “moderately stringent conditions.” For example, at 0.015 M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl* for oligonucleotide probes up to about 20nt is given by:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C per A-T base pair} + 4^{\circ}\text{C per G-C base pair}$$

*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. *See Suggs et al., Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown and Fox, eds., 1981).

High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the T_m of the oligonucleotide in 6X SSC, 0.1% SDS.

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the

nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, or the nucleotide sequences encode a polypeptide that is about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Related nucleic acid molecules encode polypeptides possessing at least one activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

Conservative modifications to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce a polypeptide having functional and chemical characteristics similar to those of IFN-L polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of IFN-L polypeptides may be accomplished by selecting substitutions in the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

For example, a "conservative amino acid substitution" may involve a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be

substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis."

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues that are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and other reversed or inverted forms of amino acid moieties.

Naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties:

- 1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;
- 3) acidic: Asp, Glu;
- 4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- 6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human IFN-L polypeptide that are homologous with non-human IFN-L polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. The hydropathic indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is generally understood in the art (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-31). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score

and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functionally equivalent protein or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments, as in the present case. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); and tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the IFN-L polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the IFN-L polypeptides described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table I.

Table I

Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 using well-known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be

changed without destroying biological activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of the IFN-L molecule that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of an IFN-L polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in an IFN-L polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of IFN-L polypeptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of IFN-L polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays known

to those with skill in the art. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within the structure of a polypeptide or protein. See Holm *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47. It has been suggested that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76).

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "profile analysis" (Bowie *et al.*, 1991, *Science*, 253:164-70; Gribskov *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58), and "evolutionary linkage" (See Holm *et al.*, *supra*, and Brenner *et al.*, *supra*).

Preferred IFN-L polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites have been altered compared to the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. In one embodiment, IFN-L polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions that eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred IFN-L variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (e.g., serine) as compared to the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Cysteine variants are useful when IFN-L polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

In other embodiments, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ

ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 wherein the polypeptide has a carboxyl- and/or amino-terminal truncation and further wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, carboxyl-terminal truncations, and amino-terminal truncations and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other IFN-L polypeptide, may be fused to a homologous polypeptide to form a homodimer or to a heterologous polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of an IFN-L fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other IFN-L polypeptide.

Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other IFN-L polypeptide. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It

will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other IFN-L polypeptide, is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31. When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer. *Id.* Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

Table II

Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant rejection	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	C-terminus of	osteoarthritis;	WO 97/23614

	OPG	bone density	
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig Cγ1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the IFN-L polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of an IFN-L polypeptide fragment (e.g., the predicted extracellular portion of IFN-L polypeptide).

The resulting IFN-L fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides are readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to those described in *Computational Molecular Biology* (A.M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (D.W. Smith, ed., Academic Press 1993); *Computer Analysis of Sequence Data* (Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin, eds., Humana Press 1994); G. von Heinle, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov and J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073.

Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between

two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, *supra*). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of the two sequences, and this small aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full-length sequences. Accordingly, in a preferred embodiment, the selected alignment method (GAP program) will result in an alignment that spans at least 50 contiguous amino acids of the claimed polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their respective amino acids (the "matched span," as determined by the algorithm). A gap opening penalty (which is calculated as 3X the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 0.1X the gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix is also used by the algorithm (see Dayhoff *et al.*, 5 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supp. 3 1978)(PAM250 comparison matrix); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10915-19 (BLOSUM 62 comparison matrix)).

Preferred parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-53;
Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, *supra*);
Gap Penalty: 12
Gap Length Penalty: 4
Threshold of Similarity: 0

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, *supra*;
Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0
Gap Penalty: 50
Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, and thresholds of similarity may be used, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA-to-DNA, protein-to-protein, protein-to-DNA; and additionally, whether the comparison is between given pairs of sequences (in which case GAP or BestFit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

Nucleic Acid Molecules

The nucleic acid molecules encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or PCR amplification of cDNA.

Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and/or *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). The invention provides for nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining such molecules.

Where a gene encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express the IFN-L polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives obtained from the screening.

Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of IFN-L polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding an antibody or other binding partner (*e.g.*, receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide into an

appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded IFN-L polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as *Taq* polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34. These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of an IFN-L gene. Usually, the DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the IFN-L polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of an IFN-L polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the IFN-L polypeptide and host cell selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Other useful codon frequency tables include "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," and "Yeast_high.cod."

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding IFN-L polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations (*see* Sambrook *et al.*, *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (*i.e.*, the vector is compatible with the host cell machinery such that amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of an IFN-L polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether an IFN-L polypeptide is to be post-translationally modified (*e.g.*,

glycosylated and/or phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, see *Meth. Enz.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid maintenance and for cloning and expression of exogenous nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site, a sequence encoding a leader sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, *i.e.*, an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the IFN-L polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus), or *myc* for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the IFN-L polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from the purified IFN-L polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences which normally function to regulate IFN-L polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic

organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

Flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein – other than the IFN-L gene flanking sequences – will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of an IFN-L polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (*e.g.*, SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV), or

papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells; (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed. Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection gene and the DNA that encodes

an IFN-L polypeptide. As a result, increased quantities of IFN-L polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of an IFN-L polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (*i.e.*, having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct an IFN-L polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of an IFN-L nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of an IFN-L polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with an IFN-L nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the IFN-L nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of an IFN-L polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted IFN-L polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of an IFN-L nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native IFN-L polypeptide signal sequence joined to an IFN-L polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to an IFN-L polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, *i.e.*, cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native IFN-L polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for

example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native IFN-L polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add pro-sequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression, which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the amino-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired IFN-L polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the IFN-L gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the IFN-L gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when an IFN-L cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (*i.e.*, 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host

cell into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

The expression and cloning vectors of the present invention will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the IFN-L polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (*i.e.*, 5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding IFN-L polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native IFN-L promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of an IFN-L nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase; a tryptophan (*trp*) promoter system; and hybrid promoters such as the *tac* promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence, using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are

not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling IFN-L gene expression include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); the alpha-feto-protein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, 1987,

Genes and Devel. 1:161-71); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); the myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding an IFN-L polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (*e.g.*, globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to an IFN-L nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the flanking sequences described herein are not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors for practicing this invention are those which are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX

(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Pub. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to plasmids such as Bluescript[®] plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid, Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (e.g., TOPO[™] TA Cloning[®] Kit, PCR2.1[®] plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), and mammalian, yeast or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives, Clontech, Palo Alto, CA).

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding an IFN-L polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for an IFN-L polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook *et al.*, *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under appropriate conditions, synthesizes an IFN-L polypeptide which can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or

necessary for activity (such as glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 and COS-7 cell lines, and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HcLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (*e.g.*, HB101, DH5 α , DH10, and MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for the expression of the polypeptides of the present invention. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described, for example, in

Kitts *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14:810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-72; and Lucklow *et al.*, 1993, *J. Virol.*, 67:4566-79. Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen).

One may also use transgenic animals to express glycosylated IFN-L polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce IFN-L polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

Polypeptide Production

Host cells comprising an IFN-L polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transfected or transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of an IFN-L polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If an IFN-L polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the IFN-L polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

For an IFN-L polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication followed by centrifugation.

If an IFN-L polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized IFN-L polypeptide can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the IFN-L polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182:264-75.

In some cases, an IFN-L polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its

tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine bridges. Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiobis GSH, cupric chloride, dithiothreitol (DTT)/dithiane DTT, and 2-2-mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). In many instances, a cosolvent may be used or may be needed to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of an IFN-L polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

The purification of an IFN-L polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (IFN-L polypeptide/hexaHis) or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or *myc* (Invitrogen, Carlsbad, CA) at either its carboxyl- or amino-terminus, it may be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel. Thus, an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns)

can be used for purification of IFN-L polypeptide/polyHis. See, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993).

Additionally, IFN-L polypeptides may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to an IFN-L polypeptide.

Other suitable procedures for purification include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange chromatography, molecular sieve chromatography, HPLC, electrophoresis (including native gel electrophoresis) followed by gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased purity.

IFN-L polypeptides may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 82:5132; and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Such polypeptides may be synthesized with or without a methionine on the amino-terminus. Chemically synthesized IFN-L polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized IFN-L polypeptides are expected to have comparable biological activity to the corresponding IFN-L polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural IFN-L polypeptide.

Another means of obtaining IFN-L polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the IFN-L polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for protein purification as described herein. The presence of the IFN-L polypeptide during purification may be monitored, for example, using an antibody prepared against recombinantly produced IFN-L polypeptide or peptide fragments thereof.

A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for IFN-L polypeptide. *See, e.g.*, Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. *See also*, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73. Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods for obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those that exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

U.S. Patent Nos. 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having the desired activity.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT/US98/20094 (WO99/15650) filed by Athersys, Inc. Known as "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a

break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can also be used to create comprehensive IFN-L polypeptide expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (*e.g.*, plant, mouse, *etc.*).

Synthesis

It will be appreciated by those skilled in the art that the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

Selective Binding Agents

The term "selective binding agent" refers to a molecule that has specificity for one or more IFN-L polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary IFN-L polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the IFN-L polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to an IFN-L polypeptide receptor.

Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind IFN-L polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal including monospecific polyclonal; monoclonal (MAbs); recombinant; chimeric; humanized, such as CDR-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an epitope on the IFN-L polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such

as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward an IFN-L polypeptide generally are produced in animals (*e.g.*, rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of IFN-L polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate an IFN-L polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-IFN-L antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward IFN-L polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495-97 and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with IFN-L polypeptides.

Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy (H) and/or light (L) chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is/are identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well

known in the art. See U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region (CDR) for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind IFN-L polypeptides. Using transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production such antibodies are produced by immunization with an IFN-L polypeptide antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immuno.* 7:33. In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals, that is those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, *e.g.*, murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these antigens. See PCT App. Nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, PCT App. Nos. PCT/US91/245 and PCT/GB89/01207, and in European Patent Nos. 546073B1 and 546073A1. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can also be produced from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). These processes mimic immune

selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in PCT App. No. PCT/US98/17364, which describes the isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk- receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (e.g., human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-IFN-L antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of IFN-L polypeptides. The antibodies will bind IFN-L polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-IFN-L antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one that is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In , or ^{67}Ga ; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase, β -galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184:138-63).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (e.g., an IFN-L polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an IFN-L polypeptide) for binding with a limited amount of anti-IFN-L antibody. The amount of an IFN-L polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to

the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents, including anti-IFN-L antibodies, are also useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host assayed. The antibody may be labeled with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of an IFN-L polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to an IFN-L polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of an IFN-L polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the selective binding agent, *e.g.*, an antagonist antibody, will inhibit the functional activity of an IFN-L polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the

selective binding agent may be an anti-IFN-L polypeptide antibody that is capable of interacting with an IFN-L polypeptide binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating IFN-L polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-IFN-L polypeptide antibodies, are identified by screening assays that are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising IFN-L selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting IFN-L polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

Microarrays

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high-density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array contains numerous copies of a single nucleic acid species that acts as a target for hybridization with a complementary nucleic acid sequence (*e.g.*, mRNA). In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA that is specifically bound to each target nucleic acid molecule. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the IFN-L molecules of the invention, including, but not limited to: the identification and validation of IFN-L disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of related IFN-L molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate

markers for clinical trials; and enhancing related IFN-L polypeptide small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens.

Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of IFN-L polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures described herein. IFN-L polypeptide derivatives are modified in a manner that is different – either in the type or location of the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other IFN-L polypeptide, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2 kDa to about 100 kDa (the term “about” indicating that in preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C₁-C₁₀), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight

dextran of, for example, about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional crosslinking molecules which may be used to prepare covalently attached IFN-L polypeptide multimers.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps of: (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or other IFN-L polypeptide, becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal reaction conditions will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the IFN-L polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino-terminus. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 5,234,784.

The pegylation of a polypeptide may be specifically carried out using any of the pegylation reactions known in the art. Such reactions are described, for example, in the following references: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3:4-10; European Patent Nos. 0154316 and 0401384; and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, a selected polymer should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, a selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C₁-C₁₀ alkoxy or aryloxy derivatives thereof (*see* U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, IFN-L polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/IFN-L polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/IFN-L polypeptide molecules. IFN-L polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

Generally, conditions that may be alleviated or modulated by the administration of the present IFN-L polypeptide derivatives include those described herein for IFN-L polypeptides. However, the IFN-L polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

Genetically Engineered Non-Human Animals

Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which the genes encoding native IFN-L polypeptide have been disrupted (*i.e.*, “knocked out”) such that the level of expression of IFN-L polypeptide is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of an IFN-L gene for that animal or a heterologous IFN-L gene is over-expressed by the animal, thereby creating a “transgenic” animal. Such transgenic animals may be prepared using well known methods such as those described in U.S. Patent No 5,489,743 and PCT Pub. No. WO 94/28122.

The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the IFN-L polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (*e.g.*, by using homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native IFN-L polypeptides.

These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the IFN-L gene. In certain embodiments, the amount of IFN-L polypeptide that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, over-expression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

Assaying for Other Modulators of IFN-L Polypeptide Activity

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of IFN-L polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate IFN-L polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device, or the like.

"Test molecule" refers to a molecule that is under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of an IFN-L polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with an IFN-L polypeptide. However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate IFN-L polypeptide activity indirectly, such as by affecting IFN-L gene expression, or by binding to an IFN-L polypeptide binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to an IFN-L polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.

Methods for identifying compounds that interact with IFN-L polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, an IFN-L polypeptide is incubated with a test molecule under conditions that permit the interaction of the test molecule with an IFN-L polypeptide, and the extent of the interaction is measured. The test molecule can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture.

In certain embodiments, an IFN-L polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule that interacts with IFN-L polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate IFN-L polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding an IFN-L polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of IFN-L polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

Once a test molecule has been identified as interacting with an IFN-L polypeptide, the molecule may be further evaluated for its ability to increase or decrease IFN-L polypeptide activity. The measurement of the interaction of a test molecule with IFN-L polypeptide may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays, and immunoassays. In general, a test molecule is incubated with an IFN-L polypeptide for a specified period of time, and IFN-L polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with IFN-L polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay. Alternatively, modified forms of IFN-L polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.

In the event that IFN-L polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (*e.g.*, a receptor or a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of an IFN-L polypeptide to the corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor, or ligand). These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of an IFN-L polypeptide

to its binding partner. In one assay, an IFN-L polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled IFN-L polypeptide binding partner (for example, iodinated IFN-L polypeptide binding partner) and a test molecule can then be added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted for radioactivity, using a scintillation counter, to determine the extent to which the binding partner bound to the IFN-L polypeptide. Typically, a molecule will be tested over a range of concentrations, and a series of control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, *i.e.*, immobilizing IFN-L polypeptide binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled IFN-L polypeptide, and determining the extent of IFN-L polypeptide binding. *See, e.g., Current Protocols in Molecular Biology*, chap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995).

As an alternative to radiolabeling, an IFN-L polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin, and the presence of biotinylated protein can then be detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horse radish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), which can be detected colorometrically, or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to an IFN-L polypeptide or to an IFN-L polypeptide binding partner, and which is conjugated to biotin, may also be used for purposes of detection following incubation of the complex with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

A IFN-L polypeptide or an IFN-L polypeptide binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads, or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test compound. After incubation, the beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between an IFN-L polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column with the test molecule and complementary

protein passing through the column. The formation of a complex between an IFN-L polypeptide and its binding partner can then be assessed using any of the techniques described herein (*e.g.*, radiolabelling or antibody binding).

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule which increases or decreases the formation of a complex between an IFN-L polypeptide binding protein and an IFN-L polypeptide binding partner is a surface plasmon resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system is utilized as specified by the manufacturer. This assay essentially involves the covalent binding of either IFN-L polypeptide or an IFN-L polypeptide binding partner to a dextran-coated sensor chip that is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass that is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip, with the change in molecular mass being measured by the detector system.

In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between an IFN-L polypeptide and an IFN-L polypeptide binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneously with, or subsequent to, the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for an effect on the formation of a complex between an IFN-L polypeptide and IFN-L polypeptide binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between an IFN-L polypeptide and an IFN-L polypeptide binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either IFN-L polypeptide or IFN-L polypeptide binding partner. Cells and cell lines may be

obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine, or rodent sources. The binding of an IFN-L polypeptide to cells expressing IFN-L polypeptide binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to an IFN-L polypeptide binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the IFN-L gene. In certain embodiments, the amount of IFN-L polypeptide or an IFN-L polypeptide fragment that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the over-expression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

Internalizing Proteins

The *tat* protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. See, e.g., Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:664-68. For example, an 11 amino acid sequence (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 18) of the HIV *tat* protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. See Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 19),

which penetrate tissues following intraperitoneal administration, are prepared, and the binding of such constructs to cells is detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Cells treated with a *tat*- β -gal fusion protein will demonstrate β -gal activity. Following injection, expression of such a construct can be detected in a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue. It is believed that such constructs undergo some degree of unfolding in order to enter the cell, and as such, may require a refolding following entry into the cell.

It will thus be appreciated that the *tat* protein sequence may be used to internalize a desired polypeptide into a cell. For example, using the *tat* protein sequence, an IFN-L antagonist (such as an anti-IFN-L selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of an IFN-L molecule. As used herein, the term "IFN-L molecule" refers to both IFN-L nucleic acid molecules and IFN-L polypeptides as defined herein. Where desired, the IFN-L protein itself may also be internally administered to a cell using these procedures. See also, Straus, 1999, *Science* 285:1466-67.

Cell Source Identification Using IFN-L Polypeptide

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with an IFN-L polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In certain embodiments, nucleic acids encoding an IFN-L polypeptide can be used as a probe to identify cells described herein by screening the nucleic acids of the cells with such a probe. In other embodiments, one may use anti-IFN-L polypeptide antibodies to test for the presence of IFN-L polypeptide in cells, and thus, determine if such cells are of the types described herein.

IFN-L Polypeptide Compositions and Administration

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such IFN-L polypeptide pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of an IFN-L polypeptide or an IFN-L nucleic acid molecule in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more IFN-L polypeptide selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

The pharmaceutical composition may contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or

wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides – preferably sodium or potassium chloride – or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. See *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990).

The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery format, and desired dosage. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the IFN-L molecule.

The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for injection may be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present invention, IFN-L polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the IFN-L polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The IFN-L polypeptide pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range of from about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable, aqueous solution comprising the desired IFN-L molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which an IFN-L molecule is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, IFN-L polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. IFN-L polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in PCT Pub. No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, IFN-L polypeptides that are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is

maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the IFN-L polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of IFN-L polypeptides in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

Additional IFN-L polypeptide pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving IFN-L polypeptides in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bio-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. *See, e.g.*, PCT/US93/00829, which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles; *e.g.* films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919 and European Patent No. 058481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-56), poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (European Patent No. 133988). Sustained-release compositions may also include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the

art. See, e.g., Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92; and European Patent Nos. 036676, 088046, and 143949.

The IFN-L pharmaceutical composition to be used for *in vivo* administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or in a form (e.g., lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (e.g., liquid syringes and lyosyringes).

The effective amount of an IFN-L pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the IFN-L molecule is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titer the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 $\mu\text{g/kg}$ to up to

about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 5 µg/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the IFN-L molecule in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, *e.g.*, orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

In some cases, it may be desirable to use IFN-L polypeptide pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to IFN-L polypeptide pharmaceutical compositions after which the cells, tissues, or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, an IFN-L polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the IFN-L polypeptide. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogeneic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

As discussed herein, it may be desirable to treat isolated cell populations (such as stem cells, lymphocytes, red blood cells, chondrocytes, neurons, and the like) with one or more IFN-L polypeptides. This can be accomplished by exposing the isolated cells to the polypeptide directly, where it is in a form that is permeable to the cell membrane.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (e.g., homologous recombination and/or other recombinant production methods) for both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally-silent IFN-L gene, or an under-expressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of IFN-L polypeptides.

Homologous recombination is a technique originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the mammalian genome (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44:419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8583-87) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330:576-78). Exemplary homologous

recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505500; PCT/US90/07642, and PCT Pub No. WO 91/09955).

Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA that may interact with or control the expression of an IFN-L polypeptide, *e.g.*, flanking sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired IFN-L polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression of the desired IFN-L polypeptide may be achieved not by transfection of DNA that encodes the IFN-L gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of an IFN-L gene.

In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination

into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA which includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon, and the splice donor site present in the DNA construct are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, IFN-L polypeptide production from a cell's endogenous IFN-L gene involves first using homologous recombination to place a recombination sequence from a site-specific recombination system (*e.g.*, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) upstream of (*i.e.*, 5' to) the cell's endogenous genomic IFN-L polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic IFN-L polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic IFN-L polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251:1351-55). Any flanking sequences known to increase transcription (*e.g.*, enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if properly

positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased IFN-L polypeptide production from the cell's endogenous IFN-L gene.

A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic IFN-L polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, and translocation) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased IFN-L polypeptide production from the cell's endogenous IFN-L gene.

An additional approach for increasing, or causing, the expression of IFN-L polypeptide from a cell's endogenous IFN-L gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased IFN-L polypeptide production from the cell's endogenous IFN-L gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (*e.g.*, a polypeptide comprising a site specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased IFN-L polypeptide production from the cell's endogenous IFN-L gene results.

The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a) - (d) into a target gene in a cell such that the elements (b) - (d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory

sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a) - (f) such that the elements of (b) - (f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of IFN-L polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding an IFN-L polypeptide, which nucleotides may be used as targeting sequences.

IFN-L polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing IFN-L polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of IFN-L polypeptide. Such IFN-L polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of IFN-L polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce IFN-L polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired IFN-L polypeptide or with a gene augmenting the expression of IFN-L polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered an IFN-L polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing IFN-L polypeptide be of human origin and produce human IFN-L polypeptide.

Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing IFN-L polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human IFN-L polypeptide.

Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of IFN-L polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue. Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce IFN-L polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge *et al.* (PCT Pub. No. WO 95/05452 and PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters that are not subject to down-regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, *see* U.S. Patent Nos. 4,892,538; 5,011,472; and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in PCT Pub. No. WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). *See also*, PCT Pub. No. WO 91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29; Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75; and Tresco *et al.*, 1992, *ASAIO* 38:17-23.

In vivo and *in vitro* gene therapy delivery of IFN-L polypeptides is also envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the IFN-L gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA) encoding an IFN-L polypeptide which may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct." The promoter may be homologous or

heterologous to the endogenous IFN-L gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include DNA molecules designed for site-specific integration (*e.g.*, endogenous sequences useful for homologous recombination), tissue-specific promoters, enhancers or silencers, DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as labels to identify transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, transcription factors enhancing expression from a vector, and factors enabling vector production.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex vivo* or *in vivo*) using viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the IFN-L gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs to dimerize chimeric proteins which contain a small molecule-binding domain and a domain capable of initiating a biological process, such as a DNA-binding protein or transcriptional activation protein (*see* PCT Pub. Nos. WO 96/41865, WO 97/31898, and WO 97/31899). The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain that results in the retention of the aggregated protein in the

endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (*e.g.*, small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. See Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287:816-17 and Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287:826-30.

Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the systems described herein. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors that then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. Patent No. 5,364,791 and PCT Pub. Nos. WO 96/40911 and WO 97/10337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone) which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain, DNA-binding domain, and ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No. 5,514,578 and PCT Pub. Nos. WO 97/38117, WO 96/37609, and WO 93/03162.

Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, *i.e.*, it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758, 5,650,298, and 5,654,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Innovir Laboratories

Inc.

In vivo gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding IFN-L polypeptide into cells via local injection of an IFN-L nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefti, 1994, *Neurobiology* 25:1418-35. For example, a nucleic acid molecule encoding an IFN-L polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the targeted cells (*see, e.g.*, Johnson, PCT Pub. No. WO 95/34670; PCT App. No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome typically contains AAV inverted terminal repeats flanking a DNA sequence encoding an IFN-L polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells which have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236 (involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (*e.g.*, gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems

(safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 4,970,154 (involving electroporation techniques), 5,679,559 (describing a lipoprotein-containing system for gene delivery), 5,676,954 (involving liposome carriers), 5,593,875 (describing methods for calcium phosphate transfection), and 4,945,050 (describing a process wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells), and PCT Pub. No. WO 96/40958 (involving nuclear ligands).

It is also contemplated that IFN-L gene therapy or cell therapy can further include the delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

A means to increase endogenous IFN-L polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the IFN-L polypeptide promoter, where the enhancer elements can serve to increase transcriptional activity of the IFN-L gene. The enhancer elements used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene – enhancer elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding an IFN-L polypeptide is to be “turned on” in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the IFN-L polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequences) using standard cloning techniques. This construct, known as a “homologous recombination construct,” can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy also can be used to decrease IFN-L polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter. Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the IFN-L gene selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example, the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding IFN-L gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the IFN-L polypeptide promoter (from the same or a related species as the IFN-L gene to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

Therapeutic Uses

IFN-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including those recited herein.

IFN-L polypeptide agonists and antagonists include those molecules which regulate IFN-L polypeptide activity and either increase or decrease at least one activity of the mature form of the IFN-L polypeptide. Agonists or antagonists may be co-factors, such as a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule, which interact with IFN-L polypeptide and thereby regulate its activity. Potential polypeptide agonists or antagonists include antibodies that react with either soluble or membrane-bound forms of IFN-L polypeptides that comprise part or all of the extracellular domains of the said proteins. Molecules that regulate IFN-L polypeptide expression typically include nucleic acids encoding IFN-L polypeptide that can act as anti-sense regulators of expression.

IFN-L polypeptides may play a role in controlling the growth and maintenance of cancer cells based on the homology of IFN-L polypeptides to known interferons. Accordingly, IFN-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof may be useful for the diagnosis and/or treatment of cancer. Examples of such cancers include, but are not limited to, chronic myelogenous leukemia, hairy cell leukemia, Kaposi's sarcoma, melanomas, lung cancer, brain cancer, breast cancer, cancers of the hematopoietic system, prostate cancer, ovarian cancer, and testicular cancer. Other cancers are encompassed within the scope of the invention.

IFN-L polypeptides may play a role in the modulation of the immune system based on the homology of IFN-L polypeptides to known interferons. Accordingly, IFN-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof may be useful for the diagnosis and/or treatment of dysfunction of the immune system. Examples of such diseases include, but are not limited to, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, inflammatory arthritis, osteoarthritis, inflammatory joint disease, autoimmune disease, lupus, diabetes, inflammatory bowel disease, transplant rejection, and graft vs. host disease. Other diseases influenced by the dysfunction of the immune system are encompassed within the scope of the invention.

IFN-L polypeptides may play a role in the control of viral and microbial

infections based on the homology of IFN-polypeptides to known interferons. Accordingly, IFN-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof may be useful for the diagnosis and/or treatment of infections. Examples of such diseases include, but are not limited to, hepatitis, human immunodeficiency virus, human papilloma virus, and chronic granulomatous. Other diseases caused by infections are encompassed within the scope of the invention.

IFN-L polypeptides may play a role in the control of bone formation and maintenance based on the homology of IFN-polypeptides to known interferons. Accordingly, IFN-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists may be useful for the diagnosis and/or treatment of bone disorders. Examples of such diseases include, but are not limited to, osteoporosis, osteopetrosis, osteogenesis imperfecta, Paget's disease, periodontal disease, and hypercalcemia. Other bone disorders are encompassed within the scope of the invention.

IFN-L polypeptides may play a role in the inappropriate proliferation of cells based on the homology of IFN-polypeptides to known interferons. Accordingly, IFN-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists may be useful for the diagnosis and/or treatment of diseases where there is abnormal cell proliferation.. Examples of such diseases include, but are not limited to, arteriosclerosis and vascular restenosis. Other diseases influenced by the inappropriate proliferation of cells are encompassed within the scope of the invention.

In a specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with secreted or soluble human fas antigen or recombinant versions thereof (PCT Pub. No. WO 96/20206; Mountz *et al.*, 1995, *J. Immunol.*, 155:4829-37; and European Patent No. 510691). PCT Pub. No. WO 96/20206 discloses secreted human fas antigen (native and recombinant, including an Ig fusion protein), methods for isolating the genes responsible for coding the soluble recombinant human fas antigen, methods for cloning the gene in suitable vectors

and cell types, and methods for expressing the gene to produce the inhibitors. European Patent No. 510691 teaches nucleic acids coding for human fas antigen, including soluble fas antigen, vectors expressing for said nucleic acids, and transformants transfected with the vector. When administered parenterally, doses of a secreted or soluble fas antigen fusion protein each are generally from about 1 µg/kg to about 100 µg /kg.

Treatment of the diseases and disorders recited herein can include the use of first line drugs for control of pain and inflammation; these drugs are classified as non-steroidal, anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Secondary treatments include corticosteroids, slow acting antirheumatic drugs (SAARDs), or disease modifying (DM) drugs. Information regarding the following compounds can be found in *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (16th ed. 1992) and in *Pharmaprojects* (PJB Publications Ltd).

In a specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide and any of one or more NSAIDs for the treatment of the diseases and disorders recited herein, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, and graft versus host disease. NSAIDs owe their anti-inflammatory action, at least in part, to the inhibition of prostaglandin synthesis (Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (7th ed. 1985)). NSAIDs can be characterized into at least nine groups: (1) salicylic acid derivatives, (2) propionic acid derivatives, (3) acetic acid derivatives, (4) fenamic acid derivatives, (5) carboxylic acid derivatives, (6) butyric acid derivatives, (7) oxicams, (8) pyrazoles, and (9) pyrazolones.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more salicylic acid derivatives, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. Such salicylic acid derivatives, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: acetaminosalol, aloxiprin, aspirin, benorylate, bromosaligenin, calcium acetylsalicylate, choline magnesium trisalicylate, magnesium salicylate, choline salicylate, diflusal, etersalate, fendosal, gentisic acid, glycol salicylate,

imidazole salicylate, lysine acetylsalicylate, mesalamine, morpholine salicylate, 1-naphthyl salicylate, olsalazine, parsalimide, phenyl acetylsalicylate, phenyl salicylate, salacetamide, salicylamide O-acetic acid, salsalate, sodium salicylate and sulfasalazine. Structurally related salicylic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In an additional specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more propionic acid derivatives, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. The propionic acid derivatives, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: alminoprofen, benoxaprofen, bucloxic acid, carprofen, dexindoprofen, fenoprofen, flunoxaprofen, fluprofen, flurbiprofen, furciprofen, ibuprofen, ibuprofen aluminum, ibuprofen sodium, indoprofen, isoprofen, ketoprofen, loxoprofen, miroprofen, naproxen, naproxen sodium, oxaprozin, piketoprofen, pimeprofen, pirprofen, pranoprofen, protizinic acid, pyridoxiprofen, suprofen, tiaprofenic acid and tioxaprofen. Structurally related propionic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In yet another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more acetic acid derivatives, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. The acetic acid derivatives, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: acetaminophen, alclometacin, amfenac, bufexamac, cinmetacin, clopirac, delmetacin, diclofenac potassium, diclofenac sodium, etodolac, felbinac, fenclofenac, fenclorac, fenclozic acid, fentiazac, furofenac, glucametacin, ibufenac, indomethacin, isofezolac, isoxepac, lonazolac, metiazinic acid, oxametacin, oxpinac, pimetacin, proglumetacin, sulindac, talmetacin, tiaramide, tiopinac, tolmetin, tolmetin sodium, zidometacin and zomepirac. Structurally related acetic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are

also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more fenamic acid derivatives, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. The fenamic acid derivatives, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: enfenamic acid, etofenamate, flufenamic acid, isonixin, meclofenamic acid, meclofenamate sodium, medofenamic acid, mefenamic acid, niflumic acid, talniflumate, terofenamate, tolfenamic acid and ufenamate. Structurally related fenamic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In an additional specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more carboxylic acid derivatives, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. The carboxylic acid derivatives, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof which can be used comprise: clidanac, diflunisal, flufenisal, inoridine, ketorolac and tinoridine. Structurally related carboxylic acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In yet another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more butyric acid derivatives, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. The butyric acid derivatives, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: bumadizon, butibufen, fenbufen and xenbucin. Structurally related butyric acid derivatives having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more oxicams, prodrug esters, or

pharmaceutically acceptable salts thereof. The oxicams, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam and 4-hydroxyl-1,2-benzothiazine 1,1-dioxide 4-(N-phenyl)-carboxamide. Structurally related oxicams having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In still another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more pyrazoles, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. The pyrazoles, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof which may be used comprise: difenamizole and epirizole. Structurally related pyrazoles having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In an additional specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or, concurrent treatment) with any of one or more pyrazolones, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof. The pyrazolones, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof which may be used comprise: apazone, azapropazone, benzpiperylon, feprazone, mofebutazone, morazone, oxyphenbutazone, phenylbutazone, pipebuzone, propylphenazone, ramifenazone, suxibuzone and thiazolinobutazone. Structurally related pyrazolones having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more of the following: NSAIDs: ϵ -acetamidocaproic acid, S-adenosylmethionine, 3-amino-4-hydroxybutyric acid, amixetrine, anitrazafen, antrafenine, bendazac, bendazac lysinate, benzydamine, beprozin, broperamole, bucolome, bufezolac, ciproquazone, cloximate, dazidamine, deboxamet, detomidine, difenpiramide, difenpyramide, difisalamine,

ditazol, emorfazone, fanetizole mesylate, fenflumizole, floctafenine, flumizole, flunixin, fluproquazone, fopirtoline, fosfosal, guaimesal, guaiazolene, isonixim, lefetamine HCl, leflunomide, lofemizole, lotifazole, lysin clonixinate, meseclazone, nabumetone, nictindole, nimesulide, orgotein, orpanoxin, oxaceprol, oxapadol, paranyline, perisoxal, perisoxal citrate, pifoxime, piproxen, pirazolac, pirfenidone, proquazone, proxazole, thielavin B, tiiflamizole, timegadine, tolectin, tolpadol, tryptamid and those designated by company code number such as 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (4-benzoyl-1-indancarboxylic acid), TVX2706, U60257, UR2301 and WY41770. Structurally related NSAIDs having similar analgesic and anti-inflammatory properties to the NSAIDs are also intended to be encompassed by this group.

In still another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment or concurrent treatment) with any of one or more corticosteroids, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of the diseases and disorders recited herein, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, graft versus host disease, and multiple sclerosis. Corticosteroids, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof include hydrocortisone and compounds which are derived from hydrocortisone, such as 21-acetoxypregnenolone, alclomerasone, algestone, amcinonide, beclomethasone, betamethasone, betamethasone valerate, budesonide, chloroprednisone, clobetasol, clobetasol propionate, clobetasone, clobetasone butyrate, clocortolone, cloprednol, corticosterone, cortisone, cortivazol, deflazacon, desonide, desoximetasone, dexamethasone, diflorasone, diflucortolone, difluprednate, enoxolone, fluazacort, flucloronide, flumethasone, flumethasone pivalate, flucinolone acetonide, flunisolide, fluocinonide, fluorocinolone acetonide, fluocortin butyl, fluocortolone, fluocortolone hexanoate,

diflucortolone valerate, fluorometholone, fluperolone acetate, fluprednidene acetate, fluprednisolone, flurandrenolide, formocortol, halcinonide, halometasone, halopredone acetate, hydrocortamate, hydrocortisone, hydrocortisone acetate, hydrocortisone butyrate, hydrocortisone phosphate, hydrocortisone 21-sodium succinate, hydrocortisone tebutate, mazipredone, medrysone, meprednisone, methylprednisolone, mometasone furoate, paramethasone, prednicarbate, prednisolone, prednisolone 21-diedryaminoacetate, prednisolone sodium phosphate, prednisolone sodium succinate, prednisolone sodium 21-*m*-sulfobenzoate, prednisolone sodium 21-stearoglycolate, prednisolone tebutate, prednisolone 21-trimethylacetate, prednisone, prednival, prednylidene, prednylidene 21-diethylaminoacetate, tixocortol, triamcinolone, triamcinolone acetonide, triamcinolone benetonide and triamcinolone hexacetonide. Structurally related corticosteroids having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more slow-acting antirheumatic drugs (SAARDs) or disease modifying antirheumatic drugs (DMARDS), prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of the diseases and disorders recited herein, including acute and chronic inflammation such as rheumatic diseases, graft versus host disease, and multiple sclerosis. SAARDs or DMARDS, prodrug esters, and pharmaceutically acceptable salts thereof comprise: allocupreide sodium, auranofin, aurothioglucose, aurothioglycanide, azathioprine, brequinar sodium, bucillamine, calcium 3-aurothio-2-propanol-1-sulfonate, chlorambucil, chloroquine, clobuzarit, cuproxoline, cyclophosphamide, cyclosporin, dapsone, 15-deoxyspergualin, diacerein, glucosamine, gold salts (e.g., cycloquine gold salt, gold sodium thiomalate, gold sodium thiosulfate), hydroxychloroquine, hydroxychloroquine sulfate, hydroxyurea, kebusone, levamisole, lobenzarit, melittin, 6-mercaptopurine, methotrexate, mizoribine, mycophenolate mofetil, myoral, nitrogen mustard, D-penicillamine, pyridinol imidazoles such as SKNF86002 and SB203580, rapamycin, thiols, thymopoietin

and vincristine. Structurally related SAARDs or DMARDs having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more COX2 inhibitors, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of the diseases and disorders recited herein, including acute and chronic inflammation. Examples of COX2 inhibitors, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof include, for example, celecoxib. Structurally related COX2 inhibitors having similar analgesic and anti-inflammatory properties are also intended to be encompassed by this group.

In still another specific embodiment, the present invention is directed to the use of an IFN-L polypeptide in combination (pretreatment, post-treatment, or concurrent treatment) with any of one or more antimicrobials, prodrug esters, or pharmaceutically acceptable salts thereof for the treatment of the diseases and disorders recited herein, including acute and chronic inflammation. Antimicrobials include, for example, the broad classes of penicillins, cephalosporins and other beta-lactams, aminoglycosides, azoles, quinolones, macrolides, rifamycins, tetracyclines, sulfonamides, lincosamides and polymyxins. The penicillins include, but are not limited to, penicillin G, penicillin V, methicillin, nafcillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, floxacillin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, hetacillin, cyclacillin, bacampicillin, carbenicillin, carbenicillin indanyl, ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, azlocillin, mezlocillin, peperacillin, and mecillinam. The cephalosporins and other beta-lactams include, but are not limited to, cephalothin, cephapirin, cephalexin, cephradine, cefazolin, cefadroxil, cefaclor, cefamandole, cefotetan, cefoxitin, ceruroxime, cefonicid, ceforadine, cefixime, cefotaxime, moxalactam, ceftizoxime, ceftriaxone, cephoperazone, ceftazidime, imipenem and aztreonam. The aminoglycosides include, but are not limited to, streptomycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, kanamycin and neomycin. The

azoles include, but are not limited to, fluconazole. The quinolones include, but are not limited to, nalidixic acid, norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin and temafloxacin. The macrolides include, but are not limited to, erythromycin, spiramycin and azithromycin. The rifamycins include, but are not limited to, rifampin. The tetracyclines include, but are not limited to, spicycline, chlortetracycline, clomocycline, demeclocycline, deoxycycline, guamecycline, lymecycline, meclocycline, methacycline, minocycline, oxytetracycline, penimepicycline, pipacycline, rolitetracycline, sancycline, senociclin and tetracycline. The sulfonamides include, but are not limited to, sulfanilamide, sulfamethoxazole, sulfacetamide, sulfadiazine, sulfisoxazole and co-trimoxazole (trimethoprim/sulfamethoxazole). The lincosamides include, but are not limited to, clindamycin and lincomycin. The polymyxins (polypeptides) include, but are not limited to, polymyxin B and colistin.

Agonists or antagonists of IFN-L polypeptide function may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the condition being treated.

Other diseases caused by or mediated by undesirable levels of IFN-L polypeptides are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive levels of IFN-L polypeptides and sub-normal levels of IFN-L polypeptides.

Uses of IFN-L Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the invention (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be used to map the locations of the IFN-L gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

IFN-L nucleic acid molecules (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides), may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of

an IFN-L nucleic acid molecule in mammalian tissue or bodily fluid samples.

Other methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more IFN-L polypeptides. Such inhibition may be effected by nucleic acid molecules that are complementary to and hybridize to expression control sequences (triple helix formation) or to IFN-L mRNA. For example, antisense DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of an IFN-L gene can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of the IFN-L gene disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5' end) of each selected IFN-L gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding IFN-L mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of an IFN-L polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative inhibitor of one or more IFN-L polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected IFN-L polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

In addition, an IFN-L polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to an IFN-L polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of IFN-L polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent, treat, or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited herein. The antibodies may bind to an IFN-L polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of an IFN-L polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase at least one activity characteristic of an IFN-

L polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the IFN-L polypeptide).

The IFN-L polypeptides of the present invention can be used to clone IFN-L polypeptide receptors, using an expression cloning strategy. Radiolabeled (¹²⁵Iodine) IFN-L polypeptide or affinity/activity-tagged IFN-L polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be used in binding assays to identify a cell type or cell line or tissue that expresses IFN-L polypeptide receptors. RNA isolated from such cells or tissues can be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (such as COS or 293 cells) to create an expression library. A radiolabeled or tagged IFN-L polypeptide can then be used as an affinity ligand to identify and isolate from this library the subset of cells that express the IFN-L polypeptide receptors on their surface. DNA can then be isolated from these cells and transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing IFN-L polypeptide receptors is many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant clone containing an IFN-L polypeptide receptor is isolated. Isolation of the IFN-L polypeptide receptors is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the IFN-L polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble IFN-L polypeptide receptors, anti-IFN-L polypeptide receptor antibodies, small molecules, or antisense oligonucleotides, and they may be used for treating, preventing, or diagnosing one or more of the diseases or disorders described herein.

A deposit of cDNA encoding human IFN-L polypeptide, subcloned into pSPORT1 (Gibco BRL) and transfected into *E. coli* strain DH10B, having Accession No. PTA-976, were made with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on November 23, 1999.

The following examples are intended for illustration purposes only, and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

Example 1: Cloning of the Rat IFN-L Polypeptide Gene

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze the gene encoding rat IFN-L polypeptide.

Sequences encoding the rat IFN-L polypeptide were isolated from a rat placenta cDNA library by large scale random cDNA sequencing in combination with computer-assisted analysis. To construct the rat placenta cDNA library, rat embryo day 17 [E17] placenta mRNA was prepared by standard methods (Chomczynski and Sacchi, 1987, *Anal. Biochem.* 162:156). Following synthesis using the Superscript Plasmid cDNA kit (Gibco BRL), rat cDNA was subcloned into the *Sal* I and *Not* I sites of the pSPORT1 vector (Gibco BRL).

Sequence analysis of the full-length cDNA for rat IFN-L polypeptide indicated that the gene comprises a 573 bp open reading frame encoding a protein of 191 amino acids (Figures 1A-1B). The rat IFN-L polypeptide sequence is predicted to contain a signal peptide (Figure 1A, predicted signal peptide indicated by underline). The rat IFN-L polypeptide sequence was identified as being a novel member of the interferon family of proteins following comparisons of the rat IFN-L polypeptide sequence with protein sequences in the GenBank database.

Example 2: Cloning of the Human IFN-L Polypeptide Gene

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze the gene encoding human IFN-L polypeptide.

An examination of the genomic structure of known members of the Interferon gene family revealed that members of this family share a unique intronless structure. Sequences encoding the human IFN-L polypeptide were, therefore, isolated by screening a human genomic DNA library with a probe derived from the rat IFN-L polypeptide gene.

A radioactive rat IFN-L probe was generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification of rat IFN-L polypeptide cDNA. Polymerase chain reactions (PCR) were performed using a Perkin-Elmer 9600 thermocycler (PE Biosystems, Foster City, CA) and the following reaction conditions: 20 ng of rat IFN-L

polypeptide cDNA, 20 pmol each of primers 1795-01 (5'-A-T-G-A-C-A-C-T-G-A-A-G-T-A-T-T-T-A-T-G-G-3'; SEQ ID NO: 20) and 1795-02 (5'-A-T-T-C-A-T-G-T-T-G-A-G-T-A-G-T-T-T-G-T-A-3'; SEQ ID NO: 21), 1 mmol each of dATP, dTTP, dGTP, 0.01 mmol dCTP, 100 μ Ci 32 P-dCTP, 4 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, and 5U Taq polymerase (PE Biosystems). A "cold" PCR reaction (*i.e.*, one not performed in the presence of radioactively labeled dCTP, and utilizing a balanced dNTP mix) was prepared simultaneously with the labeled reaction. Amplification reactions were carried out at 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 45 cycles. Pooled labeled and unlabeled probe was purified using a Quick Spin G-50 column (Qiagen), boiled at 100°C for 10 minutes, and chilled on ice for 20 minutes prior to addition to the hybridization solution. Probes with a specific activity of at least 5×10^5 cpm/ μ L were generated using this method.

Sequences encoding the human IFN-L polypeptide were isolated by screening a human lambda genomic DNA library (Stratagene, Cat. No. 946206). For the primary screen, 1×10^6 clones were plated at a density of 50,000 colonies/plate and transferred to nitrocellulose filters using standard techniques. Positive clones were re-screened prior to analysis.

The rat IFN-L probe was hybridized to the filters overnight at 42°C in 30% formamide, 5X SSC, 2X Denhart's, 10 μ g/mL salmon sperm DNA, 0.2% SDS, 2 mM EDTA, and 0.1% pyrophosphate. Following hybridization, filters were washed for 30-60 minutes at room temperature in 1X SSC and 0.1% SDS and then for 15 minutes at 55°C in 0.2X SSC and 0.1% SDS.

Three positive clones were recovered following primary and secondary screening, and lambda phage DNA was prepared by a solid plate culture method. The *Not* I insert was excised from the clones and ligated into pSPORT1 (Gibco BRL), and these ligations were subsequently used to transform *E. coli* strain DH10. Following transformation, plasmids were recovered using a Spin Column plasmid prep kit (Qiagen).

Plasmids derived from the three positive genomic DNA clones were analyzed by Southern blot analysis using the rat IFN-L probe utilized in the

genomic DNA library screening. After digesting the recovered plasmid DNA with *Hind* III, the digested fragments were resolved on an agarose gel, and then transferred to a nylon membrane. Hybridization conditions were identical to those utilized in the genomic DNA library screen. Southern blot analysis indicated that the three positive genomic clones were likely to contain identical genomic inserts. The fragments hybridizing with the rat IFN-L probe were subsequently subcloned into pSPORT1 for sequencing analysis. This analysis confirmed that the three positive genomic DNA clones contained identical genomic inserts.

Sequence analysis of the three genomic clones containing sequences encoding human IFN-L polypeptide indicated that the gene comprises a 621 bp open reading frame encoding a protein of 207 amino acids (Figures 2A-2B). The human IFN-L polypeptide sequence is predicted to contain a signal peptide (Figure 2A, predicted signal peptide indicated by underline). Sequence analysis of IFN-L polypeptide strongly suggests that the protein is a secreted cytokine molecule.

A similarity of 64% was observed between the open reading frame of the human IFN-L gene and that of the rat IFN-L cDNA. Figure 3 illustrates the amino acid sequence alignment of human IFN-L polypeptide (SEQ ID NO: 2), human IFN- β (SEQ ID NO: 7), and rat IFN-L polypeptide (SEQ ID NO: 4). Human IFN-L polypeptide is 30% identical to human IFN- β . Human IFN-L polypeptide is 40.5% identical to and 50% similar to rat IFN-L polypeptide. All five predicted cysteine residues in human IFN-L polypeptide are perfectly aligned with those in rat IFN-L polypeptide.

Example 3: IFN-L mRNA Expression

Developmental expression patterns of IFN-L mRNA were determined by Northern blot analysis using a ^{32}P -labeled full-length rat cDNA probe to detect the presence of the IFN-L polypeptide transcript in several different stages of mouse and rat embryos. RNA was isolated from the rat and mouse embryos using the same techniques employed for the construction of the rat placenta cDNA library.

Northern blots were prehybridized in 40% formamide, 5X SSC, 1 mM EDTA, and 0.1% for 4 hours at 42°C. The blots were hybridized overnight at 42°C in the same solution, except for the addition of the rat IFN-L probe. Following hybridization, blots were washed for 30 minutes at 60°C in 1X SSC and 0.1% SDS.

Expression of IFN-L mRNA was examined in various human tissues by RT-PCR using standard techniques. Human IFN-L mRNA was detected in pancreas, small intestine, prostate, uterus, thyroid, and placenta.

The expression of IFN-L mRNA is localized by *in situ* hybridization. A panel of normal embryonic and adult mouse tissues is fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5 µm. Sectioned tissues are permeabilized in 0.2 M HCl, digested with Proteinase K, and acetylated with triethanolamine and acetic anhydride. Sections are prehybridized for 1 hour at 60°C in hybridization solution (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 10 mM DTT, 0.25 mg/ml tRNA, 25 µg/ml polyA, 25 µg/ml polyC and 50% formamide) and then hybridized overnight at 60°C in the same solution containing 10% dextran and 2×10^4 cpm/µl of a ³³P-labeled antisense riboprobe complementary to the human IFN-L gene. The riboprobe is obtained by *in vitro* transcription of a clone containing human IFN-L cDNA sequences using standard techniques.

Following hybridization, sections are rinsed in hybridization solution, treated with RNaseA to digest unhybridized probe, and then washed in 0.1X SSC at 55°C for 30 minutes. Sections are then immersed in NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY), exposed for 3 weeks at 4°C, developed, and counterstained with hematoxylin and eosin. Tissue morphology and hybridization signal are simultaneously analyzed by darkfield and standard illumination for brain (one sagittal and two coronal sections), gastrointestinal tract (esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon), pituitary, liver, lung, heart, spleen, thymus, lymph nodes, kidney, adrenal, bladder, pancreas, salivary gland, male and female reproductive organs (ovary, oviduct, and uterus in the female; and testis, epididymus, prostate, seminal vesicle, and vas deferens in

the male), BAT and WAT (subcutaneous, peri-renal), bone (femur), skin, breast, and skeletal muscle.

Example 4: Production of IFN-L Polypeptides

A. Expression of IFN-L Polypeptides in Bacteria

PCR was used to amplify template DNA sequences encoding either human or rat IFN-L polypeptide using primers that corresponded to the 5' and 3' ends of the sequence (Table I) and which incorporated restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector. Following amplification, PCR products were gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into the expression vector pAMG21 (ATCC No. 98113) using standard recombinant DNA techniques. After the ligation of PCR insert and vector sequences, the ligation reaction mixtures were used to transform an *E. coli* host strain (e.g., Amgen strain #2596) by electroporation and transformants were selected for kanamycin drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies was isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert.

To construct a rat IFN-L polypeptide bacterial expression vector, IFN-L nucleic acid sequences were amplified from a cDNA template using the primers 1825-22 and 1825-21. The PCR product that was obtained following amplification with these primers was inserted into the *Nde* I and *Bam* HI sites of pAMG21, and the ligation reaction was then used in bacterial transformation. The resulting bacterial clone was designated Amgen strain #3729. Figure 4 illustrates the nucleotide sequence of the pAMG21 insert of Amgen strain #3729 and the predicted amino acid sequence encoded by this insert.

A rat IFN-L polypeptide bacterial expression vector, in which the cysteine at position 180 was substituted with a serine residue, was constructed using the primers 1825-22 and 1909-56. The PCR product that was obtained following amplification with these primers was inserted into the *Nde* I and *Bam* HI sites of pAMG21, and the ligation reaction was then used in bacterial transformation.

Table I

SEQ ID	Oligonucleotide ID	Sequence
22	1825-22	5' - GAATAACATATGTGTATATCTCGATCATACTATCTTGGAGAATATG - 3'
23	1825-21	5' - CCGCGGATCCATTAAATTCATGTTTCAGCAGTTTGTAAAAAATACTGAAACAACGACGAAATTTCC - 3'
24	1909-56	5' - CCGCGGATCCATTAAATTCATGTTTCAGCAGTTTGTAAAAAATACTGAAAGAACGACGAAATTTCC - 3'
25	1967-32	5' - TTGATCTAGAAAGGAGGAATAACATATGTGTAACTGCTGAACGTTTCACCTGCGTCGTGTTACCTGG - 3'
26	1982-14	5' - CCGCGGATCCATTATTTACGACGGAACAGAGCGGTAAATTTGTAAAAGTAGTACAGGCAACGACGATTTCC - 3'
27	1967-33	5' - CCGCGGATCCATTATTTACGACGGAACAGAGCGGTAAATTTGTAAAAGTAGTACAGAGAACGACGATTTCC - 3'
28	2103-87	5' - AAGGAGCATATGCTGGACTGTAACTGCTGAACGTTTCAC - 3'
29	1200-54	5' - GTTATTGCTCAGCGGTGGCA - 3'

The resulting bacterial clone was designated Amgen strain #3858. Figure 5 illustrates the nucleotide sequence of the pAMG21 insert of Amgen strain #3858 and the predicted amino acid sequence encoded by this insert.

To construct a human IFN-L polypeptide bacterial expression vector, IFN-L nucleic acid sequences were amplified from a cDNA template using the primers 1967-32 and 1982-14. The PCR product that was obtained following amplification with these primers was inserted into the *Xba* I and *Bam* HI sites of pAMG21, and the ligation reaction was then used in bacterial transformation. The resulting bacterial clone was designated Amgen strain #4047. Figure 6 illustrates the nucleotide sequence of the pAMG21 insert of Amgen strain #4047 and the predicted amino acid sequence encoded by this insert.

A human IFN-L polypeptide bacterial expression vector, in which the cysteine at position 193 was substituted with a serine residue, was constructed using the primers 1967-32 and 1967-33. The PCR product that was obtained following amplification with these primers was inserted into the *Xba* I and *Bam* HI sites of pAMG21, and the ligation reaction was then used in bacterial transformation. The resulting bacterial clone was designated Amgen strain #3969. Figure 7 illustrates the nucleotide sequence of the pAMG21 insert of Amgen strain #3969 and the predicted amino acid sequence encoded by this insert.

A human IFN-L polypeptide bacterial expression vector, expressing an N-terminal variant of human IFN-L polypeptide, was constructed by amplifying plasmid from strain #4047 with the primers 1967-32 and 1967-33. The PCR product that was obtained following amplification with these primers was inserted into the *Nde* I and *Bam* HI sites of pAMG21, and the ligation reaction was then used in bacterial transformation. The resulting bacterial clone was designated Amgen strain #4182. Figure 8 illustrates the nucleotide sequence of the pAMG21 insert of Amgen strain #4182 and the predicted amino acid sequence encoded by this insert.

To generate IFN-L polypeptides, transformed host cells were first incubated in Terrific Broth medium containing 50 µg/mL kanamycin at 30°C prior

to induction of IFN-L polypeptide. Expression of IFN-L polypeptide was induced by the addition of 30 ng/mL N-(3-oxohexanoyl)-*dl*-homoserine lactone followed by a six hour incubation at either 30°C or 37°C. Expression of IFN-L polypeptide was evaluated by centrifugation of the culture, resuspension and lysis of the bacterial pellets, and analysis of host cell proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A single band on an SDS polyacrylamide gel corresponding to *E. coli* produced IFN-L polypeptide was excised from the gel and N-terminal amino acid sequence was determined essentially as described by Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:10-35).

IFN-L polypeptides were purified as follows. Cells were first lysed in water by high pressure homogenization and inclusion bodies were harvested by centrifugation. Solubilized inclusion bodies were then subjected to a variety of refold conditions.

B. Construction of IFN-L Polypeptide Mammalian Expression Vectors

Native protein and native protein-Fc fusion versions of both human and rat IFN-L polypeptides were produced in either a CHO or 293 mammalian expression system. Template DNA sequences encoding IFN-L polypeptide were amplified by PCR using primers corresponding to the 5' and 3' ends (Table II).

To construct IFN-L polypeptide expression vectors, IFN-L nucleic acid sequences were amplified as described below. Rat IFN-L nucleic acid sequences were obtained using one of three primer pairs (the forward primer 1847-77 and either 1847-88, 1896-56, or 1896-57). A rat IFN-L polypeptide-Fc fusion construct was generated by cloning PCR products prepared with the first set of primers, which incorporated *Hind* III and *Not* I cloning sites and no stop codon. Rat IFN-L soluble polypeptides were generated by cloning PCR products prepared with the second set of primers, which incorporated *Hind* III and *Sal* I cloning sites and two stop codons, into pDSR α , or the third set of primers, which incorporated *Hind* III and *Not* I cloning sites and two stop codons, into pCEP4.

Table II

SEQ ID	Oligonucleotide ID	Sequence
30	1847-77	5'-CCCAAGCTTACCATGACACTGAAGTATTTATG-3'
31	1847-78	5'-AAGGAAAAAAGCGCGGCATTCATGTTGAGTAG-3'
32	1896-56	5'-ACGCGTCGACTCATCAATTTCATGTTGAGTAGTTTG-3'
33	1896-57	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCTCATCAATTCATGTTGAGTAG-3'
34	1954-45	5'-ACGCGTCGACTTATTATTTCCTCCTGAATAG-3'
35	1954-46	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCTTATTATTTCCTCCTGAATAGC-3'
36	1955-44	5'-CCCAAGCTTACCATGAGCACCAACCTGATATG-3'
37	1954-47	5'-CCCAAGCTTACCATGATTCAAAAGTGTGTTGGC-3'
38	1954-48	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCGCCCTCGATTTTCCTCCTGAATAGAGCTGTAA-3'
39	1954-49	5'-AAGGAAAAAAGCGCGCGCTTTCCTCCTGAATAGAGCTGTAA-3'

Human IFN-L nucleic acid sequences were obtained using one of three primer pairs (the forward primer 1954-48 and 1954-49 and the forward primer 1955-44 and either 1854-45 or 1854-46). A human IFN-L polypeptide-Fc fusion construct was generated by cloning PCR products prepared with the first set of primers, which incorporated *Not* I cloning sites, no stop codon, and a Factor Xa cleavage site. Human IFN-L soluble polypeptides were generated by cloning PCR products prepared with the second set of primers, which incorporated *Hind* III and *Sal* I cloning sites and two stop codons, into pDSR α , or the third set of primers, which incorporated *Hind* III and *Not* I cloning sites and two stop codons, into pCEP4. A second forward primer (1954-47) was also utilized in place of 1955-44 to generate constructs possessing two initiation codons.

PCR amplifications were performed using a Perkin-Elmer 9600 thermocycler and the following reaction conditions: 20 ng of rat or human IFN-L polypeptide cDNA, 20 pmol each of the appropriate primers, 1 mmol of dNTPs, 4 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, and 5U Taq polymerase (PE Biosystems). Amplification reactions were carried out at 94°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 4 cycles followed by 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 26 cycles.

PCR products were purified using Qiagen PCR purification spin columns and then subjected to digestion with the appropriate restriction endonucleases. Following digestion, fragments were separated on agarose gels, purified using Qiagen gel purification spin columns, and ligated into the appropriate vectors. Ligations were transformed into the *E. coli* strain DH10. Following sequence analysis of selected transformants, large-scale plasmid stocks were prepared for tissue culture transfection.

C. Expression and Purification of IFN-L Polypeptide in Mammalian Cells

IFN-L polypeptide expression constructs were introduced into 293 EBNA or CHO cells using either a lipofection or calcium phosphate protocol.

To conduct functional studies on the IFN-L polypeptides that were produced, large quantities of conditioned media were generated from a pool of

hygromycin selected 293 EBNA clones. The cells were cultured in 500 cm Nunc Triple Flasks to 80% confluence before switching to serum free media a week prior to harvesting the media. Conditioned media was harvested and frozen at -20°C until purification.

Conditioned media was purified by affinity chromatography as described below. The media was thawed and then passed through a 0.2 µm filter. A Protein G column was equilibrated with PBS at pH 7.0, and then loaded with the filtered media. The column was washed with PBS until the absorbance at A_{280} reached a baseline. IFN-L polypeptide was eluted from the column with 0.1 M Glycine-HCl at pH 2.7 and immediately neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 8.5. Fractions containing IFN-L polypeptide were pooled, dialyzed in PBS, and stored at -70°C.

For Factor Xa cleavage of the human IFN-L polypeptide-Fc fusion polypeptide, affinity chromatography-purified protein was dialyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 at pH 8.0. The restriction protease Factor Xa was added to the dialyzed protein at 1/100 (w/w) and the sample digested overnight at room temperature.

Example 5: Biological Activity of IFN-L Polypeptides

The phosphorylation of IFN-L polypeptide was assayed as follows. Cell lines were exposed to 1 µg/mL of the rat IFN-L Fc fusion polypeptide generated in Example 4C or to a control solution at 37°C for 15 minutes. Following IFN-L polypeptide exposure, the cells were lysed and cellular proteins were recovered and separated by SDS-PAGE. The separated proteins were then analyzed by Western blot using an anti-pTyr antibody. Several cell lines showed an increase in cellular protein phosphorylation following exposure to IFN-L Fc fusion polypeptide.

Example 6: Production of Anti-IFN-L Polypeptide Antibodies

Antibodies to IFN-L polypeptides may be obtained by immunization with purified protein or with IFN-L peptides produced by biological or chemical

synthesis. Suitable procedures for generating antibodies include those described in Hudson and Bay, *Practical Immunology* (2nd ed., Blackwell Scientific Publications).

In one procedure for the production of antibodies, animals (typically mice or rabbits) are injected with an IFN-L antigen (such as an IFN-L polypeptide), and those with sufficient serum titer levels as determined by ELISA are selected for hybridoma production. Spleens of immunized animals are collected and prepared as single cell suspensions from which splenocytes are recovered. The splenocytes are fused to mouse myeloma cells (such as Sp2/0-Ag14 cells), are first incubated in DMEM with 200 U/mL penicillin, 200 µg/mL streptomycin sulfate, and 4 mM glutamine, and are then incubated in HAT selection medium (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). After selection, the tissue culture supernatants are taken from each fusion well and tested for anti-IFN-L antibody production by ELISA.

Alternative procedures for obtaining anti-IFN-L antibodies may also be employed, such as the immunization of transgenic mice harboring human Ig loci for production of human antibodies, and the screening of synthetic antibody libraries, such as those generated by mutagenesis of an antibody variable domain.

Example 7: Expression of IFN-L Polypeptide in Transgenic Mice

To assess the biological activity of IFN-L polypeptide, a construct encoding an IFN-L polypeptide/Fc fusion protein under the control of a liver specific ApoE promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to cause pathological changes that are informative as to the function of IFN-L polypeptide. Similarly, a construct containing the full-length IFN-L polypeptide under the control of the beta actin promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to result in ubiquitous expression.

To generate these constructs, PCR is used to amplify template DNA sequences encoding an IFN-L polypeptide using primers that correspond to the 5' and 3' ends of the desired sequence and which incorporate restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector.

Following amplification, PCR products are gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into an expression vector using standard recombinant DNA techniques. For example, amplified IFN-L polypeptide sequences can be cloned into an expression vector under the control of the human β -actin promoter as described by Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17:272-74 and Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:2265-73.

Following ligation, reaction mixtures are used to transform an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert and absence of mutation. The IFN-L polypeptide expression vector is purified through two rounds of CsCl density gradient centrifugation, cleaved with a suitable restriction enzyme, and the linearized fragment containing the IFN-L polypeptide transgene is purified by gel electrophoresis. The purified fragment is resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, and 0.2 mM EDTA at a concentration of 2 mg/mL.

Single-cell embryos from BDF1 x BDF1 bred mice are injected as described (PCT Pub. No. WO 97/23614). Embryos are cultured overnight in a CO₂ incubator and 15-20 two-cell embryos are transferred to the oviducts of a pseudopregnant CD1 female mice. Offspring obtained from the implantation of microinjected embryos are screened by PCR amplification of the integrated transgene in genomic DNA samples as follows. Ear pieces are digested in 20 mL ear buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, and 500 mg/mL proteinase K) at 55°C overnight. The sample is then diluted with 200 mL of TE, and 2 mL of the ear sample is used in a PCR reaction using appropriate primers.

At 8 weeks of age, transgenic founder animals and control animals are sacrificed for necropsy and pathological analysis. Portions of spleen are removed and total cellular RNA isolated from the spleens using the Total RNA Extraction Kit (Qiagen) and transgene expression determined by RT-PCR. RNA recovered from spleens is converted to cDNA using the SuperScriptTM Preamplification System (Gibco-BRL) as follows. A suitable primer, located in the expression vector sequence and 3' to the IFN-L polypeptide transgene, is used to prime

cDNA synthesis from the transgene transcripts. Ten mg of total spleen RNA from transgenic founders and controls is incubated with 1 mM of primer for 10 minutes at 70°C and placed on ice. The reaction is then supplemented with 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at 37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for IFN-L polypeptide.

Example 8: Biological Activity of IFN-L Polypeptide in Transgenic Mice

Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isofluorane and blood drawn by cardiac puncture. The samples are subjected to hematology and serum chemistry analysis. Radiography is performed after terminal exsanguination. Upon gross dissection, major visceral organs are subject to weight analysis.

Following gross dissection, tissues (*i.e.*, liver, spleen, pancreas, stomach, the entire gastrointestinal tract, kidney, reproductive organs, skin and mammary glands, bone, brain, heart, lung, thymus, trachea, esophagus, thyroid, adrenals, urinary bladder, lymph nodes and skeletal muscle) are removed and fixed in 10% buffered Zn-Formalin for histological examination. After fixation, the tissues are processed into paraffin blocks, and 3 mm sections are obtained. All sections are stained with hematoxylin and eosin, and are then subjected to histological analysis.

The spleen, lymph node, and Peyer's patches of both the transgenic and the control mice are subjected to immunohistology analysis with B cell and T cell specific antibodies as follows. The formalin fixed paraffin embedded sections are deparaffinized and hydrated in deionized water. The sections are quenched with 3% hydrogen peroxide, blocked with Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), and incubated in rat monoclonal anti-mouse B220 and CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). Antibody binding is detected by biotinylated rabbit anti-rat immunoglobulins and peroxidase conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) with DAB

as a chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA). Sections are counterstained with hematoxylin.

After necropsy, MLN and sections of spleen and thymus from transgenic animals and control littermates are removed. Single cell suspensions are prepared by gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100 mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed twice, counted, and approximately 1×10^6 cells from each tissue are then incubated for 10 minutes with 0.5 μg CD16/32(Fc γ III/II) Fc block in a 20 μL volume. Samples are then stained for 30 minutes at 2-8°C in a 100 μL volume of PBS (lacking Ca^+ and Mg^+), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5 μg antibody of FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11b(Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

While the present invention has been described in terms of the preferred embodiments, it is understood that variations and modifications will occur to those skilled in the art. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

B r i e f D e s c r i p t i o n o f D r a w i n g s

Figures 1A-1B illustrate the nucleotide sequence of the rat IFN-L gene (SEQ ID NO: 1) and the deduced amino acid sequence of rat IFN-L polypeptide (SEQ ID NO: 2). The predicted signal peptide is indicated (underlined);

Figures 2A-2B illustrate the nucleotide sequence of the human IFN-L gene (SEQ ID NO: 4) and the deduced amino acid sequence of human IFN-L polypeptide (SEQ ID NO: 5). The predicted signal peptide is indicated (underlined);

Figure 3 illustrates the amino acid sequence alignment of human IFN-L polypeptide (huIFN-L; SEQ ID NO: 5), human IFN- β (huIFN- β ; SEQ ID NO: 7), rat IFN-L polypeptide (raIFN-L; SEQ ID NO: 2), and those amino acid positions which share some similarity (cons);

Figure 4 illustrates the nucleotide sequence of the *Nde* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 8) of Amgen strain #3729 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 9) encoded by this insert;

Figure 5 illustrates the nucleotide sequence of the *Nde* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 10) of Amgen strain #3858 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 11) encoded by this insert;

Figure 6 illustrates the nucleotide sequence of the *Xba* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 12) of Amgen strain #4047 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 13) encoded by this insert;

Figure 7 illustrates the nucleotide sequence of the *Xba* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 14) of Amgen strain #3969 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 15) encoded by this insert;

Figure 8 illustrates the nucleotide sequence of the *Nde* I-*Bam* HI pAMG21 insert (SEQ ID NO: 16) of Amgen strain #4182 and the predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 17) encoded by this insert.

SEQUENCE LISTING

<110> Welcher, Andrew
Wen, Duanzhi
Kelly, Michael

<120> Interferon-Like Molecules and Uses Thereof

<130> 99,372-A

<140>

<141>

<150> 60/169,720

<151> 1999-12-08

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 913

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (53)..(625)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (53)..(115)

<400> 1

```

gggtgttgta gatatttttc ctttgaaga aatactgagc accaaggctg ag atg aca 58
                                         Met Thr
                                         1

ctg aag tat tta tgg ctg gtg gcc ctc gtg gct cta tac att tca ccc 106
Leu Lys Tyr Leu Trp Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Tyr Ile Ser Pro
      5              10              15

atc cag tct cag aac tgt gtg tat ctg gat cat acc atc ttg gaa aac 154
Ile Gln Ser Gln Asn Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn
      20              25              30

atg aaa ctt ctg agc agc atc agg acc acc ttt ccc tta aga tgt cta 202
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu
      35              40              45              50

aaa gat atc acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc 250
Lys Asp Ile Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val
      55              60              65

cag cat gtg aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct 298
Gln His Val Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser
      70              75              80

ctg gcg cta att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca 346
Leu Ala Leu Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr
      85              90              95

```

gag gaa cgc ttg gaa cgt atc aga tgc gga ctt ttc aaa caa gtg cag 394
 Glu Glu Arg Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln
 100 105 110

caa gct cga gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag 442
 Gln Ala Arg Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu
 115 120 125 130

gac agt aca tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac 490
 Asp Ser Thr Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr
 135 140 145

ctg gaa ttg aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat 538
 Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn
 150 155 160

aag aaa tac agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa ata aga 586
 Lys Lys Tyr Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg
 165 170 175

aga tgt ttc agt ata ttt tac aaa cta ctc aac atg aat tgagaatcat 635
 Arg Cys Phe Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
 180 185 190

ccagcttcaa gcaagaactt agatagaagt tgtgactgct caaatgtccc caagaacgct 695
 tgattctaag gctattgcga gtctgctgct acacacttcg gacgcaagac ttttcaaggt 755
 caggggttcaa ggtagtacag tcaaaggaag tcttatgtta agcaaaaagaa aaatttcagt 815
 ggaaaagcta gcagaaatgt caacttgctca aaaaaacaac ttatggatta tggcattgac 875
 gttactagca aaaaaaataa aacaaaaaaa aacaaaaa 913

<210> 2

<211> 191

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Thr Leu Lys Tyr Leu Trp Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Tyr Ile
 1 5 10 15

Ser Pro Ile Gln Ser Gln Asn Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu
 20 25 30

Glu Asn Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg
 35 40 45

Cys Leu Lys Asp Ile Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu
 50 55 60

Tyr Val Gln His Val Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Ala Leu Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu
 85 90 95

Ala Thr Glu Glu Arg Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln

100	105	110
Val Gln Gln Ala Arg Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr		
115	120	125
Glu Glu Asp Ser Thr Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala		
130	135	140
Val Tyr Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu		
145	150	155
		160
Val Asn Lys Lys Tyr Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu		
	165	170
		175
Ile Arg Arg Cys Phe Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn		
	180	185
		190

<210> 3

<211> 168

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 3

Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu Leu Ser		
1	5	10
		15
Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile Thr Asp		
	20	25
		30
Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val Lys Lys		
	35	40
		45
Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu Ile Ile		
	50	55
		60
Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg Leu Glu		
	65	70
		75
		80
Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg Glu Cys		
	85	90
		95
Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr Ser Gln		
	100	105
		110
His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu Asn Lys		
	115	120
		125
Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr Ser Phe		
	130	135
		140
Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe Ser Ile		
	145	150
		155
		160
Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn		
	165	

<210> 4

<211> 1836

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (575)..(1195)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (575)..(655)

<400> 4

aagcttaatt taacaaaatt ggaaaaacct aaactatact gtgctctggt gacctagcaa 60

tcaaataatc acagtcattt ggtcaatgtc tatgattaac tcaatgagac aggatgtttg 120

gctatagcac caggtacaaa aaatatattt tcatgaagga tcactccctc ttatgtaata 180

gatttgggtg agtgagtgag tgagtgagt catggactca cagcttttgg ctttctgaaa 240

taccctgcat cagtcttgtt atgatgattc cttagtgtg ggatggatca tccaggcatt 300

taaggtaaca cgatggtaat tctttgctca tttttcaggg aaaaaaaaaa gttatcaatt 360

ccaaagtcgg catagtcacc cgaagtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cctcagaggc 420

aaaggaaagg ggcgcgaacc ttggttaact gtgaaatgac gaatgagaaa actcctcctg 480

ctgaagatat tcaggtatat aaaggcacat gaaggaaaac tcaaaacatc attgtcatat 540

acacatcttc tggatttttt agcttgcaaa aaaa atg agc acc aaa cct gat atg 595

Met Ser Thr Lys Pro Asp Met

1

5

att caa aag tgt ttg tgg ctt gag atc ctt atg ggt ata ttc att gct 643

Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala

10

15

20

ggc acc cta tcc ctg gac tgt aac tta ctg aac gtt cac ctg aga aga 691

Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg

25

30

35

gtc acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt 739

Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe

40

45

50

55

cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag 787

Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu

60

65

70

ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc 835

Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe

75

80

85

tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc 883

Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe

90

95

100

aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat 931

Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp

105

110

115

cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa 979
 Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu
 120 125 130 135
 aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa 1027
 Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu
 140 145 150
 gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac 1075
 Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His
 155 160 165
 agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg 1123
 Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp
 170 175 180
 gag att gtc cga gtg gaa atc aga aga tgt ttg tat tac ttt tac aaa 1171
 Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys
 185 190 195
 ttt aca gct cta ttc agg agg aaa taaggatat ttttggaatt aaaattcctt 1225
 Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
 200 205
 ttccctccga aatctctttc tctttctcct cctccatctt ctttttaagg attgttgtgc 1285
 tgtcctgtaa gctgtctctc agttggactg gtagecctcg aacatcaggg acactcacct 1345
 ctctaaggag aggtaatgcc aaccatctctc agggtgacca agagtctcct tagaaagtct 1405
 ttaagacatt tttaaaggaa taagattccc tctccgtctt cttctattct ctcttgctct 1465
 tttctgtggc cattttgaaa gagctttgct atatatacca cctgtggact tcaccaagac 1525
 aatggctaga ggatagggag cagagaatgt tgcaaatgg taacatttca atgacttaac 1585
 tgttttgctg ccaagggtgc ttatcctatg aaaattcagc acattaaaag agcttataca 1645
 tgctccctag agtcaatact cttgcatttt cccctcctg ctcgggggga aaaaggttga 1705
 catttctggc ccatttctt ctcagcttgg tttgtttgaa ttgatgcttg tggaatggta 1765
 ttccattact ttaagagtga agatccatag tgaaattgga tggatggttg aattagacga 1825
 ccattaagct t 1836

<210> 5

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ser Thr Lys Pro Asp Met Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile
 1 5 10 15
 Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu
 20 25 30
 Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu
 35 40 45

Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile
 50 55 60
 Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys
 65 70 75 80
 Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn
 85 90 95
 Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys
 100 105 110
 Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys
 115 120 125
 Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu
 130 135 140
 Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu
 145 150 155 160
 Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys
 165 170 175
 Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg
 180 185 190
 Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
 195 200 205

<210> 6

<211> 178

<212> PRT

<213> Homo. sapiens

<400> 6

Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu
 1 5 10 15
 Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg
 20 25 30
 Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln
 35 40 45
 Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln
 50 55 60
 Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg
 65 70 75 80
 His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu
 85 90 95
 Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu
 100 105 110
 Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu
 115 120 125

Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe Leu
 130 135 140

Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val Glu
 145 150 155 160

Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg
 165 170 175

Arg Lys

<210> 7

<211> 187

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Thr Asn Lys Cys Ile Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys His Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175

Phe Ile Asn Lys Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185

<210> 8

<211> 520

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Rat IFN-like
polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
sequence

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(510)

<400> 8

```

cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt      48
  Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu
    1             5             10             15

ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc      96
Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile
          20             25             30

acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg     144
Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val
          35             40             45

aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct ctg gcg cta     192
Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu
          50             55             60

att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc     240
Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg
          65             70             75

ttg gaa cgt atc aga tgc gga ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cga     288
Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg
          80             85             90             95

gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca     336
Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr
          100            105            110

tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg     384
Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu
          115            120            125

aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat aag aaa tac     432
Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr
          130            135            140

agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tgt ttc     480
Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe
          145            150            155

agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc                    520
Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
160             165

```

<210> 9

<211> 169

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Rat IFN-like
polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
sequence

<400> 9

```

Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu Leu
 1             5             10             15

Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile Thr
          20             25             30

Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val Lys
          35             40             45

Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu Ile
          50             55             60

Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg Leu
          65             70             75             80

Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg Glu
          85             90             95

Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr Ser
          100            105            110

Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu Asn
          115            120            125

Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr Ser
          130            135            140

Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe Ser
          145            150            155            160

Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
          165

```

<210> 10

<211> 520

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Rat IFN-like
polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
sequence

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(510)

<400> 10

```

cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt      48
  Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu
    1             5             10             15

ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc      96
Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile

```

	20	25	30	
acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg				144
Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val				
	35	40	45	
aaa aag gac atc aag gca gtc acc tat cat atc tct tct ctg gcg ctg				192
Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu				
	50	55	60	
att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc				240
Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg				
	65	70	75	
ttg gaa cgt atc cgt tct ggt ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cgt				288
Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg				
	80	85	90	95
gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca				336
Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr				
	100	105	110	
tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg				384
Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu				
	115	120	125	
aac aag tat ttc ttc cgt atc cgt aag ttc ctg gta aat aag aaa tac				432
Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr				
	130	135	140	
agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tct ttc				480
Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Ser Phe				
	145	150	155	
agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc				520
Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn				
	160	165		

<210> 11
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Rat IFN-like
 polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
 sequence

<400> 11
 Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile Thr
 20 25 30
 Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val Lys
 35 40 45
 Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu Ile
 50 55 60

```

Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg Leu
 65              70              75              80

Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg Glu
              85              90              95

Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr Ser
              100              105              110

Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu Asn
              115              120              125

Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr Ser
              130              135              140

Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Ser Phe Ser
              145              150              155              160

Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
              165

```

```

<210> 12
<211> 568
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Human IFN-like
      polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
      sequence

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(558)

```

```

<400> 12
tctagaaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt   51
                      Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg
                        1              5              10

cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca   99
Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser
              15              20              25

ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa   147
Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln
              30              35              40

gag ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc   195
Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala
              45              50              55

ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc   243
Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr
              60              65              70

ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt   291
Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu
              75              80              85              90

```

```

gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat 339
Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn
          95                      100                      105

gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca 387
Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser
          110                      115                      120

gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc 435
Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe
          125                      130                      135

cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc 483
His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala
          140                      145                      150

tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac 531
Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr
          155                      160                      165                      170

aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 568
Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
          175

```

<210> 13

<211> 179

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Rat IFN-like
 polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
 sequence

<400> 13

```

Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn
  1              5              10              15

Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu
          20              25              30

Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr
          35              40              45

Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu
          50              55              60

Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu
          65              70              75              80

Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr
          85              90              95

Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys
          100              105              110

Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln
          115              120              125

```

Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe
 130 135 140

Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val
 145 150 155 160

Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe
 165 170 175

Arg Arg Lys

<210> 14

<211> 568

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Human IFN-like
 polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
 sequence

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(558)

<400> 14

tctagaaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt 51
 Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg
 1 5 10

cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca 99
 Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser
 15 20 25

ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa 147
 Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln
 30 35 40

gag ttc ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc 195
 Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala
 45 50 55

ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc 243
 Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr
 60 65 70

ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt 291
 Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu
 75 80 85 90

gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat 339
 Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn
 95 100 105

gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca 387
 Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser
 110 115 120

gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc 435

Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe
 125 130 135

cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc 483
 His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala
 140 145 150

tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tct ctg tac tac ttt tac 531
 Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Tyr
 155 160 165 170

aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 568
 Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
 175

<210> 15
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Human IFN-like
 polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
 sequence

<400> 15
 Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr Trp Gln Asn
 1 5 10 15

Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val Glu Cys Leu
 20 25 30

Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu Gln Tyr Thr
 35 40 45

Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu Met Ser Leu
 50 55 60

Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr Trp Lys Glu
 65 70 75 80

Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln Ala Glu Tyr
 85 90 95

Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu Asp Met Lys
 100 105 110

Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg Val Pro Gln
 115 120 125

Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile Asp Asn Phe
 130 135 140

Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile Val Arg Val
 145 150 155 160

Glu Ile Arg Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr Ala Leu Phe
 165 170 175

Arg Arg Lys

<210> 16
 <211> 556
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Human IFN-like polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(546)

<400> 16

cat atg ctg gac tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt cgt gtt acc	48
His Met Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr	
1 5 10 15	
tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt cct gta	96
Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val	
20 25 30	
gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag ttt ctg	144
Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu	
35 40 45	
caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc tat gaa	192
Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu	
50 55 60	
atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc aaa tat	240
Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr	
65 70 75 80	
tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat cag caa	288
Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln	
85 90 95	
gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa aat gaa	336
Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu	
100 105 110	
gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa gcc agg	384
Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg	
115 120 125	
gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac agg ata	432
Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile	
130 135 140	
gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg gag att	480
Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile	
145 150 155 160	
gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac aaa ttt acc	528
Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr	
165 170 175	

gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc
 Ala Leu Phe Arg Arg Lys
 180

556

<210> 17
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Human IFN-like
 polypeptide cDNA insert and partial pAMG21 vector
 sequence

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 18

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5 10

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Internalizing domain derived from HIV tat protein

<400> 19
 Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 20
 atgacactga agtatattatg g 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 21
 attcatgttg agtagtttgt a 21

<210> 22
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer 1825-22

<400> 22
 gaataacata tgttgtgtata tctcgatcat actatcttgg agaatatg 48

<210> 23
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer 1825-21

<400> 23
 ccgcggatcc attaatccat gttcagcagt ttgtaaaaaa tactgaaaca acgacgaatt 60
 tcc 63

<210> 24
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1909-56

<400> 24
ccgcggatcc attaatcat gttcagcagt ttgtaaaaa tactgaaaga acgacgaatt 60
tcc 63

<210> 25
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1967-32

<400> 25
ttgatctaga aaggaggaat aacatatgtg taacctgctg aacgttcacc tgcgtcgtgt 60
tacctgg 67

<210> 26
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1982-14

<400> 26
ccgcggatcc attatctacg acggaacaga gcggtaaatt tgtaaaagta gtacaggcaa 60
cgacgatttc c 71

<210> 27
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1967-33

<400> 27
ccgcggatcc attatctacg acggaacaga gcggtaaatt tgtaaaagta gtacagagaa 60
cgacggattt cc 72

<210> 28
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
2103-87

<400> 28
aaggagcata tgctggactg taacctgctg aacgttcac 39

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1200-54

<400> 29
gttattgctc agcgggtggca 20

<210> 30
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1847-77

<400> 30
cccaagctta ccatgacact gaagtattta tg 32

<210> 31
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1847-78

<400> 31
aaggaaaaaa gcggccgcat tcatgttgag tag 33

<210> 32
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1896-56

<400> 32
acgcgtcgac tcacatcaattc atgttgagta gtttg 35

<210> 33
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1896-57

<400> 33
aaggaaaaaa gcggccgctc atcaattcat gttgagtag 39

<210> 34
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1954-45

<400> 34
acgcgtcgac ttattatttc ctctgaata g 31

<210> 35
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1954-46

<400> 35
aaggaaaaaa gcggccgctt attatttcct cctgaataga gc 42

<210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1955-44

<400> 36
cccaagctta ccatgagcac caaacctgat atg 33

<210> 37
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1954-47

<400> 37

cccaagctta ccatgattca aaagtgttg tggc

34

<210> 38

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1954-48

<400> 38

aaggaaaaaa gcggccgcg gcgcctcgat tttcctcctg aatagagctg taa

53

<210> 39

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer
1954-49

<400> 39

aaggaaaaaa gcggccgctt tcctcctgaa tagagctgta a

41

Claims

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4;
- (b) the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976;
- (c) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (d) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (c); and
- (e) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (c).

2. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the nucleotide sequence of the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, or (a);
- (c) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic;
- (d) a region of the nucleotide sequence of either SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 4, the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, or any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (d); and

(f) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (d).

3. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (f); and

(h) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (e).

4. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

5. A host cell comprising the vector of Claim 4.

6. The host cell of Claim 5 that is a eukaryotic cell.

7. The host cell of Claim 5 that is a prokaryotic cell.

8. A process of producing an IFN-L polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.

9. A polypeptide produced by the process of Claim 8.

10. The process of Claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native IFN-L polypeptide operatively linked to the DNA encoding the IFN-L polypeptide.

11. The isolated nucleic acid molecule according to Claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

12. A process for determining whether a compound inhibits IFN-L polypeptide activity or IFN-L polypeptide production comprising exposing a cell

according to any of Claims 5, 6, or 7 to the compound and measuring IFN-L polypeptide activity or IFN-L polypeptide production in said cell.

13. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and
- (b) the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976.

14. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 6, optionally further comprising an amino-terminal methionine;
- (b) an amino acid sequence for an ortholog of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (d) a fragment of the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or is antigenic; and
- (e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, the amino acid sequence encoded by the DNA insert in ATCC Deposit No. PTA-976, or any of (a) - (c).

15. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(b) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(c) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;

(d) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5; and

(e) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

17. The isolated polypeptide according to Claim 14, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

18. A selective binding agent or fragment thereof which specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5, or a fragment thereof.

20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.

21. The selective binding agent of Claim 18 that is a humanized antibody.

22. The selective binding agent of Claim 18 that is a human antibody or fragment thereof.

23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.

24. The selective binding agent Claim 18 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.

25. The selective binding agent of Claim 18 that is a chimeric antibody or fragment thereof.

26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.

27. The selective binding agent of Claim 18 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.

28. The selective binding agent of Claim 18 that is a variable region fragment.

29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.

30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

31. The selective binding agent of Claim 18 that is bound to a detectable label.

32. The selective binding agent of Claim 18 that antagonizes IFN-L polypeptide biological activity.

33. A method for treating, preventing, or ameliorating an IFN-L polypeptide-related disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to Claim 18.

34. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of either SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5.

35. A hybridoma which produces a selective binding agent which is capable of binding a polypeptide according to any of Claims 1, 2, or 3.

36. A method of detecting or quantitating the amount of IFN-L polypeptide using the anti-IFN-L antibody or fragment of Claim 18.

37. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

38. The composition of Claim 37, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or anti-oxidant.

39. The composition of Claim 37, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 6.

40. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

41. The polypeptide of Claim 40 that is covalently modified with a water-soluble polymer.

42. The polypeptide of Claim 41, wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.

43. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

44. The composition of Claim 43, wherein said nucleic acid molecule is contained in a viral vector.

45. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

46. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.

47. The fusion polypeptide of Claim 46, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

48. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical condition comprising administering to a patient the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid of any of Claims 1, 2, or 3.

49. The method of Claim 48, wherein the medical condition being treated, prevented, or ameliorated is multiple sclerosis or other pathology requiring immunomodulation.

50. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 in a sample; and

(b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

51. A device, comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a protein of any of Claims 13, 14, or 15; and

said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.

52. A method of identifying a compound which binds to an IFN-L polypeptide comprising:

- (a) contacting the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 with a compound; and
- (b) determining the extent of binding of the IFN-L polypeptide to the compound.

53. The method of Claim 52, further comprising determining the activity of the polypeptide when bound to the compound.

54. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

55. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

56. A process for determining whether a compound inhibits IFN-L polypeptide activity or IFN-L polypeptide production comprising exposing a transgenic mammal according to Claim 54 to the compound, and measuring IFN-L polypeptide activity or IFN-L polypeptide production in said mammal.

1. Abstract

The present invention provides Interferon-Like (IFN-L) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing IFN-L polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with IFN-L polypeptides.

2. Representative Drawing

NONE

Fig. 1A

gggtgttgta gatatttttc ctttgaaga aatactgagc accaaggctg ag atg aca 58
Met Thr
 1

ctg aag tat tta tgg ctg gtc gcc ctc gtc gct cta tac att tca ccc 106
Leu Lys Tyr Leu Trp Leu Val Ala Leu Val Ala Leu Tyr Ile Ser Pro
 5 10 15

atc cag tct cag aac tgt gtc tat ctg gat cat acc atc ttg gaa aac 154
Ile Gln Ser Gln Asn Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn
 20 25 30

atg aaa ctt ctg agc agc atc agg acc acc ttt ccc tta aga tgt cta 202
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu
 35 40 45 50

aaa gat atc acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc 250
 Lys Asp Ile Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val
 55 60 65

cag cat gtc aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct 298
 Gln His Val Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser
 70 75 80

ctg gcg cta att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca 346
 Leu Ala Leu Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr
 85 90 95

gag gaa cgc ttg gaa cgt atc aga tgc gga ctt ttc aaa caa gtc cag 394
 Glu Glu Arg Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln
 100 105 110

caa gct cga gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag 442
 Gln Ala Arg Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu
 115 120 125 130

gac agt aca tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac 490
 Asp Ser Thr Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr
 135 140 145

ctg gaa ttg aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat 538
 Leu Glu Leu Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn
 150 155 160

aag aaa tac agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtc gtc gaa ata aga 586
 Lys Lys Tyr Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg
 165 170 175

aga tgt ttc agt ata ttt tac aaa cta ctc aac atg aat tgagaatcat 635
 Arg Cys Phe Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
 180 185 190

ccagtttcaa gcaagaactt agatagaagt tbtgactgct caaatgtccc caagaacgct 695

Fig. 1B

tgattctaa gctattgcga gctgctgct acacacttcg gacgcaagac ttttcaaggt 755
 cagggttcaa ggtagtacag tcaaaaggaag tcttatgtta agcaaaagaa aaatttcagt 815
 ggaaaagcta gcagaaatgt caactgttca aaaaaacaac ttatggatta tggcattgac 875
 gttactagca aaaaaataa aacaaaaaaa aacaaaaa 913

Fig. 2A

aagcttaatt taacaaaatt ggaaaaacct aaactatact gtgctctggt gacctagcaa 60
 tcaataatc acagtcattt ggtcaatgct tatgataac tcaatgagac aggatgtttg 120

gctatagcac caggtacaaa aaatatattt tcatgaagga tcaactccctc ttatgtaata 180
 gatttgggtg agtgagttag tgagttagtg catggactca cagcttttgg ctttctgaaa 240

taccctgcat cagcttgttt atgatgatcc cttatgtctg ggaatggatca tccaggcatt 300
 taaggttaaca cgaatgtaatt tctttgctca tttttcaggg aaaaaaaa gttatcaact 360

ccaaagtgg catagtcacc cgaagtaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa cctcagagggc 420
 aaaggaaagg ggcgcgaacc ttggttaact gtgaatgac gaatgagaaa actcctcctg 480

ctgaagatat tcaggatat aaaggcacat gaaggaatac tcaaaacatc atgtcatat 540
 acacatcttc tggatttttt agcttgcaaa aaaa atg agc acc aaa cct gat atg 595
Met Ser Thr Lys Pro Asp Met
 1 5

att caa aag tgt ttg tgg ctt gag atc ctt atg ggt ata ttc att gct 643
Ile Gln Lys Cys Leu Trp Leu Glu Ile Leu Met Gly Ile Phe Ile Ala
 10 15 20

ggc acc cta tcc ctg gac tgt aac tta ctg aac gtt cac ctg aga aga 691
Gly Thr Leu Ser Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg
 25 30 35

gtc acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt 739
 Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe
 40 45 50 55

cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag 787
 Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu
 60 65 70

ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc 835
 Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe
 75 80 85

tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc 883
 Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe
 90 95 100

aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat 931
 Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp
 105 110 115

cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa 979
 Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn Glu
 120 125 130 135

Fig. 2B

aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa 1027
 Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu
 140 145 150

gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac 1075
 Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Tyr Phe His
 155 160 165

agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg 1123
 Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp
 170 175 180

gag att gtc cga gtc gaa atc aga aga tgt ttg tat tac ttt tac aaa 1171
 Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys
 185 190 195

ttt aca gct cta ttc agy agy aaa taaggtatat ttttgaatt aaaattcctt 1225
 Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
 200 205

ttcctccga aatctcttct tctctctct cctccatctt ctttttaagg attgtgtg 1285

tgctctgtaa gctgtctctc agttggactg gtacgtccgg aacatcagg acactcacct 1345

ctctaaggag aggtaatgcc aacctctc aggggtacca agagtctct tagaaagtct 1405

ttaagacatt tttaaaggaa taagattccc tctctctctt cttctattct cttctgtct 1465

ttctgtggc cattttgaaa gagctttgct atatatacca cctgtggact tcaacaagac 1525

aatggctaga ggaatgggag cagagaatgt tgcaaaatgg taacattca atgacttaac 1585

tgtttgctg ccaaggttgc ttatctatg aaaattcagc acattaaaag agcttataca 1645

tgctccctag agtcaatct ctgcatctt cccctctctg ctcgggggga aaaaggttga 1705

catttctggc ccatttctct ctcagcttgg tttgtttgaa ttgatgcttg tggaaatgga 1765

tttcattact ttaagagtga agatccatag tgaatttga tggatggttg aattagacga 1825

ccattaaact t 1836

Fig. 3

```

1
huIFN-L MSTKPDMIQK CLWLEILMGI FIAGTSLDLC NLLNVHLRRV TWONLEHLSS 50
raIFN-L -----MTLK YLWLVALVAL YISPIQSQNC ...VYLDHT ILENMKLLSS
huIFN-β -----MTNK CLQIALLLC FSTTALSMSY NLLGFLQRSS NFQCCQKLLWQ
cons -----MT-K CLWL-AL--- FI---LS--C NLL-V-LR-- --QN-KLLSS

51
huIFN-L MSNSFFVECL RENIAPELFQ EFLQYTQPMK RDIKKAFYEM SIQAFNIFS. 100
raIFN-L IRTTFPLRLC KDITDPEPQ EILLYVGHVK KDIKAVTYHI SSLALIIFSL
huIFN-β LNGRLEY CL KDRNPDIPB EIKLOCFQK EDAALTIYEM LQNIPIFRQ
cons ----FP--CL KD---FE-PQ EILQY-Q--K -DIK---YEM S--AF-IFS-

101
huIFN-L OHTFKYWKER HLKIQIGLD QQARYLNOCL EEDENENEDM KEMKENEMKP 150
raIFN-L KDSISLATEE RLRIIRSLGF KQVQARECM VDEENKNTS. .EDSTSQHHPH
huIFN-β DSSSTGWNET IVENLLANVY HQINHLKTVL .EEKLEKEDF TRGK.....
cons --S---W-E- -LE-I--GL- -Q---L--CL -EENENED- -E-K-----

151
huIFN-L SEARVPOLSS LELARYFHRI DNFLKPKYS DCAWEIVRVE IRRCLYIFYK 200
raIFN-L SEGFP..KAVY LELAKYFRI RFLVKNKYS FCAWKIVRVE IRRCSFIYK
huIFN-β .....LMSS LHLKRYGRI LHYLKAKEYS HCAWTIVRVE ILRNIFYFINR
cons SE-----SS LEL-RYF-RI --FLK-KRYS -CAW-IVRVE IRRCFY-FYK

201
huIFN-L FTALFRRK
raIFN-L LILNMN---
huIFN-β LTGYLRN-
cons LT---R--

```

Fig. 4

```

cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt 48
Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu
1 5 10 15

ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc 96
Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile
20 25 30

acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg 144
Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val
35 40 45

aaa aag gac ata aag gca gtc acc tat cat ata tct tct ctg gcg cta 192
Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu
50 55 60

att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc 240
Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg
65 70 75

ttg gaa cgt atc aga tgc gga ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cga 288
Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg
80 85 90 95

gag tgc atg gta gac gag gag aac aag acg gag gag gac agt aca 336
Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr
100 105 110

tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg 384
Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu
115 120 125

aac aag tat ttc ttc aga atc aga aag ttc ctg gta aat aag aaa tac 432
Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr
130 135 140

agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tgt ttc 480
Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Cys Phe
145 150 155

agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc 520
Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
160 165

```

Fig. 5

```

cat atg tgt gta tat ctc gat cat act atc ttg gag aat atg aaa ctt 48
Met Cys Val Tyr Leu Asp His Thr Ile Leu Glu Asn Met Lys Leu
1 5 10 15

ctg agc agc atc cgt acc acc ttt cct ctg cgt tgt ctg aaa gat atc 96
Leu Ser Ser Ile Arg Thr Thr Phe Pro Leu Arg Cys Leu Lys Asp Ile
20 25 30

acg gat ttt gag ttt cct caa gag att ctg ctg tac gtc cag cat gtg 144
Thr Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Ile Leu Leu Tyr Val Gln His Val
35 40 45

aaa aag gac atc aag gca gtc acc tat cat atc tct tct ctg gcg ctg 192
Lys Lys Asp Ile Lys Ala Val Thr Tyr His Ile Ser Ser Leu Ala Leu
50 55 60

att att ttc agt ctt aaa gac tcc atc tcc ctg gcg aca gag gaa cgc 240
Ile Ile Phe Ser Leu Lys Asp Ser Ile Ser Leu Ala Thr Glu Glu Arg
65 70 75

ttg gaa cgt atc cgt tct ggt ctt ttc aaa caa gtg cag caa gct cgt 288
Leu Glu Arg Ile Arg Ser Gly Leu Phe Lys Gln Val Gln Gln Ala Arg
80 85 90 95

gag tgc atg gta gac gag gag aac aag aac acg gag gag gac agt aca 336
Glu Cys Met Val Asp Glu Glu Asn Lys Asn Thr Glu Glu Asp Ser Thr
100 105 110

tca caa cat cct cac tca gag ggc ttc aag gca gtc tac ctg gaa ttg 384
Ser Gln His Pro His Ser Glu Gly Phe Lys Ala Val Tyr Leu Glu Leu
115 120 125

aac aag tat ttc ttc cgt atc cgt aag ttc ctg gta aat aag aaa tac 432
Asn Lys Tyr Phe Phe Arg Ile Arg Lys Phe Leu Val Asn Lys Lys Tyr
130 135 140

agt ttc tgt gcc tgg aag att gtc gtg gtg gaa att cgt cgt tct ttc 480
Ser Phe Cys Ala Trp Lys Ile Val Val Val Glu Ile Arg Arg Ser Phe
145 150 155

agt att ttt tac aaa ctg ctg aac atg aat taatggatcc 520
Ser Ile Phe Tyr Lys Leu Leu Asn Met Asn
160 165

```

Fig. 6

```

tctagaaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt 51
Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg
1 5 10

cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt agt agc aat tca 99
Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser
15 20 25

ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa 147
Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln
30 35 40

gag ttt ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gag atc aag aag gcc 195
Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala
45 50 55

ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc 243
Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr
60 65 70

ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt 291
Phe Lys Tyr Tip Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu
75 80 85 90

gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gag gat aat 339
Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn
95 100 105

gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca 387
Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser
110 115 120

gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc 435
Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe
125 130 135

cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc 483
His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala
140 145 150

tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac 531
Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr
155 160 165

aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 568
Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
175

```

Fig. 7

tctagaaagg aggaataaca t atg tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt 51
Met Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg
1 5 10

cgt gtt acc tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca 99
Arg Val Thr Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser
15 20 25

ttt cct gta gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa 147
Phe Pro Val Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln
30 35 40

gag ttc ctg caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc 195
Glu Phe Leu Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala
45 50 55

ttc tat gaa atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc 243
Phe Tyr Glu Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr
60 65 70

ttc aaa tat tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt 291
Phe Lys Tyr Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Glu Ile Gln Ile Gly Leu
75 80 85 90

gat cag caa gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat 339
Asp Gln Gln Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Glu Asp Glu Asn
95 100 105

gaa aat gaa gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca 387
Glu Asn Glu Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser
110 115 120

gaa gcc agg gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc 435
Glu Ala Arg Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe
125 130 135

cac agg ata gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc 483
His Arg Ile Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala
140 145 150

tgg gag att gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tct ctg tac tac ttt tac 531
Trp Glu Ile Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Ser Leu Tyr Tyr Phe Tyr
155 160 165 170

aaa ttt acc gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 568
Lys Phe Thr Ala Leu Phe Arg Arg Lys
175

Fig. 8

cat atg ctg gac tgt aac ctg ctg aac gtt cac ctg cgt cgt gtt acc 48
His Met Leu Asp Cys Asn Leu Leu Asn Val His Leu Arg Arg Val Thr
1 5 10 15

tgg caa aat ctg aga cat ctg agt agt atg agc aat tca ttt cct gta 96
Trp Gln Asn Leu Arg His Leu Ser Ser Met Ser Asn Ser Phe Pro Val
20 25 30

gaa tgt cta cga gaa aac ata gct ttt gag ttg ccc caa gag ttt ctg 144
Glu Cys Leu Arg Glu Asn Ile Ala Phe Glu Leu Pro Gln Glu Phe Leu
35 40 45

caa tac acc caa cct atg aag agg gac atc aag aag gcc ttc tat gaa 192
Gln Tyr Thr Gln Pro Met Lys Arg Asp Ile Lys Lys Ala Phe Tyr Glu
50 55 60

atg tcc cta cag gcc ttc aac atc ttc agc caa cac acc ttc aaa tat 240
Met Ser Leu Gln Ala Phe Asn Ile Phe Ser Gln His Thr Phe Lys Tyr
65 70 75 80

tgg aaa gag aga cac ctc aaa caa atc caa ata gga ctt gat cag caa 288
Trp Lys Glu Arg His Leu Lys Gln Ile Gln Ile Gly Leu Asp Gln Gln
85 90 95

gca gag tac ctg aac caa tgc ttg gag gaa gac gag aat gaa aat gaa 336
Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Cys Leu Glu Asp Glu Asn Glu Asn Glu
100 105 110

gac atg aaa gaa atg aaa gag aat gag atg aaa ccc tca gaa gcc agg 384
Asp Met Lys Glu Met Lys Glu Asn Glu Met Lys Pro Ser Glu Ala Arg
115 120 125

gtc ccc cag ctg agc agc ctg gaa ctg agg aga tat ttc cac agg ata 432
Val Pro Gln Leu Ser Ser Leu Glu Leu Arg Arg Tyr Phe His Arg Ile
130 135 140

gac aat ttc ctg aaa gaa aag aaa tac agt gac tgt gcc tgg gag att 480
Asp Asn Phe Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Ile
145 150 155 160

gtc cga gtg gaa atc cgt cgt tgc ctg tac tac ttt tac aaa ttt acc 528
Val Arg Val Glu Ile Arg Arg Cys Leu Tyr Tyr Phe Tyr Lys Phe Thr
165 170 175

gct ctg ttc cgt cgt aaa taatggatcc 556
Ala Leu Phe Arg Arg Lys
180