

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-503121

(P2005-503121A)

(43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 39/395 F	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 U	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 138 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-577873 (P2002-577873)	(71) 出願人	502073278 ジェンオディセ
(86) (22) 出願日	平成14年3月29日 (2002.3.29)		フランス国, 9 1 9 7 4 クールタプーフ
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月30日 (2003.9.30)		, レ ユリ, ベ. ペ. 8 1 0, バ アルフ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/004082		ア, アブニュ デュ カナダ 3, パルク
(87) 国際公開番号	W02002/079249		ダフェーレ テクノポリ
(87) 国際公開日	平成14年10月10日 (2002.10.10)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	01/04404		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001.3.30)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IFN α -21 遺伝子の新規ポリヌクレオチド及びポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、新規SNPsを含むIFN α -21遺伝子のヌクレオチド配列由来の新規ポリヌクレオチド、及び本発明のSNPの少なくとも1つにより引き起こされる少なくとも1つの変異を含む天然の野生型IFN α -21タンパク質由来の新規ポリペプチド、並びにそれらの治療のための使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の：

a)ヌクレオチド配列、配列番号1、

ただし、上記ヌクレオチド配列は、c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g及びt1265cから成る群から選ばれる少なくとも1つのSNPを含む；又は

b) a)によるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、

の全部又は一部を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】

配列番号1の第670～第1239ヌクレオチドを含む、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチドであって、 10

ただし、上記ヌクレオチド配列は、c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a及びa1204gから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPを含む、上記単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】

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

【請求項4】

アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。 20

【請求項5】

アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、2つのコーディングSNPs、Q114H及びV127Dをもつポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】

アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、コーディングSNP、K179Eをもつポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項7】

ヌクレオチド配列、配列番号1に80～100%の同一性をもつポリヌクレオチドの全部又は一部の同定又は増幅方法であって、適当なハイブリダイゼーション条件下、請求項1に記載のポリヌクレオチドと、上記ポリヌクレオチドとをハイブリダイズさせることを含む上記方法。 30

【請求項8】

ヌクレオチド配列、配列番号1に80～100%の同一性をもつポリヌクレオチドの全部又は一部の遺伝子型解析方法であって、患者又は患者集団のゲノムDNA内の着目の領域を増幅し、そして794位、973位、1011位、1049位、1155位、1204位及び1265位から成る群から選ばれるヌクレオチド配列、配列番号1内の少なくとも1ヶ所の対立遺伝子を測定するステップを含む、上記遺伝子型解析方法。

【請求項9】

前記遺伝子型解析がミニ配列決定法によって実行される、請求項8に記載の方法。 40

【請求項10】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む組み換えベクター。

【請求項11】

請求項10に記載の組み換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項12】

ポリペプチドの分離方法であって、培地中で請求項11に記載の宿主細胞を培養し、上記培地から上記ポリペプチドを分離することを含む上記方法。

【請求項13】

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

【請求項14】

アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつ単離されたポリペプチド。

【請求項15】

アミノ酸配列、配列番号2の第24～第189アミノ酸を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつ、請求項13に記載のポリペプチド。

【請求項16】

アミノ酸配列、配列番号2の第24～第189アミノ酸を含み、かつ、2つのコーディングSNPs Q114H及びV127Dをもつ、請求項13に記載のポリペプチド。

10

【請求項17】

アミノ酸配列、配列番号2の第24～第189アミノ酸を含み、かつ、コーディングSNP K179Eをもつ、請求項13に記載のポリペプチド。

【請求項18】

免疫特異的抗体の獲得方法であって、請求項13に記載のポリペプチドにより動物を免疫し、そして上記抗体を上記動物から回収することを含む上記方法。

【請求項19】

請求項18に記載の方法によって生じる免疫特異的抗体。

【請求項20】

アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつ単離されたポリペプチドの活性を活性化又は抑制する、1以上の試験すべき化合物の中の作用物質の同定方法であって、以下のステップ：

20

- a) 請求項10に記載の組み換えベクターを含む宿主細胞を準備し；
 - b) 上記宿主細胞と、上記試験すべき化合物を接触させ；そして
 - c) 上記ポリペプチドの活性に対する活性化又は抑制効果を測定し、それにより上記活性化又は抑制作用物質を同定する、
- を含む上記方法。

【請求項21】

アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつ単離されたポリペプチドによりその活性が増強又は抑制される、1以上の試験すべき化合物の中の作用物質の同定方法であって、以下のステップ：

30

- a) 請求項10に記載の組み換えベクターを含む宿主細胞を準備し；
 - b) 上記宿主細胞と、上記試験すべき化合物を接触させ；そして
 - c) 上記作用物質の活性に対する増強又は抑制効果を測定し、それにより上記増強又は抑制される作用物質を同定する、
- を含む上記方法。

【請求項22】

患者の生物学的特徴の分析方法であって、以下のステップ：

40

- a) 患者のゲノム内の請求項1に記載のポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定すること；
 - b) 患者の請求項1に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定すること；
 - c) 患者の請求項13に記載のポリペプチドの存在又は不存在を測定すること；
 - d) 患者の請求項13に記載のポリペプチドの濃度を測定すること；又は
 - e) 患者の請求項13に記載のポリペプチドの機能性を測定すること、
- の少なくとも1つを実施することを含む上記方法。

【請求項23】

ヌクレオチド配列、配列番号1の全部又は一部を含む単離されたポリヌクレオチド(ただし、上記ヌクレオチド配列は、c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g及びt1265c

50

から成る群から選ばれる少なくとも1つのSNPを含む)又は上記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列;上記ポリヌクレオチドを含む組み換えベクター;上記組み換えベクターを含む宿主細胞;アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつ単離された単離されたポリペプチド;上記ポリペプチドに特異的な抗体から成る群から選ばれる1以上の化合物を含む治療薬。

【請求項24】

癌及び腫瘍、感染症、免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気、心血管系の病気、代謝系の病気、中枢神経系の病気、並びに化学療法治療に関係した障害から成る群から選ばれる病気の個体における予防又は治療方法であって、治療として有効量の請求項23に記載の作用物質及び医薬として許容される賦形剤を上記個体に投与することを含む上記方法。

10

【請求項25】

前記癌及び腫瘍が、転移性腎癌、メラノーマ、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞型リンパ腫を含むリンパ腫、毛様細胞性白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含む白血病、肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、並びにAIDSの場合のカポジ肉腫を含む、免疫欠陥に続いて現れる腫瘍を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記代謝系の病気が、肥満症のような免疫に関係しない病気を含む、請求項24に記載の方法。

20

【請求項27】

前記感染症が、慢性B及びC型肝炎、並びにHIV/AIDSを含むウイルス感染、感染性肺炎、そして性病、例えば陰部疣贅を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

前記中枢神経系の病気が、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、及びうつ病を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項29】

前記の免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気が、組織又は臓器移植片の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、並びに潰瘍性大腸炎を含む、請求項24に記載の方法。

30

【請求項30】

外傷の治療、透析患者の貧血、及び/又は骨粗鬆症から成る群から選ばれる病気の個体における予防又は治療方法であって、治療として有効量の請求項23に記載の作用物質及び医薬として許容される賦形剤を上記個体に投与することを含む上記方法。

【請求項31】

患者の請求項13に記載のポリペプチドの活性を増加又は減少させる方法であって、治療として有効量の:ヌクレオチド配列、配列番号1の全部又は一部を含む単離されたポリヌクレオチド(ただし、上記ヌクレオチド配列は、c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g及びt1265cから成る群から選ばれる少なくとも1つのSNPを含む)又は上記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列;上記ポリヌクレオチドを含む組み換えベクター;上記組み換えベクターを含む宿主細胞、ここで、上記宿主細胞は上記治療すべき患者から得られる;アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつ単離されたポリペプチド;上記ポリペプチドに特異的な抗体;並びに医薬として許容される賦形剤の1以上を投与することを含む上記方法。

40

【請求項32】

個体のゲノム内における請求項1に記載のポリヌクレオチドの存在に関係した上記個体の障害又は病気の予防又は治療方法であって、治療として有効量の:ヌクレオチド配列、配列番号1の全部又は一部を含み、かつ、c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g及びt1265cから成る群から選ばれる少なくとも1つのSNPをもつ単離されたポリヌクレオチ

50

ド又は上記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列；上記ポリヌクレオチドの1つを含む組み換えベクター；上記組み換えベクターを含む宿主細胞；アミノ酸配列、配列番号2の全部又は一部を含み、かつ、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる少なくとも1つのコーディングSNPをもつ単離されたポリペプチド；上記ポリペプチドの1つに特異的な抗体；並びに医薬として許容される賦形剤の1以上を投与することを含む上記方法。

【請求項33】

IFN - 21遺伝子内のc794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g及びt1265cから成る群から選ばれる少なくとも1つのSNPと、病気又は病気に対する耐性の間の統計的に関連性のある組み合わせの決定方法であって、以下の：

- a) 個体群を遺伝子型解析し；
 - b) 上記個体群内の病気又は病気に対する耐性の分布を測定し；
 - c) 上記遺伝子型データを病気又は病気に対する耐性の分布と比較し；そして
 - d) 統計的に関連性のある組み合わせについて上記比較を分析する、
- を含む上記方法。

【請求項34】

IFN - 21遺伝子内のc794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g及びt1265cから成る群から選ばれる少なくとも1のSNPを検出することを含む、病気又は病気に対する耐性の診断又は予後徴候の決定方法。

【請求項35】

Q114H/V127D変異IFN - 21遺伝子産物の活性と実質的に類似した生物学的活性を有する、試験すべき1以上の化合物の中の化合物の同定方法であって、以下のステップ：

- a) 上記化合物の生物学的活性、例えば樹状細胞の成熟、CD4+又はCD8+ Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、インビトロ又はインビボにおける抗ウイルス活性、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性、TF-1細胞系に対する細胞抗増殖活性を測定し、
 - b) 上記化合物のステップa)で測定された活性と、Q114H/V127D変異IFN - 21遺伝子産物の活性を比較し；そして
 - c) ステップb)で実行された比較を基準として、上記化合物が、Q114H/V127D変異IFN - 21遺伝子産物のそれと比較して実質的に類似した活性を有するかどうかを決定する、
- を含む上記方法。

【請求項36】

前記試験すべき化合物が、配列番号2のポリペプチド、又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配列のそれと同じ3次元構造をもつように、合成ペプチド・コンビナトリアル・ライブラリー、高性能スクリーニングから同定されるか、あるいはコンピューターを用いたドラッグデザインによって設計される、ただし、上記アミノ酸配列はQ114H及びV127D SNPsを含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

請求項35に記載の方法によって同定された化合物。

【請求項38】

K179E変異IFN - 21遺伝子産物の活性と実質的に類似した生物学的活性を有する、試験すべき1以上の化合物の中の化合物の同定方法であって、以下のステップ：

- a) 上記化合物の生物学的活性、例えば樹状細胞の成熟、CD4+又はCD8+ Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、インビトロ又はインビボにおける抗ウイルス活性、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性、TF-1細胞系に対する細胞抗増殖活性を測定し、
- b) 上記化合物のステップa)で測定された活性と、K179E変異IFN - 21遺伝子産物の活性を比較し；そして
- c) ステップb)で実行された比較を基準として、上記化合物が、K179E変異IFN - 21遺伝子産物のそれと比較して実質的に類似した活性を有するかどうかを決定する、

を含む上記方法。

【請求項39】

前記試験すべき化合物が、配列番号2のポリペプチド、又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間には含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列のそれと同じ3次元構造をもつように、合成ペプチド・コンビナトリアル・ライブラリー、高性能スクリーニングから同定されるか、あるいはコンピューターを用いたドラッグデザインによって設計される、ただし、上記アミノ酸配列はK179E SNPを含む、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

請求項38に記載の方法によって同定された化合物。

【請求項41】

癌及び腫瘍、感染症、免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気、心血管系の病気、代謝系の病気、中枢神経系の病気、並びに化学療法治療に関係した障害から成る群から選ばれた病気の個体における予防又は治療方法であって、治療として有効量の請求項37又は40に記載の作用物質及び医薬として許容される賦形剤を上記個体に投与することを含む上記方法。

10

【請求項42】

前記癌及び腫瘍が、転移性腎癌、メラノーマ、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞型リンパ腫を含むリンパ腫、毛様細胞性白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含む白血病、肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、並びにAIDSの場合のカポジ肉腫を含む、免疫欠陥に続いて現れる腫瘍を含む、請求項41に記載の方法。

20

【請求項43】

前記感染症が、慢性B及びC型肝炎、並びにHIV/AIDSを含むウイルス感染、感染性肺炎、そして性病、例えば陰部疣贅を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項44】

前記の免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気が、組織又は臓器移植片の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、並びに潰瘍性大腸炎を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項45】

前記中枢神経系の病気が、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症、及びうつ病を含む、請求項41に記載の方法。

30

【請求項46】

前記代謝系の病気が、肥満症のような免疫に関係しない病気を含む、請求項41に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願：

本発明は、 Nouveaux polynucleotides comportant des polymorphismes de type SNP fonctionnels dans la sequence nucleique du gene IFN lpha21 ainsi que de nouveaux polypeptides codes par ces polynucleotides et leurs utilisations therapeutiques と題する2001年3月30日に出願されたフランス特許出願番号第0104404号に対する優先権を主張する。

40

【0002】

本発明の分野

本発明は、新規SNPsを含むIFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列由来の新規ポリヌクレオチド、及びこれらのSNPsによって引き起こされた変異を含む天然の野生型IFN - 21タンパク質由来の新規ポリペプチド、並びにそれらの、治療のための使用に関する。

【背景技術】

【0003】

50

発明の背景

関連技術

インターフェロン 21遺伝子(以下、IFN - 21と呼ぶ)は、刊行物中に記載されている：

- Goeddel, D. V., Leung, D. W.; 「8つの特徴的なクローン化されたヒト白血球インターフェロンcDNAの構造」； Nature, 290 (5801), 20 - 26(1981)。

- Olopade OI., Bohlander SK.; 「ヒトの腫瘍症に関係する第9染色体短腕の欠失の重複部分からの最短領域のマッピング」； Genomics 14 (2), 437 - 443(1992)。

【0004】

この遺伝子のヌクレオチド配列は、登録番号AC009445下、ジーンバンク・データベースのHTGの項で入手可能である。

IFN - 21のメッセンジャーRNAの配列は、登録コードNM-002175下、NCBIのデータベースに記載されている。

IFN - 21は、ヒト・インターフェロン (IFN)、特にIFN - 2のそれに近い構造的及び機能的な相同性を有する遺伝子である。

【0005】

IFN は、それらの細胞の抗増殖効果、並びに抗ウイルス性及び抗寄生生物性応答へのそれらの関与について知られている。

IFN は、造血幹細胞のレベルでいくつかの他のサイトカインの発現を抑制すること、そして特定の腫瘍の細胞増殖を抑制することも知られている。

【0006】

IFN は、腎癌のEGFに対する受容体の発現を減少させ、ミトコンドリア遺伝子の発現を抑え、特に生体外において線維芽細胞、単球及びBリンパ球の増殖を抑え、そしてBリンパ球による抗体の合成を妨げることも知られている。

【0007】

IFN は、腫瘍細胞表面上の腫瘍特異抗原の発現を誘発し、そしてこれらのISREの特定の転写因子に従いISRE型(インターフェロン刺激応答因子)のプロモーター領域の制御下に置かれた遺伝子をも誘発することが知られてもいる。

【0008】

IFN が様々な障害及び/又はヒトの病気、例えば様々な癌の類(例えば、癌腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、並びに肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌)、心血管系の病気、代謝系の病気(例えば免疫系の類と関連しないもの、例えば肥満症)、感染症(例えば、B及びC型肝炎並びにAIDS)、肺炎、潰瘍性大腸炎の類、中枢神経系の病気(例えば、アルツハイマー病、統合失調症及びうつ病)、組織又は臓器移植片の拒絶、外傷の治癒、透析患者の貧血、アレルギー、喘息、多発性硬化症、骨粗鬆症、乾癬、関節リウマチ、クローン病、自己免疫疾患及び障害、胃腸の障害、あるいは化学療法の治療に関連した障害にさえ係わっていることが知られている。

【0009】

IFN は、特に特定の白血病の治療、転移した腎癌、及び免疫不全に続いて現れる腫瘍、例えばAIDSの場合におけるカポジ肉腫に使用される。IFN は、他のタイプの癌、及び特定のウイルス感染に対しても有効である。IFN は、陰部疣贅又は性病の治療のためにFDA (食品医薬品局)によって承認されてもいる。

【0010】

より特に、IFN - 21は、in situハイブリダイゼーションによりパーキンソン病又はアルツハイマー病に冒された患者の脳に発見された。

【0011】

他の細胞と比べて、ミクログリア細胞は大量のIFN - 21を発現する。

アルツハイマー病に冒された患者で、IFN - 21の存在が、頭頂葉のニューロンに示され、IFN - 21がこの病変に係わっていることを示唆する(例えば、Kawaguchi N, Yamada T, Yoshiyama Y. No To Shinkei. 1997 Jan.; 49(1): 69 - 73を参照のこと)。

【0012】

10

20

30

40

50

しかし、IFN β 、特にIFN β -21が、医薬組成物、例えば急性過敏症(じんましん、気管支収縮、アナフィラキシーショックなど)の反応、心不整脈、低血圧、てんかん発作、甲状腺の機能の問題、インフルエンザ様症候群(発熱、発汗、筋肉痛)などに使用される場合、多数の副作用を有する。

【0013】

さらに、IFN β により治療された患者は、これらの分子を中和する抗体を生み出す可能性があり、それによりそれらの有効性を減少させることができる。

【0014】

本発明者は、天然の野生型IFN β -21タンパク質と、異なる機能性をもつことが可能なIFN β -21遺伝子に対する新規ポリペプチド及び新規ポリヌクレオチド・アナログを発見した。

10

【0015】

これらの新しいポリペプチド及びポリヌクレオチドは、とりわけ、先に触れた障害又は病気を治療又は予防するため使用することができて、それらに密接に結び付けられる問題点の全て又は一部を回避することができる。

【発明の開示】

【0016】

本発明の簡単な概要

本発明は、その最初の目的として、1つ又は複数のSNPs(一塩基多型)を含む基準野生型IFN β -21遺伝子のヌクレオチド配列と異なる新規ポリヌクレオチドを有する。

20

【0017】

ヒトの基準野生型IFN β -21遺伝子のヌクレオチド配列、配列番号1は、2001のヌクレオチドから構成されて、第670ヌクレオチド(開始コドン)から第1239ヌクレオチド(停止コドン)までの570のヌクレオチドから成るコード配列を含む。

【0018】

出願人は、基準野生型IFN β -21遺伝子のヌクレオチド配列中に8つのSNPsを同定した。これらの8つのSNPsは、以下の：c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cである。

【0019】

本発明の意味において、先に定義されたSNPの位置付けに対応する番号付けは、ヌクレオチド配列、配列番号1の番号付けと関連することが理解される。

30

【0020】

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

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

【0021】

よって、例えば、SNP c794gは、基準野生型IFN β -21遺伝子のヌクレオチド配列、配列番号1の794位で、ヌクレオチド、シトシン(c)の、ヌクレオチド、グアニン(g)への変異に相当する。

40

【0022】

これらのSNPsは、「前もって選ばれた機能的候補遺伝子のヌクレオチド配列中の1つ又は複数の機能的多型性の同定方法並びにその適用」と題された、そして2000年12月6日に出版された、当該出願人の特許出願FR 00 22894に記載された測定方法を使って出願人によって同定された、ここで上記文献を本明細書中に援用する。

【0023】

当該特許出願に記載された方法は、個体のランダム集団からの少なくとも1の個体における1つの(又はいくつかの)先在するSNP(s)の同定を可能にする。

【0024】

本発明の範囲で、例えばコード配列を含んでいるIFN β -21遺伝子のヌクレオチド配列の

50

断片は、ランダムなやり方で選ばれた個体集団内の異なる個体から単離された。

次に、これらの断片の配列決定を、DHPLC(「変性 - 高速液体クロマトグラフィー」)による解析後に、ヘテロ2本鎖特性(すなわち、基準野生型IFN - 21遺伝子配列のそれと異なる特性)を有するこれらのサンプルを確認するために実行した。

次に、この方法により配列決定された断片を、基準野生型IFN - 21遺伝子の断片のヌクレオチド配列と比べて、本発明に従ってSNPsを同定した。

このように、SNPsは天然のものであり、それらの各々が世界人口の特定の個体に存在する。

【0025】

基準野生型IFN - 21遺伝子は、アミノ酸配列順序配列番号2に相当する189のアミノ酸の未成熟型タンパク質をコードし、それは、最初の23のアミノ酸を含むシグナルペプチドの切断により166のアミノ酸の成熟型タンパク質に変換される。

10

【0026】

本発明のコーディングSNPs、すなわち：c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gの各々は、IFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列のレベルでの変更を引き起こす。

【0027】

アミノ酸配列のこれらの変更は、以下のとおりである：

SNP c794gは、アミノ酸配列、配列番号2に相当するIFN - 21遺伝子の未成熟型タンパク質の42位、かつ、成熟型タンパク質の19位でのアミノ酸、アラニン(A)のグリシン(G)への変異を引き起こす。本発明の記載において、当業者は、成熟型タンパク質を参照するか又は未成熟型タンパク質を参照するかにより、このSNPによってコードされた変異をそれぞれ、A19G又はA42Gと呼ぶ。

20

【0028】

SNP c973aは、アミノ酸配列、配列番号2に相当するIFN - 21遺伝子の未成熟型タンパク質の102位、かつ、成熟型タンパク質の79位でのアミノ酸、グルタミン(Q)のリジン(K)への変異を引き起こす。本発明の記載において、当業者は、成熟型タンパク質を参照するか又は未成熟型タンパク質を参照するかにより、このSNPによってコードされた変異をそれぞれ、Q79K又はQ102Kと呼ぶ。

【0029】

SNP g1011cは、アミノ酸配列、配列番号2に相当するIFN - 21遺伝子の未成熟型タンパク質の114位、かつ、成熟型タンパク質の91位でのアミノ酸、グルタミン(Q)のヒスチジン(H)への変異を引き起こす。本発明の記載において、当業者は、成熟型タンパク質を参照するか又は未成熟型タンパク質を参照するかにより、このSNPによってコードされた変異をそれぞれ、Q91H又はQ114Hと呼ぶ。

30

【0030】

SNP t1049aは、アミノ酸配列、配列番号2に相当するIFN - 21遺伝子の未成熟型タンパク質の127位、かつ、成熟型タンパク質の104位でのアミノ酸、バリン(V)のアスパラギン酸(D)への変異を引き起こす。本発明の記載において、当業者は、成熟型タンパク質を参照するか又は未成熟型タンパク質を参照するかにより、このSNPによってコードされた変異をそれぞれ、V104D又はV127Dと呼ぶ。

40

【0031】

SNP t1155aは、アミノ酸配列、配列番号2に相当するIFN - 21遺伝子の未成熟型タンパク質の162位、かつ、成熟型タンパク質の139位でのアミノ酸、システイン(C)の終止コドン(stop)への変異を引き起こす。本発明の記載において、当業者は、成熟型タンパク質を参照するか又は未成熟型タンパク質を参照するかにより、このSNPによってコードされた変異をそれぞれ、C139stop又はC162stopと呼ぶ。

【0032】

SNP a1204gは、アミノ酸配列、配列番号2に相当するIFN - 21遺伝子の未成熟型タンパク質の179位、かつ、成熟型タンパク質の156位でのアミノ酸、リジン(K)のグルタミン酸(

50

E)への変異を引き起こす。本発明の記載において、当業者は、成熟型タンパク質を参照するか又は未成熟型タンパク質を参照するかにより、このSNPによってコードされた変異をそれぞれ、K156E又はK179Eと呼ぶ。

【0033】

SNPs c 794 g、c 973 a、g 1011 c、t 1049 a、t 1155 a、a 1204 g は、野生型基準 IFN - 21 遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドと比べて、本発明に従ってポリペプチド空間的構造の変更を引き起こす。

【0034】

これらの変更は、例えば、デノボ・モデリング・ツール(例えば、SEGFOLD/MSI)、相同性(例えば、MODELER/MSI)、力場の最小化(例えば、DISCOVER、Delphi/MSI)、及び/又は分子力学(例えば、CFF/MSI)を使用する、当業者に周知の方法に従い、コンピューターを利用した分子モデリングによって観察される。

10

【0035】

そのようなモデルの例を、以下の実験の項で挙げる。

コンピューターを利用した分子のモデリングは、成熟型変異タンパク質上の変異Q79Kが図1A及び1Bに示されるような水素結合障害により野生型 IFN - 21タンパク質のヘリックスCのN-末端の置き換えを伴うことを示す。

【0036】

実際に、野生型 IFN - 21タンパク質のQ79残基の側鎖の酸素原子、E83残基の酸性基、及びヘリックスCの間の水素結合は、Q79K変異 IFN - 21タンパク質で消失する。

20

よって、Q79K変異タンパク質は、その構造及び機能の著しい変化を伴う、天然の野生型 IFN - 21タンパク質と異なる3次元構造を有する。

【0037】

コンピューターを利用した分子のモデリングは、成熟型変異タンパク質上の変異Q91Hが図2A及び2Bに示されるような変異位置でヘリックスCの置き換えを伴うことを示す。ヘリックスをより強固にするいくつかの水素結合及び塩橋、特に、H91とD76アミノ酸側鎖の間に現れる。

よって、Q91H変異タンパク質は、その構造及び機能の著しい変化を伴う、天然の野生型 IFN - 21タンパク質と異なる3次元構造を有する。

【0038】

コンピューターを利用した分子のモデリングは、成熟型変異タンパク質上の変異V104Dが図3A及び3Bに示されるような変異位置でのヘリックスCとヘリックスDの間のループ構造の変更を伴うことを示す。変異構造において、ヘリックスCとDの間のループをより強固にするいくつかの水素結合が(一方の手のQ102及びG105と、他方の手のQ5、E107及びT109の間に)現れる。さらに、ヘリックスBのN末端の置き換えも観察される。

30

【0039】

これらの空間的変更は、その受容体への IFN - 21の結合に関係している残基に影響する。

よって、V104D変異タンパク質は、その構造及び機能の著しい変化を伴う、天然の野生型 IFN - 21タンパク質と異なる3次元構造を有する。

40

【0040】

コンピューターを利用した分子のモデリングは、成熟型変異タンパク質上の変異C139stopが図4に示されるような野生型 IFN - 21タンパク質内のヘリックスEに通常含まれているポリペプチド断片の消失をもたらすタンパク質翻訳の早すぎる停止を引き起こす。

【0041】

ヘリックスEは、その受容体に IFN - 21が結合するために不可欠である。ヘリックスEの不存在は、変異タンパク質の不正確な折り畳みを引き起こし、そしてタンパク質の疎水性コアが親水性の外部媒体と接触するタンパク質の3次元構造の変更を引き起こす。このように、変異タンパク質は、親水性の外部媒体との接触を回避するためにその疎水性のコアが親水性残基で覆われるようにその3次元構造を修飾しなければならない。

50

よって、C139stop変異タンパク質は、その構造及び機能の著しい変化を伴う、天然の野生型IFN - 21タンパク質と異なる3次元構造を有する。

【0042】

コンピューターを利用した分子のモデリングは、成熟型変異タンパク質上の変異K156Eが図5A及び5Bに示されるようなヘリックスEのC末端の変性(unfolding)、及びC末端ループ形状の変更を伴うことを示す。

【0043】

この変異は、水素結合ネットワークを増やし、そしてE156とR161残基の間の塩橋を作り出す。これらの変更は、この領域におけるIFN - 21タンパク質構造をより強固にする。タンパク質のこの領域は、その抗ウイルス活性に関係していることが知られている。よって、K156E変異IFN - 21タンパク質の抗ウイルス活性が、劇的に阻害され、そして156位のグルタミン酸が成熟型IFN - 21の構造及び機能の変更を引き起こすことが予言される。

10

【0044】

本発明による他のSNPs、すなわち：t1265c、t1277cは、アミノ酸配列、配列番号2のレベルでのIFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされたタンパク質の変更を伴わない。前記SNPs t1265c、t1277cは、何もコードしていない。

【0045】

本発明によるポリヌクレオチドの遺伝子型解析は、集団中のこれらのポリヌクレオチドの対立遺伝子頻度を測定するといったやり方で実行されることができ、以下の実験の項で、遺伝子型解析の例を挙げる。

20

【0046】

本発明のポリペプチドの機能性の定量は、それらの生物活性の試験によって一様に実行されることができ。

この件に関して、例えば天然の野生型IFN - 21タンパク質に比べた本発明によるポリペプチドのダウディ細胞系に対する抗増殖性効果を計測することが可能である(Pielher et al. J. Biol. Chem. Vol. 275, Issue 51, 40425 - 40433, December 22, 2000; 「結合接点の分かりやすい変異的解析によって明らかにされたI型インターフェロン受容体相互作用の新しい構造的及び機能的側面」)。

【0047】

本発明は、目的のために、特に特定のヒトの障害及び/又は病気の予防及び治療のための、本発明によるポリペプチド及びポリヌクレオチドの使用、並びにこれらのポリヌクレオチド及びポリペプチドから開始して得られた及び/又は同定された治療のための分子をも使用する。

30

【0048】

本発明の詳細な説明

定義

「基準野生型遺伝子のヌクレオチド配列」は、ヒトIFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列、配列番号1と理解される。

この配列は、登録番号AC009445下、ジーンバンクで入手可能であり、そしてIFN - 21メッセージRNAの配列は、登録コードNM-002175下、NCBIデータベースに記載される。しかも、ヒトIFN - 21遺伝子は、Goeddel, D. V., Leung, D. W "The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs"; Nature 290 (5801), 20 - 26 (1981)、及びOlopade OI., Bohlander SK. "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia"; Genomics 14 (2), 437 - 443 (1992)中に記載されている。

40

【0049】

「天然の野生型IFN - 21タンパク質」は、基準野生型IFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされた成熟型タンパク質と理解されている。天然の野生型の未成熟型タンパク質IFN - 21は配列番号2で示されたペプチド配列と一致する。

50

【0050】

「ポリヌクレオチド」は、修飾又は非修飾DNA又はRNAであるかもしれないポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドと理解されている。

用語ポリヌクレオチドは、例えば1本鎖又は2本鎖DNA、1又はいくつかの1本鎖領域及び1又はいくつかの2本鎖領域の混合物から構成されたDNA、1本鎖又は2本鎖RNA、1又はいくつかの1本鎖領域及び1又はいくつかの2本鎖領域の混合物から構成されたRNAを含む。用語ポリヌクレオチドは、1つ又はいくつかの3本鎖領域を含むRNA及び/又はDNAをも含むことができる。ポリヌクレオチドに関しては、同様に、安定性の理由のために又は他の理由のために修飾された骨格をもつように修飾された1つ又はいくつかの塩基を含むDNA及びRNAと理解される。修飾された塩基に関しては、例えばイノシンのような例外的な塩基と理解される。

10

【0051】

「ポリペプチド」は、例えば等配電子ペプチドの場合、通常の又は修飾されたペプチド結合によって互いに結合された少なくとも2つのアミノ酸を含むペプチド、オリゴペプチド、オリゴマー又はタンパク質と理解される。

ポリペプチドは遺伝コードによって定義された20のアミノ酸以外のアミノ酸から構成されることができる。同様に、ポリペプチドは、天然の方法、例えば翻訳後成熟過程によって、又は当業者に周知の化学過程により修飾されたアミノ酸からも構成される。そのような修飾が、文献に十分に詳細に説明されている。これらの修飾は、ポリペプチド内：ペプチド骨格内、アミノ酸鎖内のどこでも、あるいはカルボキシ - 又はアミノ - 末端にさえ現れうる。

20

【0052】

ポリペプチドは、ユビキチン化を受けて分岐するか、又は分岐の有無に係わらず環状になるかもしれない。この種の修飾は、当業者に周知の自然又は人工の翻訳後過程の結果であるかもしれない。

【0053】

例えば、ポリペプチドの修飾は、アセチル化、アシル化、ADP - リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合性固定、ヘムの共有結合性固定、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体、脂質又は脂質誘導体の共有結合性固定、ホスファチジルイノシトールの共有結合性又は非共有結合性架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル基、システイン形成、ピログルタミン酸形成、ホルミル化、ガンマ - カルボキシ化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解過程、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セネロイル化(seneyloylation)、硫酸化、アルギニン化又はユビキチン化のようにアミノ酸付加を含んでいると理解される。そのような修飾は、文献中に十分に詳細に記載されている：PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, New York, 1993, POST - TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol. (1990) 182:626 - 646, and Rattan et al. "Protein Synthesis: Post - translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48 - 62。

30

40

【0054】

「単離されたポリヌクレオチド」又は「単離されたポリペプチド」は、例えば人体から単離された、又は専門的な方法によって別な方法で製造された先に定義された、それぞれポリペプチド又はポリヌクレオチドと理解される。

【0055】

「同一性」は、ヌクレオチド又はポリペプチド配列の同一性の測定値と理解される。同一性は、当業者に周知であり、文献中によく記載される用語である。COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS AND GENOME PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M. and Griffin

50

H.G., Ed, Humana Press, New Jersey, 1994;及びSEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, 1987を参照のこと。

【0056】

同様に、2つの配列間の同一性及び類似性を測定するために一般に使われる方法は、文献中に十分記載されている。GUIDE TO HUGE COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo H. and Lipton D., Siam J Applied Math (1988) 48: 1073を参照のこと。

【0057】

例えば、ヌクレオチド配列、配列番号1に少なくとも95%の同一性をもつポリヌクレオチドは、上記配列と比べて100のヌクレオチド上に多くとも5点の変異を含んでいるポリヌクレオチドである。

10

これらの変異点は、1つ(又はいくつかの)置換、付加及び/又は1つ(又はいくつかの)ヌクレオチドの欠失であるかもしれない。

【0058】

同様に、例えば、アミノ酸配列、配列番号1に少なくとも95%の同一性をもつポリペプチドは、上記配列と比べて100のアミノ酸上に多くとも5点の変異を含んでいるポリペプチドである。

これらの変異点は、1つ(又はいくつかの)置換、付加及び/又は1つ(又はいくつかの)アミノ酸の欠失であるかもしれない。

【0059】

20

これらの配列が少なくとも1つの本発明のSNPsを含んでいることが理解される、それぞれ、ヌクレオチド配列、配列番号1又はアミノ酸配列、配列番号2と完全に同一でない本発明によるポリヌクレオチド及びポリペプチドが、これらの配列の変異型と考えられる。

通常、本発明によるポリヌクレオチドは、本発明のSNPsの少なくとも1つを含み、ヌクレオチド配列、配列番号1と同じか又は実質的に同じものは同じ生物活性を有する。

同様に、通常、本発明によるポリペプチドは、本発明のコーディングSNPsの少なくとも1つを含み、アミノ酸配列、配列番号2と同じか又は実質的に同じものは同じ生物活性を有する。

本発明による変異型は、例えば部位特異的変異誘発法又は直接的な合成によって得ることができる。

30

【0060】

「SNP」に関しては、ヌクレオチド配列内の塩基のいずれかの天然の変化と理解される。ヌクレオチド配列上のSNPは、コーディング、サイレント又は非コーディングであるかもしれない。

コーディングSNPは、このヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列中のアミノ酸の変更を伴うヌクレオチド配列のコード配列に含まれる多型性である。この場合、用語SNPは、意味が拡大されて、アミノ酸配列の変異に同様に使用される。

【0061】

サイレントSNPは、このヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列中のアミノ酸の変更を伴わないヌクレオチド配列のコード配列に含まれる多型性である。

40

非コーディングSNPは、ヌクレオチド配列の非コード配列に含まれている多型性である。この多型性は、特にイントロン、スプライシング領域、転写プロモーター又は部位エンハンサー配列中に見ることができる。

【0062】

「機能的SNP」に関しては、機能性をもっているヌクレオチド配列又はアミノ酸配列に含まれる、例えば先に定義のSNPと理解される。

「機能性」は、ポリペプチド又はポリヌクレオチドの生物活性と理解される。

本発明によるポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能性は、野生型基準遺伝子のヌクレオチド配列又はこの後者のヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドの生物活性の保存、増加、削減又は抑制にある。

50

【0063】

同様に、本発明によるポリペプチド又はポリヌクレオチドの機能性は、基準野生型遺伝子のヌクレオチド配列又はこの後者のヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの生物活性の性質の変化にある。

生物活性は、特に受容体と、本発明によるポリペプチドの親和性又は親和性の不存在に関連する可能性がある。

【0064】

ポリヌクレオチド

本発明は、最初の目的のために、以下の：

a) 配列、配列番号1又はそのコード配列(第670ヌクレオチドから第1239ヌクレオチド)と、少なくとも80%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも99%の同一性をもつヌクレオチド配列、ここで、このヌクレオチド配列が以下のコーディングSNPs c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gの少なくとも1つを含むことは理解される、あるいは

10

【0065】

b) a)下のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、を含む単離されたポリヌクレオチドを含む。

本発明の意味では、番号付けがヌクレオチド配列、配列番号1のSNPsの位置決めと一致することが理解される。

【0066】

同様に、本発明は以下の：

a) ヌクレオチド配列、配列番号1又はそのコード配列、ここで、これらのヌクレオチド配列が以下のコーディングSNPs c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gの少なくとも1つを含むことは理解される、あるいは

20

b) a)下のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、を含む単離されたポリヌクレオチドに関する。

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列、配列番号1又はそのコード配列から成り、ここで、これらのヌクレオチド配列の各々が以下のコーディングSNPs：c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gの少なくとも1つを含むことが理解される。

【0067】

本発明によると、先に定義されたポリヌクレオチドは、以下のc794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a及びa1204gから成る群から選ばれる1つのコーディングSNPを含む。

30

同様に、例えば、先に定義されたポリヌクレオチドは、以下の非コーディングSNPs：t1265c、t1277cの少なくとも1つを含むことができる。

【0068】

同様に、本発明は、その目的のために、以下の：

a) ヌクレオチド配列、配列番号1又はそのコード配列、ここで、これらの配列の各々が以下の非コーディングSNPs：t1265c、t1277cの少なくとも1つを含むことは理解される、あるいは

40

b) a)下のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、を含む又はそれらから成る単離されたポリヌクレオチドを有する。

【0069】

本発明は、以下の：

a) ヌクレオチド配列、配列番号1又はそのコード配列、ここで、これらの配列の各々が以下のSNPs：c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cの少なくとも1つを含むことは理解される、あるいは

b) a)下のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、

の一部から成る単離されたポリヌクレオチドに関係し、上記単離されたポリヌクレオチドは、少なくとも10のヌクレオチドから構成される。

50

【0070】

好ましくは、先に定義された単離されたポリヌクレオチドは、10～40のヌクレオチドから構成される。

【0071】

本発明は、その目的のために、以下の：

a) アミノ酸配列、配列番号2、又は

b) アミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間には含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列、

ここで、a)及びb)下のアミノ酸配列の各々がコーディングSNPs：A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop、K179Eの少なくとも1つを含むことは理解されている、

を含むポリペプチドをコードするための単離されたポリヌクレオチドをも有する。

本発明の意味において、A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop、K179E SNPsの位置付けに対応する番号付けが、アミノ酸配列、配列番号2の番号付けと関連することは理解される。

10

【0072】

本発明の好ましい目的によると、先に定義されたポリペプチドは、1つの、先に定義されたようなコーディングSNPを含む。

好ましくは、本発明によるポリヌクレオチドは、DNA又はRNA分子から構成される。

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

20

同様に、本発明によるポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列、配列番号1上の各々のSNPに関する変異ヌクレオチドにより野生型ヌクレオチドを修飾することによってIFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列から開始した部位特異的変異誘発法によって得ることができる。

【0073】

例えば、SNP c794gを含む本発明によるポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列、配列番号1上の794位でヌクレオチド、グアニン(g)によりヌクレオチド、シトシン(c)を修飾することによってIFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列から開始した部位特異的変異誘発法によって得ることができる。

【0074】

この方法により実行されうる部位特異的変異誘発法の方法は、当業者に周知である。1985年の「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」82: 488中のTA Kunkelの発表を特に記載する。

同様に、単離されたポリヌクレオチドは、例えばプレ - 、プロ - 又はプレ - プロ - タンパク質アミノ酸配列又はヘキサ - ヒスチジン・ペプチドのようなマーカー・アミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含むことができる。

同様に、本発明のポリヌクレオチドは、融合タンパク質又は他の精製産物を得るために他のタンパク質又はタンパク質断片をコードするヌクレオチド配列に関係しうる。

30

【0075】

同様に、本発明によるとポリヌクレオチドは、例えば5'及び/又は3'非コード配列、例えば転写又は非転写配列、翻訳又は非翻訳配列、スプライシング・シグナル配列、ポリアダニル化配列、リボソーム結合配列、あるいはメッセンジャーRNAを安定化する配列を含みうる。

40

【0076】

ヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列は、ストリンジェント条件下で、このヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができるものと定義される。ヌクレオチド配列を含むことができる。

【0077】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、一般的に、しかし必ずしもそうではなく、ヌクレオチド配列が少なくとも80%、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、そして最も好ましくは97%以上の同一性をもつときにハイブリダイゼーシ

50

ヨンを可能にする化学的条件と理解される。

【0078】

ストリンジェント条件は、当業者に周知の方法に従い、そして、例えばポリヌクレオチドを50%のホルムアミド、5xSSC(150 mMのNaCl、15 mMのクエン酸3ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xのデンハート溶液、10%の硫酸デキストラン、20 μgの変性サケ精子DNAを含む溶液中、42 でインキュベートし、続いて65 で、0.1xSSCによりフィルターを洗浄することにより得ることができる。

【0079】

本発明の範囲内において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が100%に匹敵する同一性をもつヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを可能にするとき、そのヌクレオチド配列は、例えばa)の下で記載されたヌクレオチド配列に対し厳密に相補的であるとみなされる。

ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列が本発明によるアンチセンスSNPの少なくとも1つを含むことは、本発明の意味の範囲内において理解される。

【0080】

よって、例えばヌクレオチド配列がSNP c794gを含む場合、その相補的なヌクレオチド配列は794位に相当する位置にヌクレオチド、シトシン(c)を含む。

【0081】

SNPを含むポリヌクレオチドの同定、ハイブリダイゼーション及び/又は増幅

本発明は、その目的のために、以下：

a) ヌクレオチド配列、配列番号1と80~100%の同一性(好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは95%の同一性、そして特に100%の同一性)をもつポリヌクレオチド、及び/又は

b) ヌクレオチド配列、配列番号1と80~100%の同一性(好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは95%の同一性、そして特に100%の同一性)をもつポリヌクレオチドの全体又は一部の同定、ハイブリダイズ及び/又は増幅のために少なくとも1つのSNPを含むこと本発明によるポリヌクレオチド、必要であればその(第670ヌクレオチド~第1239ヌクレオチドの)コード配列、

の全て又は一部をも使用し、ここで、これらの配列の各々が以下のSNPs：c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cの少なくとも1つを含むことは理解される。

【0082】

遺伝子型解析及びSNP頻度の測定

同様に、本発明は、その目的のために、以下：

a) ヌクレオチド配列、配列番号1と80~100%の同一性(好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは95%の同一性、そして特に100%の同一性)をもつポリヌクレオチド、及び/又は

b) ヌクレオチド配列、配列番号1と80~100%の同一性(好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは95%の同一性、そして特に100%の同一性)をもつポリヌクレオチドの全体又は一部の遺伝子型解析のために少なくとも1つのSNPを含むこと本発明によるポリヌクレオチド、

の全て又は一部を使用し、ここで、これらの配列の各々が以下のSNPs：c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cの少なくとも1つを含むことは理解される。

【0083】

本発明により、遺伝子型解析は、個体又は個体集団において実行されうる。

本発明の意味の範囲内において、遺伝子型解析は、個体又は個体集団の遺伝子型の測定方法と定義される。遺伝子型は、1以上の特定座位に存在する対立因子から成る。

【0084】

「個体集団」は、ランダムな又は非ランダムな方法で選ばれた個体の群と理解される。こ

10

20

30

40

50

これらの個体は、ヒト、動物、微生物又は植物であるかもしれない。

【0085】

通常、前記個体群は、少なくとも10人、好ましくは100～300人を含む。

個体は、それらの民族性によるか又はそれらの表現型により、特に以下の障害及び/又は病気：癌腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、並びに肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌；心血管系の病気；代謝系の病気、例えば免疫系の類と関連しないもの、例えば肥満症；感染症、例えば、B及びC型肝炎及びAIDSのようなウイルス感染症；肺炎；潰瘍性大腸炎の類；中枢神経系の類の病気、例えば、アルツハイマー病、統合失調症及びうつ病；組織又は臓器移植片の拒絶；外傷の治癒；透析患者の貧血；アレルギー；喘息；多発性硬化症；骨粗鬆症；乾癬；関節リウマチ；クローン病；自己免疫疾患及び障害；胃腸の障害；あるいはさらに化学療法の治療に関連した障害に影響を受ける人が選ばれうる。

10

【0086】

本発明による機能的なSNPは、好ましくは個体集団で遺伝子型解析される。

SNPs遺伝子型を同定するために実行されることができいくつかの技術が存在する(特に、Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, pp 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches"を参照のこと)。これらの技術は、以下の4つの原理：対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーション、場合によりデオキシヌクレオチドの存在下で、ジデオキシヌクレオチドによるオリゴヌクレオチド伸長、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの連結又は対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド切断、のいずれか1つに基づく。これらの技術の各々は、直接的であるか、又は蛍光偏光、若しくは質量分析法のような検出システムと組み合わせることができる。

20

【0087】

遺伝子型解析は、蛍光偏光スキャナーと組み合わせて、ホットddNTPs(異なるフルオロフォアによって標識された2つの異なるddNTPs)とコールドddNTPs(2つの異なる非標識ddNTPs)を用いたミニ配列決定によって特に実行することができる。蛍光偏光(FPTDI技術又は蛍光偏光鑄型に対する染料・ターミネーターの取り込み)の読取値によるミニ配列決定プロトコルが、当業者に周知である。

【0088】

それは、各々の個体からのDNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅後に得られた産物において実行することができる。このPCR産物は、検討されるSNPを含むポリヌクレオチド遺伝子領域をカバーするように選ばれる。PCRサーモサイクラーの最後のステップの後、次に、フルオロフォアの特異的励起と放射フィルターを使うことによって標識された塩基の読取のために、プレートを蛍光偏光スキャナー上に置く。標識された塩基の強度の値はグラフで記録される。

30

【0089】

PCR増幅のために、本発明のSNPの場合、センス及びアンチセンス・プライマーは、それぞれ、本発明のSNPsの位置に従って当業者によって容易に選択されることができる。

【0090】

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

40

配列番号3：センス・プライマー：GGTTCAAGGTTACCCATCTC

配列番号4：アンチセンス・プライマー：TTTGAATGGCAGAAGTCAT、

である。

このヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列、配列番号1の第620ヌクレオチドから第1315ヌクレオチドの、696ヌクレオチドの長さがある断片の増幅を可能にする。

【0091】

次に、個体集団内のSNPを含む遺伝子によってコードされる各々の対立遺伝子の頻度(対立遺伝子頻度)の統計分析が得られ、それは、異なる亜群、そして特に、必要ならば、この個体集団を構成する様々な民族群におけるそれらの影響とそれらの分布の重要性の決定を可能にする。

50

【0092】

遺伝子型解析データは、検討された集団において観察した異なる対立遺伝子の分布度数を評価するために分析される。対立遺伝子頻度の計算は、SAS - suite(登録商標)(SAS)又はS PLUS(登録商標)(MathSoft)のようなソフトウェアを用いて実行することができる。個体集団の異なる民族群にまたがる本発明のSNPの対立遺伝子分布の比較は、ソフトウェアARLEQUIN(登録商標)とSAS - suite(登録商標)によって実行することができる。

【0093】

遺伝子標識としての本発明のSNPs

遺伝子の機能的配列(例えば、プロモーター、スプライシング部位、コード領域)を修飾しているSNPsは、病気の感受性又は耐性に直接的に関係している可能性があるが、(機能的な又は機能的でない)全てのSNPsがこれらの病状に關与する1つ又はいくつかの遺伝子の同定のために有用なマーカーを提供し、その結果、これらの病状と間接的に関係があるかもしれない(Cargill et al. (1999). Nature Genetics 22:231-238; Riley et al. (2000). Pharmacogenomics 1:39-47; Roberts L. (2000). Science 287: 1898-1899を参照のこと)。

10

【0094】

このように、本発明は、IFN - 21遺伝子のポリヌクレオチド中に以下のSNPs : c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cの少なくとも1つを含むデータバンクにも関する。

前記SNPsは、ヌクレオチド配列、配列番号1に従って番号付けされることは、十分理解される。

20

【0095】

このデータバンクは、以下の：

(i) IFN - 21遺伝子のポリヌクレオチド中の以下のSNPs : c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cの少なくとも1つ、と

(ii) 病気又は病気への耐性、

の間の統計的に関係性のある組み合わせを測定するために分析されうる。

本発明は、病気又は病気への耐性に関する診断/予後診断キットの開発のために、IFN - 21遺伝子のポリヌクレオチド中の以下のSNPs : c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cの少なくとも1つの使用にも関する。

30

【0096】

例えば、先に定義されている、本発明のSNPは、病気又は病気への耐性に直接的に又は間接的に関係する。

好ましくは、これらの病気は、先に触れたとおり定義されたものである。

【0097】

発現ベクター及び宿主細胞

本発明は、その目的のために、本発明による少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組み換えベクターをも有する。

【0098】

これだけに制限されることなく、染色体、エピソーム、及び誘導ウイルス(derived viruses)を含む多数の発現システムを使用することができる。より特に、使用される組み換えベクターは、細菌プラスミド、トランスポゾン、酵母のエピソーム、挿入要素、酵母染色体要素、ウイルス、例えばバキュロウイルス、SV40のようなパピローマウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、キツネ疱疹ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来でありうる。

40

【0099】

同様に、これらの組み換えベクターは、コスミド又はファージミド誘導體であるかもしれない。ヌクレオチド配列は、当業者に周知の方法、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrook et al, 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001中に記載の方法による組み換え発現ベクター内に挿入されることがで

50

きる。

【0100】

組み換えベクターは、ポリヌクレオチド発現の調節を制御するヌクレオチド配列、並びに本発明のポリヌクレオチドの発現と転写、及び本発明のポリペプチドの翻訳を可能にするヌクレオチド配列を含むことができ、これらの配列は、使用される宿主細胞に従って選ばれる。

【0101】

このように、例えば、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドが、小胞体の管腔に、膜上の細胞膜周辺腔に又は細胞外環境に向けられるように、適切な分泌シグナルが組み換えのベクター内に統合されることができる。

10

【0102】

本発明は、その目的のために、本発明による組み換えベクターを含む宿主細胞をも有する。

宿主細胞への組み換えベクターの導入は、当業者に周知の方法、例えばBASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al, 2nd ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995、及びMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、前記の中に記載される方法、例えばリン酸カルシウムによるトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性脂質によるトランスフェクション、電気穿孔法、形質導入、又は注入に従って実行されうる。

【0103】

宿主細胞は、例えば連鎖球菌(streptococci)、ブドウ球菌(staphylococci)、E.コリ(E. coli)又はバチルス・サブチリス(Bacillus subtilis)の細胞のような細菌の細胞、酵母細胞及びアスペルギルス属(Aspergillus)、ストレプトマイセス属(Streptomyces)の細胞のような真菌の細胞、ショウジョウバエS2(Drosophila S2)及びヤトウガSf9(Spodoptera Sf9)の細胞のような昆虫の細胞、CHO、COS、HeLa、C127、BHK、HEK293細胞のような動物細胞及び治療対象のヒト細胞、あるいはさらに植物細胞でありうる。

20

宿主細胞は、例えば、以下に見られるように、本発明のポリペプチド又は医薬組成物中の活性な産物の発現のために使用されうる。

【0104】

ポリペプチド

本発明は、その目的のために、以下の：

- a) アミノ酸配列、配列番号2、又は
- b) アミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間には包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配列、

30

と少なくとも80%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも99%の同一性をもつアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドをも有し、ここで、a)及びb)下のアミノ酸配列の各々がコーディングSNPs：A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop、K179Eの少なくとも1つを含むことは理解される。

【0105】

同様に、本発明のポリペプチドは以下の：

- a) アミノ酸配列、配列番号2、又は
- b) アミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間には包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配列、

40

を含むことができ、ここで、a)及びb)下のアミノ酸配列の各々がコーディングSNPs：A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop、K179Eの少なくとも1つを含むことは理解される。

【0106】

より好ましくは、本発明のポリペプチドは以下の：

- a) アミノ酸配列、配列番号2、又は
- b) アミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間には包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配

50

列、

から成ることができ、ここで、a)及びb)下のアミノ酸配列の各々がコーディングSNPs：A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop、K179Eの少なくとも1つを含むことは理解される。

【0107】

好ましくは、本発明によるポリペプチドは、以下の：A42G、Q102K、Q114H、V127D、C162stop及びK179Eから成る群から選ばれる1つのコーディングSNPを含む。

【0108】

同様に、本発明は、その目的のために、先に定義された宿主細胞を培地中で培養し、そして上記ポリペプチドを培地から単離する、先に記載されたポリペプチドの製造方法を有する。

10

【0109】

前記ポリペプチドは、当業者に周知の方法、例えばカオトロピック剤、例えば塩、特に硫酸アンモニウム、エタノールアセトン又はトリクロロ酢酸を用いた沈殿；酸性抽出；イオン交換クロマトグラフィー；リン酸セルロース・クロマトグラフィー；疎水性相互作用クロマトグラフィー；アフィニティー・クロマトグラフィー；ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィー、あるいは圧排クロマトグラフィーにより、宿主細胞の培地から開始して精製することができる。

【0110】

「培地」は、本発明のポリペプチドを単離又は精製する培地と理解される。この培地は、細胞外培地及び/又は細胞ライセートから構成されうる。同様に、前記ポリペプチドの立体構造が単離又は精製中に変わったとき、当業者に周知の技術は、活性な立体構造をポリペプチドに取り戻すことができる。

20

【0111】

抗体

本発明は、その目的のために、免疫特異的抗体を得る方法をも有する。

「抗体」は、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、1本鎖及びヒト化抗体、並びにFab又は免疫グロブリン発現産物ライブラリを含むFab断片を含むと理解される。

【0112】

免疫特異的抗体は、本発明によるポリペプチドを用いた動物の免疫処置によって得ることができる。

30

【0113】

本発明は、先に定義されたような本発明によるポリペプチドに対する免疫特異的抗体にも関する。

【0114】

本発明によるポリペプチド、その断片の1つ、アナログ、その変異型の1つ、又はこのポリペプチドを発現する細胞を、免疫特異的抗体を産生するために使用することもできる。

【0115】

用語「免疫特異的」は、抗体が本発明のポリペプチドに対して先行技術で知られている他のポリペプチドより優れた親和性を有することを意味する。

免疫特異的抗体は、当業者に周知の方法に従って、本発明のポリペプチド、その断片の1つ、アナログ又はエピトープ断片、あるいは哺乳動物の、好ましくは非ヒトの細胞内にこのポリヌクレオチドを発現する細胞を投与することによって得ることができる。

40

【0116】

モノクローナル抗体の準備のために、細胞系から始まる、抗体産生の典型的な方法、例えばハイブリドーマ技術(Kohler et al. Nature (1975) 256: 495-497)、トリオーマ(trioma)技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72)、そしてEBVハイブリドーマ技術(Cole et al., "The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer," in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Vol. 27, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series) (eds. R.A. Reisfeld and S. Sell), pp. 77-96, Alan R. Liss, 社 N.Y., 1985, pp. 77-96)を使

50

用することができる。

【0117】

同様に、例えば、米国特許番号第4,946,778号に記載の単一鎖抗体産生の技術を使用することができる。

同様に、トランスジェニック動物、例えばマウスを、例えばヒト化抗体を産生するために使用することができる。

【0118】

本発明のポリペプチドと相互作用する作用物質

同様に、本発明は、その目的のために、以下の：

- a) 少なくとも1のコーディングSNPを包含する本発明によるポリヌクレオチドを含む組み換えベクターを準備し、
- b) a)による組み換えベクターを含む宿主細胞を準備し、
- c) b)による宿主細胞と、試験すべき作用物質とを接触させ、そして
- d) 上記試験すべき作用物質によって引き起こされた活性化又は抑制効果を測定する、を含む、本発明によるポリペプチドを活性化するか又は抑制する作用物質の同定方法を有する。

【0119】

本発明によるポリペプチドは、それと相互作用する化合物のスクリーニング方法のために使用されることもできる。

【0120】

これらの化合物は、本発明によるポリペプチドの内因活性を活性化する(アゴニスト)又は抑制する作用物質(アンタゴニスト)でありうる。同様に、これらの化合物は、本発明のポリペプチドのリガンド又は基質であるかもしれない。Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1 (2), Chapter 5 (1991)を参照のこと。

【0121】

一般的に、そのような方法を実行するために、本発明によるポリペプチドを発現する適当な宿主細胞を産生することが何よりも望ましい。そのような細胞は、例えば哺乳動物の細胞、酵母細胞、ショウジョウバエのような昆虫の細胞、又はE.コリのような細菌の細胞であるかもしれない。次に、これらの細胞又はこれらの細胞の膜抽出物を、試験すべき化合物の存在下に加える。

【0122】

次に、本発明のポリペプチドと、検討された化合物の結合能力、及び機能的応答の抑制又は活性化を、観察することができる。

【0123】

前記方法のステップd)は、直接的に又は間接的に標識された、試験すべき作用物質を使うことによって実行することができる。それは、標識又は無標識作用物質と標識拮抗物質を使用することによる競合試験を含むこともできる。

【0124】

検討すべき作用物質が本発明のポリペプチドを発現する細胞の活性化又は抑制シグナルを生じる場合、検出すべきシグナルに従って選ばれる検出手段を使用することによって、同様に測定される。

【0125】

そのような活性化又は抑制作用物質は、ポリヌクレオチド、そして特定の場合において、例えばオリゴヌクレオチド又はポリペプチド、例えばタンパク質若しくは抗体であるかもしれない。

【0126】

本発明は、その目的のために、以下の：

- a) 少なくとも1のコーディングSNPを包含する本発明によるポリヌクレオチドを含む組み換えベクターの準備、
- b) a)による組み換えベクターを含む宿主細胞の準備、

c) b)による宿主細胞の、試験すべき作用物質の存在下への添加、そして
 d) 上記試験すべき作用物質に対する上記ポリペプチドによって引き起こされた活性化又は抑制効果の測定、
 を含む、本発明によるポリペプチドにより活性化するか又は抑制される作用物質の同定方法をも有する。

【0127】

本発明のポリペプチドによって活性化又は抑制される作用物質は、それぞれ、このポリペプチドの存在下で活性化又は抑制により応答する作用物質である。本発明のポリペプチドによって直接的に又は間接的に活性化又は抑制される作用物質は、ポリペプチド、例えば、膜又は核内の受容体、キナーゼ、より好ましくはチロシンキナーゼ、転写因子、又はポリヌクレオチドから成る可能性がある。

10

【0128】

病気の検出

本発明は、目的のために、以下の：

- a) 患者のゲノム中の本発明によるポリヌクレオチドの存在又は不存在の測定；
- b) 患者における本発明によるポリヌクレオチドの発現レベルの測定；
- c) 患者における本発明によるポリペプチドの存在又は不存在の測定；
- d) 患者における本発明によるポリペプチドの濃度の測定；及び/又は
- e) 患者における本発明によるポリペプチドの機能性の測定、

の少なくとも1つを含む、患者のにおける本発明によるポリヌクレオチド及び/又は本発明によるポリペプチドの生物学的な特性の分析方法をも有する。

20

【0129】

これらの生物学的な特性は、患者又は患者由来のサンプルにおいて分析されうる。

これらの生物学的な特性は、遺伝子診断を実行すること、及び患者が病気に冒されるか又冒される危険にさらされているかどうかを判断すること、あるいは、逆に、本発明によるポリヌクレオチド及び/又は本発明によるポリペプチドの存在と結び付いた病気、軽い病気又は障害の進行に対する部分的な耐性を与えることを可能にするかもしれない。

【0130】

これらの病気は、障害及び/又はヒトの病気、例えば癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連する病気及び/又は自己免疫疾患及び障害、心血管系の病気、代謝系の病気、中枢神経系の病気、並びに化学療法治療に関係した障害であるかもしれない。

30

【0131】

前記癌及び腫瘍は、転移性腎癌を含む癌腫、メラノーマ、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞型リンパ腫を含むリンパ腫、毛様細胞性白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含む白血病、肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、並びにAIDSの場合のカポジ肉腫を含む、免疫欠陥に続いて現れる腫瘍を含む。

【0132】

前記感染症は、慢性B及びC型肝炎及びHIV/AIDSを含むウイルス感染、感染性肺炎、並びに、例えば陰部疣贅を含む性病を含む。

前記の免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気は、組織又は臓器移植片の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、並びに潰瘍性大腸炎を含む。

40

【0133】

前記代謝系の病気は、肥満症のような免疫に関係しない病気を含む。

前記中枢神経系の病気は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含む。

【0134】

前記の病気及び障害は、外傷の治癒、透析患者の貧血及び骨粗鬆症をも含む。

当該方法は、患者における本発明によるSNPによってコードされた変異型対立遺伝子の存在と関連する病気又はその病気への耐性に対する遺伝子診断をも可能にする。

50

好ましくは、ステップa)において、例えば先に定義したコーディングSNPの少なくとも1つを含むポリヌクレオチドの存在又は不存在が検出されるはずである。

【0135】

前記ポリヌクレオチドの検出は、検討すべき患者からの生物学的サンプル、例えば細胞、血液、尿、唾液から、あるいは検討すべき患者の生検又は検死解剖から開始して実行される。例えば、ゲノムDNAは、検出のために直接的に又はPCR増幅後に使用されうる。同様に、RNA又はcDNAも類似した方法で使用されうる。

【0136】

次に、本発明によるポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、患者のゲノムで検出されたヌクレオチド配列と比較することが可能である。

ヌクレオチド配列の比較は、配列決定、DNAハイブリダイゼーション法、変性剤あり又はなしでの電気泳動ゲル上DNA断片の移動度の相違、あるいは融解温度の相違により実行することができる。Myers et al, Science (1985) 230: 1242を参照のこと。同様に、明確な位置でのヌクレオチド配列の構造のそのような変更は、ヌクレアーゼ・プロテクション試験、例えばRNaseとS1ヌクレアーゼにより、あるいは化学的切断剤によっても明らかにされることができる。Cotton et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397 - 4401を参照のこと。同様に、本発明のポリヌクレオチド断片を含むオリゴヌクレオチド・プローブは、スクリーニングを行うために使用することができる。

【0137】

当業者に周知の多くの方法が、本発明のポリヌクレオチドの発現を測定するために、そして当該ポリヌクレオチドの遺伝子の変異性の同定のために使用されることができる (Chee et al., Science(1996), Vol 274, pp610 - 613を参照のこと)。

【0138】

ステップb)において、ポリヌクレオチドの発現レベルは、当業者に周知の方法、例えばPCR、RT-PCR、RNaseプロテクション、ノーザンブロット及び他のハイブリダイゼーション法に従って、ポリヌクレオチドによってコードされた(そしてポリペプチドをコードする)RNAレベルを定量することにより計測されうる。

【0139】

ステップc)及びd)において、患者又は患者由来のサンプル中の本発明によるポリペプチドの存在又は不存在は、周知の方法、例えばラジオイムノアッセイ、拮抗結合試験、ウェスタンブロット及びELISA試験により実行されうる。

ステップd)に続いて、本発明によるポリペプチドの測定された濃度は、患者で通常見られている天然の野生型タンパク質濃度と比較されるかもしれない。

【0140】

当業者は、先行技術刊行物の助けを借りるか又は慣例の試験若しくはアッセイ、例えば先に触れた方法により、先に示された感受性又は、反対に、病気、軽い病気若しくは障害に対する耐性を確認できる、閾値超又は未満を確認することができる。

【0141】

ステップe)において、本発明によるポリペプチドの機能性の測定は、当業者に周知の方法、例えば先に触れたインビトロ検査によるか、又は上記ポリペプチドを発現する宿主細胞の使用により実行されうる。

【0142】

治療用化合物及び病気の治療

本発明は、その目的のために、活性な作用物質として本発明によるポリペプチドを含む治療用化合物をも有する。

【0143】

本発明は、様々なヒトの障害及び/又は病気の予防又は治療を対象とした、治療用化合物の製造のための本発明によるポリペプチドの使用にも関する。これらの病気は、障害及び/又はヒトの病気、例えば癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連する病気及び/又は自己免疫疾患及び障害、心血管系の病気、代謝系の病気、中枢神経系の病気、並びに化学療法

10

20

30

40

50

治療に関係した障害であるかもしれない。

【0144】

前記癌及び腫瘍は、転移性腎癌を含む癌腫、メラノーマ、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞型リンパ腫を含むリンパ腫、毛様細胞性白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含む白血病、肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、並びにAIDSの場合のカポジ肉腫を含む、免疫欠陥に続いて現れる腫瘍を含む。

【0145】

前記感染症は、慢性B及びC型肝炎及びHIV/AIDSを含むウイルス感染、感染性肺炎、並びに、例えば陰部疣贅を含む性病を含む。

【0146】

前記の免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気は、組織又は臓器移植片の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、並びに潰瘍性大腸炎を含む。

前記代謝系の病気は、肥満症のような免疫に関係しない病気を含む。

前記中枢神経系の病気は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含む。

【0147】

前記の病気及び障害は、外傷の治療、透析患者の貧血及び骨粗鬆症をも含む。

好ましくは、本発明によるポリペプチドは、様々なヒトの障害及び/又は病気、例えば慢性B及びC型肝炎のような特定のウイルス感染症、毛様細胞性白血病及び慢性骨髄性白血病のような白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド腫瘍、悪性黒色腫、転移性腎癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、並びにAIDSの場合に免疫欠陥に続いて現れる腫瘍、例えばカポジ肉腫、そして陰部疣贅又は性病の予防又は治療を対象とした治療用化合物の製造のために使用することもできる。

【0148】

本発明によるポリペプチドを得ることを可能にする特定の化合物、並びに当該ポリペプチドから得られる又はそれにより同定される化合物は、同じく、すなわち治療用化合物として、人体の治療のための処置に使用することができる。

【0149】

こういうわけで、本発明は、目的のために、活性作用物質として先に定義されたコーディングSNPの少なくとも1つを含む本発明によるポリヌクレオチド、先に定義された組み換えベクター、先に定義された宿主細胞、及び/又は先に定義された抗体を含む薬剤をも有する。

【0150】

本発明は、様々なヒトの障害及び/又は病気の予防又は治療を対象とした薬剤の製造のための、先に定義されたコーディングSNPの少なくとも1つを含む本発明によるポリヌクレオチド、先に定義された組み換えベクター、先に定義された宿主細胞、及び/又は先に定義された抗体の使用にも関する。これらの病気は、障害及び/又はヒトの病気、例えば癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連する病気及び/又は自己免疫疾患及び障害、心血管系の病気、代謝系の病気、中枢神経系の病気、並びに化学療法治療に関係した障害であるかもしれない。

【0151】

前記癌及び腫瘍は、転移性腎癌を含む癌腫、メラノーマ、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞型リンパ腫を含むリンパ腫、毛様細胞性白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含む白血病、肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、並びにAIDSの場合のカポジ肉腫を含む、免疫欠陥に続いて現れる腫瘍を含む。

【0152】

前記感染症は、慢性B及びC型肝炎及びHIV/AIDSを含むウイルス感染、感染性肺炎、並びに、例えば陰部疣贅を含む性病を含む。

前記の免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気は、組織又は臓器移植片の拒絶、アレルギー

10

20

30

40

50

ギー、喘息、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、並びに潰瘍性大腸炎を含む。

【0153】

前記代謝系の病気は、肥満症のような免疫に関係しない病気を含む。

前記中枢神経系の病気は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含む。

【0154】

前記の病気及び障害は、外傷の治癒、透析患者の貧血及び骨粗鬆症をも含む。

好ましくは、本発明は、様々なヒトの障害及び/又は病気、例えば慢性B及びC型肝炎のような特定のウイルス感染症、毛様細胞性白血病及び慢性骨髄性白血病のような白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド腫瘍、悪性黒色腫、転移性腎癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、並びにAIDSの場合に免疫欠陥に続いて現れる腫瘍、例えばカボジ肉腫、そして陰部疣贅又は性病の予防又は治療を対象とした薬剤の製造のための、先に定義されたコーディングSNPの少なくとも1つを含む本発明によるポリヌクレオチド、先に定義された組み換えベクター、先に定義された宿主細胞、及び/又は先に定義された抗体の使用に関係する。

10

【0155】

活性な作用物質として有用な、本発明のポリペプチド及び他の化合物の投与量は、化合物の選択、治療のための適応、投与方式、製剤の性質、患者の性質及び医者判断に依存する。

20

【0156】

活性な作用物質として使用される時、本発明によるポリペプチドは、一般に1~100 µg/kg患者の範囲の服用量で投与される。

【0157】

本発明は、目的として、活性な作用物質として、先に触れた化合物、例えば本発明によるポリペプチド、先に定義されたSNPの少なくとも1つを含む本発明によるポリヌクレオチド、先に定義された組み換えベクター、先に定義された宿主細胞、及び/又は先に定義された抗体の少なくとも1つ、並びに医薬として許容される賦形剤を含む医薬組成物をも有する。

【0158】

これらの医薬組成物において、活性な作用物質は、有利には生理学的に有効な服用量で存在する。

30

【0159】

これらの医薬組成物は、例えば固体又は液体でありことができ、そしてヒトの薬剤に現在使用されている医薬形態、例えば単純な又は表面を覆われている錠剤、ゲルカプセル、顆粒剤、カラメル、坐剤、及び、好ましくは注射可能な製剤及び注射可能な粉末であることができる。これらの医薬形態は、通常の方法に従って調製されることができる。

【0160】

活性な作用物質は、通常医薬組成物に使用される賦形剤、例えば滑石、アラビアゴム、ラクトース、スターチ、デキストロース、グリセロール、エタノール、ステアリン酸マグネシウム、ココアバター、水性又は非水性溶媒、動物又は野菜起源の脂肪質物質、パラフィン系誘導体、グリコール、様々な湿潤剤、分散剤又は乳化剤、保存剤に組み込むことができる。

40

【0161】

本発明による活性な作用物質は、単独で、あるいは、例えば治療用化合物、例えば他のサイトカイン、例えばインターロイキン又はインターフェロンのような他の化合物との組み合わせ物として使用することができる。

【0162】

医薬組成物の様々な製剤が、投与の方式に従って適合させられる。

医薬組成物は、当業者に知られる様々な投与経路によって投与される。

50

同様に、本発明は、目的のために、活性な作用物質として、先に触れた化合物、例えば本発明によるポリヌクレオチド、本発明によるポリペプチドの全体又は一部、先に定義された組み換えベクター、先に定義された宿主細胞、及び/又は先に定義された抗体の少なくとも1つ、並びに好適な医薬として許容される賦形剤を含む診断用組成物を有する。

【0163】

当該診断用組成物は、例えば診断用組成物で一般に使用されるもの、例えば緩衝剤及び保存剤のような好適な賦形剤を含むかもしれない。

【0164】

同様に、本発明は、目的のために、患者における本発明によるポリペプチドの発現又は活性の増加を意図した治療用化合物を調製するための、以下の：

10

- a) 治療として有効な量の本発明によるポリペプチド、及び/又は
- b) 本発明によるポリヌクレオチド、及び/又は
- c) 先に定義された治療すべき患者からの宿主細胞、

の使用を有する。

よって、本発明のポリペプチドの発現又は活性の増加を必要としている患者を治療するために、いくつかの方法が可能である。

【0165】

医薬として許容される賦形剤と一緒に、本発明のポリペプチドの治療としての有効量を患者に投与することが可能である。

【0166】

20

患者への本発明によるポリヌクレオチドの投与によって、本発明のポリペプチドの内性産生を増やすことが同様に可能である。例えば、このポリヌクレオチドは、レトロウイルス発現ベクターに挿入することができる。形質導入された細胞が着目の遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する方法により、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルス・プラスミドベクターに感染した細胞から開始され、そのようなベクターを単離されることができる。Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996)を参照のこと。

【0167】

本発明において、好ましくは、例えば先に定義されたコーディングSNPの少なくとも1つを含むポリヌクレオチドが使用される。

30

【0168】

あらかじめ採取され、そして先に記載される本発明によるポリペプチドを発現するために修飾された、彼に帰属するこれらの宿主細胞を、患者に投与することが同様に可能である。

【0169】

同様に、本発明は、目的のために、患者における本発明によるポリペプチドの発現又は活性の減少を意図した治療用化合物を調製するための、以下の：

- a) 治療として有効量の先に定義された免疫特異的抗体、及び/又は
- b) 本発明によるポリペプチドの発現の抑制を可能にするポリヌクレオチド、の使用に関する。

40

【0170】

このように、あるいは医薬として許容される賦形剤との組み合わせ物として、治療として有効量の抑制作用物質及び/又は例えば先に定義された抗体を患者に投与することが可能である。

【0171】

同様に、患者への、本発明のポリヌクレオチドの発現を抑制することができる本発明による相補的なポリヌクレオチドの投与によって、本発明のポリペプチドの内性産生を減少させることが可能である。

【0172】

50

好ましくは、例えば先に定義されたコーディングSNPの少なくとも1つを含む相補的なポリヌクレオチドを使用することができる。

【0173】

本発明は、患者の予防又は治療向けの薬剤の製造のためのIFN - 21タンパク質の使用にも関係し、上記患者は、上記患者のゲノム中の、ヌクレオチド配列、配列番号1と少なくとも95%の同一性(好ましくは、97%の同一性、より好ましくは99%の同一性、そして特に100%の同一性)をもち、以下のSNPs: c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204g、t1265c、t1277cの1つを含む上記ヌクレオチド配列を提供するヌクレオチド配列の存在に結び付いたIFN - 21変異型によって引き起こされた障害又は病気を患っている。

【0174】

好ましくは、前記薬剤は、癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連する病気及び/又は自己免疫疾患及び障害、心血管系の病気、代謝系の病気、中枢神経系の病気、並びに化学療法治療に関係した障害から成る群から選ばれる病気の1つを予防又は治療するために使用される。

【0175】

前記癌及び腫瘍は、転移性腎癌を含む癌腫、メラノーマ、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞型リンパ腫を含むリンパ腫、毛様細胞性白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含む白血病、肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、並びにAIDSの場合のカポジ肉腫を含む、免疫欠陥に続いて現れる腫瘍を含む。

【0176】

前記感染症は、慢性B及びC型肝炎及びHIV/AIDSを含むウイルス感染、感染性肺炎、並びに、例えば陰部疣贅を含む性病を含む。

【0177】

前記の免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気は、組織又は臓器移植片の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、並びに潰瘍性大腸炎を含む。

【0178】

前記代謝系の病気は、肥満症のような免疫に関係しない病気を含む。

前記中枢神経系の病気は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含む。

前記の病気及び障害は、外傷の治癒、透析患者の貧血及び骨粗鬆症をも含む。

【0179】

本発明のSNPsを含む、IFN - 21ポリペプチドの模倣化合物

本発明は、以下のポリペプチド:

a) アミノ酸配列、配列番号2、又は

b) アミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間には包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配列;

のそれと実質的に類似した生物活性をもつ新しい化合物とも関係する、

ただし、a)及びb)下のアミノ酸配列はSNP K179Eを含む。

前記生物活性は、実験の項に記載されるとおり、例えば樹状細胞成熟を刺激する能力、CD4+又はCD8+ Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、インビトロ又はインビボにおける抗ウイルス活性、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性、TF-1細胞系に対する細胞抗増殖性活性を計測することによって評価される。

【0180】

実験の項で触れられるように、K179E変異IFN - 21は、以下の点:

- ・ K179E変異IFN - 21は、樹状細胞成熟を刺激するより高い能力を有する;
- ・ K179E変異IFN - 21は、CD4+又はCD8+ Tリンパ球によるIFN - ガンマ放出を刺激するより高い能力を有する;
- ・ K179E変異IFN - 21は、野生型IFN - 2のそれより低い、VSVに感染した細胞培養における抗ウイルス活性を有する、

10

20

30

40

50

で野生型 IFN - 2と異なる。

実験の項で触れられるとおり、K179E変異 IFN - 21は、天然の野生型 IFN - 21のそれよりわずかに低い、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性を有する。

【0181】

同様に実験の項で触れられるとおり、K179E変異 IFN - 21は、野生型 IFN - 2のそれと類似した TF - 1細胞系に対する細胞抗増殖性活性を有し、そして野生型 IFN - 2のそれと類似した EMCVマウス・モデルの抗ウイルス活性を有する。

例えば先に定義されるような本発明の新しい化合物は、K179E変異 IFN - 21のそれと実質的に類似した生物活性を有する。

【0182】

前記化合物は、検討された生物活性の種類に従い、K179E変異 IFN - 21のそれより低いか又は高くても生物活性を有するかもしれない。

例えば、前記化合物は、生化学的化合物、例えばポリペプチド又はペプチド、例えば有機化合物、例えば合成ペプチド模倣体であるかもしれない。

本発明は、先に定義されている化合物の同定のための、K179E SNPを含む本発明のポリペプチドの使用にも関係する。

【0183】

本発明は、以下のステップ：

a) 例えば、試験すべき化合物の生物活性、例えば樹状細胞の成熟、CD4+ 又は CD8+ Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、インビトロ又はインビボにおける抗ウイルス活性、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性を測定し、

b) 以下の：

i) 試験すべき化合物のステップ a) で測定された活性、と

ii) アミノ酸配列、配列番号2又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列のポリペプチドの活性；

ただし、上記アミノ酸配列はK179E SNPを含む；

を比較し、そして

c) ステップ b) で実行された比較を基礎として、試験すべき化合物が、アミノ酸配列、配列番号2のポリペプチド又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列のそれと比較して実質的に類似しているか、又は高い若しくは低い活性を有するかどうかを決定する；

ただし、上記アミノ酸配列はK179E SNPを含む、

を含む本発明の化合物の同定方法にも関係する。

【0184】

好ましくは、試験すべき化合物は、アミノ酸配列、配列番号2のポリペプチド、又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列のそれと同じ3次元構造をもつように、合成ペプチド・コンビナトリアル・ライブラリー、高性能スクリーニングから前もって同定されるか、あるいはコンピューターを用いたドラッグデザインによって設計される；ただし、上記アミノ酸配列はK179E SNPを含む。

【0185】

本発明は、以下のポリペプチド：

a) アミノ酸配列、配列番号2、又は

b) アミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に含まれるアミノ酸を含むアミノ酸配列；

のそれと実質的に類似した生物活性をもつ新しい化合物とも関係する、

ただし、a) 及び b) 下のアミノ酸配列は SNP Q114H 及び V127D を含む。

前記生物活性は、実験の項に記載されるとおり、例えば樹状細胞成熟を刺激する能力、CD4+ 又は CD8+ Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、インビトロ又はインビボにおける抗ウイルス活性、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性、TF - 1細胞系に対する細胞抗増殖性活性を計測することによって評価されうる。

10

20

30

40

50

【0186】

実験の項で触れられるように、SNPs Q114H及びV127Dの両者を含むIFN - 21(この二重変異を以降「Q114H/V127D」と呼ぶ)は、以下の点：

- ・ Q114H/V127D変異IFN - 21は、CD4+ 又はCD8+ Tリンパ球によるIFN - ガンマ放出を刺激するより高い能力を有する；
- ・ Q114H/V127D変異IFN - 21は、VSVに感染した細胞培養におけるより低い抗ウイルス活性を有する、
で野生型IFN - 2と異なる。

【0187】

実験の項で触れられるとおり、Q114H/V127D変異IFN - 21は、天然の野生型IFN - 21のそれよりも低い、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性を有する。同様に実験の項で触れられるとおり、Q114H/V127D変異IFN - 21は、野生型IFN - 2のそれと類似したEMCVマウス・モデルの抗ウイルス活性、野生型IFN - 2のそれと類似したIL - 10、IL - 12及びTNF - 放出を刺激する能力、並びに野生型IFN - 2のそれと類似したTF - 1細胞系に対する細胞抗増殖性活性を有する。

例えば先に定義されるような本発明の新しい化合物は、Q114H/V127D変異IFN - 21のそれと実質的に類似した生物活性を有する。

【0188】

前記化合物は、検討された生物活性の種類に従い、Q114H/V127D変異IFN - 21のそれより低いか又は高くても生物活性を有するかもしれない。

例えば、前記化合物は、生化学的化合物、例えばポリペプチド又はペプチド、例えば有機化合物、例えば合成ペプチド模倣体であるかもしれない。

本発明は、先に定義されている化合物の同定のための、Q114H/V127D SNPを含む本発明のポリペプチドの使用にも関係する。

【0189】

本発明は、以下のステップ：

a) 例えば、生物活性、例えば樹状細胞の成熟、CD4+ 又はCD8+ Tリンパ球によるサイトカイン放出、単球によるサイトカイン放出、インピトロ又はインピボにおける抗ウイルス活性、Daudiパーキット細胞系に対する細胞抗増殖性活性を測定し、

b) 以下の：

i) 試験すべき化合物のステップa)で測定された活性、と

ii) アミノ酸配列、配列番号2又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配列のポリペプチドの活性；

ただし、上記アミノ酸配列はQ114H/V127D SNPを含む；

を比較し、そして

c) ステップb)で実行された比較を基礎として、試験すべき化合物が、アミノ酸配列、配列番号2のポリペプチド又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配列のそれと比較して実質的に類似しているか、又は高い若しくは低い活性を有するかどうかを決定する；

ただし、上記アミノ酸配列はQ114H/V127D SNPを含む、

を含む本発明の化合物の同定方法にも関係する。

【0190】

好ましくは、試験すべき化合物は、アミノ酸配列、配列番号2のポリペプチド、又はアミノ酸配列、配列番号2の24位と189位の間に包含されるアミノ酸を含むアミノ酸配列のそれと同じ3次元構造をもつように、合成ペプチド・コンビナトリアル・ライブラリー、高性能スクリーニングから前もって同定されるか、あるいはコンピューターを用いたドラッグデザインによって設計される；ただし、上記アミノ酸配列はQ114H/V127D SNPを含む。

【0191】

化合物を同定及び設計する方法は、当業者に周知である。

これらの方法に言及する刊行物は、例えば以下のものである：

10

20

30

40

50

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

【0192】

- Anderson S and Chiplin J. (2002). "Structural genomics; shaping the future of drug design" Drug Discov. Today. 7(2): 105-107.

【0193】

- Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH. (2002). "The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery". Drug Discov. Today. 7(2): 109-116.

【0194】

- Burbidge R, Trotter M, Buxton B, Holden S. (2001). "Drug design by machine learning: support vector machines for pharmaceutical data analysis". Comput. Chem. 26(1): 5-14. 10

【0195】

- Kauvar L.M. (1996). "Peptide mimetic drugs: a comment on progress and prospects" 14(6): 709.

【0196】

好ましくは、本発明の化合物は、癌及び腫瘍、感染症、性病、免疫に関連する病気及び/又は自己免疫疾患及び障害、心血管系の病気、代謝系の病気、中枢神経系の病気、並びに化学療法治療に関係した障害から成る群から選ばれる病気の1つの予防又は治療を対象とした薬剤の製造のために使用される。 20

【0197】

前記癌及び腫瘍は、転移性腎癌を含む癌腫、メラノーマ、濾胞性リンパ腫及び皮膚T細胞型リンパ腫を含むリンパ腫、毛様細胞性白血病、慢性リンパ球性白血病及び慢性骨髄性白血病を含む白血病、肝臓、頸部、頭部及び腎臓の癌、多発性骨髄腫、カルチノイド腫瘍、並びにAIDSの場合のカポジ肉腫を含む、免疫欠陥に続いて現れる腫瘍を含む。

【0198】

前記感染症は、慢性B及びC型肝炎及びHIV/AIDSを含むウイルス感染、感染性肺炎、並びに、例えば陰部疣贅を含む性病を含む。

【0199】

前記の免疫学的及び自己免疫学的に関連する病気は、組織又は臓器移植片の拒絶、アレルギー、喘息、乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、クローン病、並びに潰瘍性大腸炎を含む。 30

【0200】

前記代謝系の病気は、肥満症のような免疫に関係しない病気を含む。

前記中枢神経系の病気は、アルツハイマー病、パーキンソン病、統合失調症及びうつ病を含む。

【0201】

前記の病気及び障害は、外傷の治癒、透析患者の貧血及び骨粗鬆症をも含む。

本発明の化合物は、例えば慢性B及びC型肝炎のような特定のウイルス感染症、毛様細胞性白血病及び慢性骨髄性白血病のような白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、カルチノイド腫瘍、悪性黒色腫、転移性腎癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、並びにAIDSの場合に免疫欠陥に続いて現れる腫瘍、例えばカポジ肉腫、そして陰部疣贅又は性病から成る群から選ばれる病気の1つの予防又は治療を対象とした薬剤の製造のために使用される。 40

【実施例】

【0202】

実験の項

実施例1. SNP c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gを含むヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチドによってコードされたタンパク質、及び野生型基準遺伝子のヌクレオチド配列によってコードされたタンパク質のモデリング

【0203】

最初のステップにおいて、その構造体がPDBデータベース(コード1ITF)で入手可能なIFN - 2のそれから開始し、そしてソフトウェアModeler(MSI, San Diego, CA)を使用することによって、IFN - 21の3次元構造を構築した。

【0204】

次に、成熟ポリペプチド断片を、変異A19G、Q79K、Q91H、V104D、C139stop及びK156Eを再現するようなやり方で修飾した。

プログラムAMBER及びDISCOVER(MSI: Molecular Simulations 社)を使用することによってこの変異断片に対して1000分子の最小化ステップを行った。

2分子の動力的計算の実行を同じプログラム及び同じ力場を用いて実行した。

各々のケースにおいて、50,000のステップを300 °Kで計算し、そして300の平衡ステップで終わらせた。

このモデリングの結果を図1、2、3、4及び5に表す。

【0205】

実施例2. 個体集団内のSNPs c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gの遺伝子型解析

SNPsの遺伝子型解析は、産物を蛍光偏光の読み取りによって検出するミニ配列決定の原理に基づく。この技術は、蛍光性ミニ配列決定(FP-TDI Technology又はFluorescence Polarization Template-direct Dye-terminator Incorporation)から成る。

【0206】

ミニ配列決定を、集団の各々の個体のゲノムDNAからPCRによって増幅された産物に対して実施する。このPCR産物を、それが遺伝子型解析すべきSNPを含む遺伝子領域を網羅するようなやり方で選ぶ。使用されなかったPCRプライマー及び取り込まれなかったdNTPsの除去後に、ミニ配列決定を実行する。

【0207】

ミニ配列決定は、ポリメラーゼ酵素及び蛍光標識ジデオキシヌクレオチドを使用することによって、SNP部位のすぐ上流に配置されたオリゴヌクレオチド・プライマーを伸長することから成る。この伸長過程から得られた産物を、蛍光偏光の読み取りによって直接的に分析する。

【0208】

これらのステップの全て、並びに読み取りは、同じPCRプレート内で実行される。

このように、遺伝子型解析は、以下の5ステップ:

- 1)PCRによる増幅
- 2)酸素の消化によるPCR産物の精製
- 3)オリゴヌクレオチド・プライマーの伸長
- 4)読み取り
- 5)読み取りの解釈

を必要とする。

遺伝子型解析のステップ1及び2を、SNPs c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gの各々について同じ条件で実行する。ステップ3、4及び5は、これらの多型の各々に特有である。

【0209】

1)IFN - 21遺伝子のヌクレオチド配列のPCR増幅を、民族的に様々な出身の268個体由来のゲノムDNAから開始し実行される。

これらのゲノムDNAは、アメリカ合衆国のCoriell Instituteによって提供された。

268の個体は、以下のとおり分類される:

【0210】

【表1】

10

20

30

40

系統学的集団	民族集団	合計	%
アフリカ系アメリカ人	アフリカ系アメリカ人	50	100.0
	小計	50	18.7
アメリカインディアン	南アメリカ・アンデス	10	66.7
	南西アメリカ・インディアン	5	33.3
	小計	15	5.6
カリブ人	カリブ人	10	100.0
	小計	10	3.7
ヨーロッパ系白人	北アメリカ系白人	79	79.8
	イベリア人	10	10.1
	イタリア人	10	10.1
	小計	99	36.9
メキシコ人	メキシコ人	10	100.0
	小計	10	3.7
北東アジア人	中国人	10	50.0
	日本人	10	50.0
	小計	20	7.5
非ヨーロッパ系白人	ギリシャ人	8	21.6
	インドーパキスタン人	9	24.3
	中東人	20	54.1
	小計	37	13.8
東南アジア人	太平洋諸島系の人	7	41.2
	南アジア人	10	58.8
	小計	17	6.3
南アメリカ人	南アメリカ人	10	100.0
	小計	10	3.7
合計		268	100

10

20

30

40

50

【0211】

これらの個体の各々から生じるゲノムDNAがサンプルを構成する。

全てのSNPsについて、以下のプライマーから開始して、PCR増幅を実行する：

配列番号5：センス・プライマー：GGTTCAAGGTTACCCATCTC

配列番号6：アンチセンス・プライマー：TTTGAAATGGCAGAAGTCAT

これらのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列、配列番号1の第620ヌクレオチドから第1315ヌクレオチドまでの696ヌクレオチドの長さの断片の増幅をもたらす。

【0212】

各々のSNPについて、前記PCR産物が、ミニ配列決定のための鋳型の役割をする。

PCR反応の総反応量は、1点のサンプルにつき5 μ lである。

この反応量は、以下の表に示された試薬から構成される：

【 0 2 1 3 】

【表 2】

供給業者	参照事項	反応物	初期濃度	試験管あたりの容量 (μl)	終濃度
Life Technology	Taqと共に供給される	バッファー (X)	10	0.5	1
Life Technology	Taqと共に供給される	MgSO ₄ (mM)	50	0.2	2
AP Biotech	27-2035-03	dNTPs (mM)	10	0.1	0.2
	必要に応じて	センス・プライマー (μM)	10	0.1	0.2
	必要に応じて	アンチセンス・プライマー (μM)	10	0.1	0.2
Life Technology	11304-029	プラチナTaq	5U/μl	0.02	0.1U/反応
		H ₂ O	5μlに適量	1.98	
		DNA (サンプル)	2.5ng/μl	2	5ng/反応
		総容量		5μl	

【 0 2 1 4 】

これらの試薬を、ABGene製の384ウェルをもつ黒いPCRプレート(ref: TF - 0384 - k)中に分配する。このプレートを、シールし、遠心分離し、次に384ウェルプレートをサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)に配置し、そして以下のインキュベーション：PCRサイクル：94 で1分、続いて3ステップ(94 で15秒、56 で30秒、68 で1分)から成るサイクルを36サイクル、を受ける。

【 0 2 1 5 】

2)次に、PCR増幅産物を、2つの酵素：エビ・アルカリホスファターゼ(SAP)及びエキソヌクレアーゼI(Exo I) を使って精製す。これらの酵素の最初のもは、PCR増幅中に取り込まれなかったdNTPsの脱リン酸化をもたらすのに対し、2番目のものは、1本鎖DNA残基、特にPCR中に使用されなかったプライマーを除去する。

この消化を、PCRプレートの各々のウェルにサンプルにつき5 μlの反応混合物を加えることよって行う。この反応混合物は、以下の試薬から構成される：

【 0 2 1 6 】

【表 3】

供給業者	参照事項	反応物	初期濃度	試験管あたりの容量 (μ l)	終濃度
AP Biotech	E70092X	SAP	1U/ μ l	0.5	0.5/反応
AP Biotech	070073Z	Exo I	10U/ μ l	0.1	1/反応
AP Biotech	SAPと共に供給される	バッファ-SAP (X)	10	0.5	1
		H ₂ O	5 μ lに適量	3.9	
		PCR産物		5 μ l	
		総容量		10 μ l	

10

【0217】

添加後、プレートをシールし、遠心分離し、次に384ウェルプレートをサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)に配置し、以下のインキュベーション：消化SAP - EX0：37 で45分、80 で15分、を受ける。

20

【0218】

次に、準備されたサンプルにつき5 μ lの反応混合物の添加によって消化されたPCR産物による、伸長又はミニ配列決定ステップを実行する。

ミニ配列決定3)、及び読み取りステップ4)、及び読み取りの解釈5)は、SNP c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gの各々に特有である。

これらのステップの全てを、これらの多型の各々のために使用した特有の条件を要約して以下に説明する。

【0219】

3)ミニ配列決定(Minisequencing)

遺伝子型解析に必要な2つのミニ配列決定プライマーの配列を、本発明によるSNP部位の上流に位置するヌクレオチド配列に相当するという手段により決定する。従って、2本鎖DNA産物である、SNPを含むPCR産物をの遺伝子型解析は、センス鎖又はアンチセンス鎖において行われる。選ばれたプライマーは、Life Technologies社により製造される。

30

【0220】

以下の表は、各々のSNPに関する、検討したミニ配列決定プライマーの配列、及び遺伝子型解析のために維持された最適条件を示す：

【0221】

【表4】

SNP	試験したプライマー	遺伝子型解析のための最適条件
c794g	配列番号7 : センス : gagggccttgatactcctgg 配列番号8 : アンチセンス : gagagattcttcccatttgt	アンチセンス・プライマー+ ddGTP-R110+ddCTP-Tamra
c973a	配列番号9 : センス : actcatctgctaactgggaa 配列番号10 : アンチセンス : aaattttcttaggaggctct	アンチセンス・プライマー+ dGTP-R110+ddTTP-Tamra
g1011c	配列番号11 : センス : ttttccactgaacttaacca 配列番号12 : アンチセンス : gcttcagggtcattcagctg	アンチセンス・プライマー+ ddGTP-R110+ddCTP-Tamra
t1049c	配列番号13 : センス : agcctgcgtgatacaggagg 配列番号14 : アンチセンス : ggggagtccttccaccca	アンチセンス・プライマー+ ddATP-R110+ddTTP-Tamra
t1155a	配列番号15 : センス : gagaagaaatacagcccttg 配列番号16 : アンチセンス : gctctgacaacctcccaggc	アンチセンス・プライマー+ ddATP-R110+ddTTP-Tamra
a1204g	配列番号17 : センス : tgagatccttctctttatca 配列番号18 : アンチセンス : taatcttcttgaaaaattt	センス・プライマー+ ddGTP-R110+ddATP-Tamra

10

20

【 0 2 2 2 】

最初に、SNPsのミニ配列決定は、16サンプルに関する正当性を立証し、その後の個体集団のセットに関する遺伝子型解析は268の個体及び10の対照から構成された。

次に、以下の表に示されるように、伸長又はミニ配列決定ステップを実行する：

【 0 2 2 3 】

【 表 5 】

供給業者	参照事項	反応物	初期濃度	試験管あたりの容量 (μ l)	終濃度
自ら調製		伸長バッファー ¹ (X)	5	1	1
Life Technologies	必要に応じて	Miniseqプライマー (μ M) A又はB	10	0.5	1
AP Biotech	27-2051 (61, 71, 81)-01	ddNTPs ² (μ M) 2は無標識	各2.5	0.25	各0.125
NEN	NeI 472/5 及びNeI 492/5	ddNTPs ² (μ M) 2はTamra及び R110により標識	各2.5	0.25	各0.125
AP Biotech	E79000Z	Thermo-配列	3.2U/ μ l	0.125	0.4U/反応
		H ₂ O	5 μ lに適量	3.125	
		消化したPCR産物		10	
		総容量		15	

¹ 5×伸長バッファーは、250 mMのTris-HCl pH9、250 mMのKCl、25 mMのNaCl、10mMのMgCl₂及び40%のグリセロールから構成される。

² ddNTPsについて、4塩基の混合物は、試験された多相性に従って実行される。機能性SNPを構成する着目の2つの塩基(野生型ヌクレオチド/変異ヌクレオチド)だけが、Tamra又はR110により標識される。例えば：
SNP c973aについて、ddNTPsの混合物は、以下の：

- 2.5 μ Mの無標識 ddCTP、
 - 2.5 μ Mの無標識 ddATP、
 - 2.5 μ Mの ddTTP (1.875 μ Mの無標識 ddTTP 及び 0.625 μ Mの Tamra 標識 ddTTP)、
 - 2.5 μ Mの ddGTP (1.875 μ Mの無標識 ddGTP 及び 0.625 μ Mの R110 標識 ddGTP)、
- から構成される。

【0224】

添加後、プレートにシールし、遠心分離し、次に384ウェルプレートにサーモサイクラー(MJ ResearchのTetrad)に配置し、以下のインキュベーション：伸長サイクル：93 で1分、続く2ステップ(93 で10秒、55 で30秒)から成るサイクルを35サイクル、を受ける。

【0225】

サーモサイクラーの最後のステップ後に、LJL Biosystems社製のAnalyst(登録商標)HT型の蛍光偏光リーダー上に、このプレートを直接置く。2つの方法を使用することによってCriterion Host(登録商標)ソフトウェアを使ってプレートを読み取る。最初のものは、このフルオロフォア(励起550 - 10nm、発光580 - 10nm)に特有の発光及び励起フィルターを使用することによってTamra標識塩基の読み取りを可能にし、そして第2のものは、このフルオロフォア(励起490 - 10nm、発光520 - 10nm)に特有の励起及び発光フィルターを使用することによってR110標識塩基の読み取りを可能にする。2つの場合において、二色性ダブル・ミラー(R110/Tamra)が使用されて、他の読み取りパラメーターは以下のとおりである：

【0226】

Z - 高：1.5 mm

10

20

30

40

50

アテニュエーター：アウト

積分時間：100,000 μ sec.

未加工データ単位：カウント/秒

スイッチ偏光：ウェル単位

プレート修正時間：0 msec.

PMT設定：Smart Read(+)、感度2

動的偏光子：発光

静的偏光子：S

【0227】

このように、Tamraフィルター及びR110フィルターに関するmP(ミリ偏光)の計算値を含む
ファイル結果を得る。これらのmP値を、以下の公式：

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

に従い、平行面(//)及び垂直面()において得られた強度値から開始して計算する。

この計算において、値 は、因子gによって加重される。あらかじめ実験的に測定されなければならぬ設備パラメーターである。

【0228】

4)及び5)読み取りの解釈及び遺伝子型の決定。

mP値を、マイクロソフト社のExcelソフトウェア及び/又はLJL Biosystems社によって開発されたAllele Caller(登録商標)ソフトウェアを使ってグラフにより報告する。

【0229】

横軸によりTamra標識塩基のmP値を示し、縦軸によりR110標識塩基のmP値を示す。強いmP値は、このフルオロフォアにより標識された塩基が組み込まれていることを示して、逆に、弱いmP値は、この塩基の取り込みの不存在を明らかにする。

【0230】

異なる遺伝子型を有する3つまでの同構造群のヌクレオチド配列が得られる。

Allele Caller(登録商標)ソフトウェアの使用は、表の形式に各々の個体について定義された遺伝子型を直接抽出するために、一旦、様々な群の同定を実行することを可能にする。

【0231】

SNPs c794g、c973a、g1011c、t1049a、t1155a、a1204gについてのミニ配列決定の結果

遺伝子型解析過程の完了後に、ここで検討されたSNPsについて個体集団からの個体の遺伝子型の決定を、先に記載のグラフを使って実行した。

【0232】

SNP c794gについて、検討された個体において、遺伝子型は、理論上はホモ接合体CC、又はヘテロ接合体CG、又はホモ接合体GGのいずれかである。実際には、また以下に示すとおり、ホモ接合体遺伝子型GGは個体集団内で検出されない。

【0233】

SNP c973aについて、検討された個体において、遺伝子型は、理論上はホモ接合体CC、又はヘテロ接合体CA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、また以下に示すとおり、ホモ接合体遺伝子型AAは個体集団内で検出されない。

【0234】

SNP g1011cについて、検討された個体において、遺伝子型は、理論上はホモ接合体GG、又はヘテロ接合体GC、又はホモ接合体CCのいずれかである。実際には、また以下に示すとおり、ホモ接合体遺伝子型CCは個体集団内で検出されない。

【0235】

SNP t1049aについて、検討された個体において、遺伝子型は、理論上はホモ接合体TT、又はヘテロ接合体TA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、また以下に示すとおり、ホモ接合体遺伝子型AAは個体集団内で検出されない。

【0236】

SNP t1155aについて、検討された個体において、遺伝子型は、理論上はホモ接合体TT、又は

10

20

30

40

50

ヘテロ接合体TA、又はホモ接合体AAのいずれかである。実際には、また以下に示すとおり、ホモ接合体遺伝子型AAは個体集団内で検出されない。

【0237】

SNP a1204gについて、検討された個体において、遺伝子型は、理論上はホモ接合体AA、又はヘテロ接合体AG、又はホモ接合体GGのいずれかである。実際には、また以下に示すとおり、ホモ接合体遺伝子型GGは個体集団内で検出されない。

【0238】

個体集団内の測定された遺伝子型分布、並びに検討した6つのSNPsについての異なる対立遺伝子頻度の計算の結果を、以下の表に示す：

【0239】

【表6】

系統学的集団	合計	c794g (A42G)							合計
		f	(95% CI)	CC	%	CG	%	GG	
アフリカ系アメリカ人	50	5, 0	(0. 7, 9. 3)	45	90, 0	5	10		50
アメリカインディアン	15			15	100				15
カリブ人	10			10	100				10
ヨーロッパ系白人	99			99	100				99
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系白人	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17	2, 9	(0, 8. 6)	16	94, 1	1	5, 9		17
合計	268	1, 1	(0. 2, 2. 0)	262	97, 8	6	2, 2		268

10

系統学的集団	合計	c973a (Q102K)							合計
		f	(95% CI)	CC	%	CA	%	AA	
アフリカ系アメリカ人	50			49	100				49
アメリカインディアン	15			15	100				15
カリブ人	10			10	100				10
ヨーロッパ系白人	99	1, 5	(0, 3. 2)	96	97, 0	3	3, 0		99
メキシコ人	10			9	100				9
非ヨーロッパ系白人	37	1, 4	(0, 4. 0)	36	97, 3	1	2, 7		37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0, 8	(0, 1. 5)	262	98, 5	4	1, 5		266

20

系統学的集団	合計	g1011c (Q114H)							合計
		f	(95% CI)	GG	%	GC	%	CC	
アフリカ系アメリカ人	50			49	100				49
アメリカインディアン	15			15	100				15
カリブ人	10			10	100				10
ヨーロッパ系白人	99	0, 5	(0, 1. 6)	92	98, 9	1	1, 1		93
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系白人	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0, 2	(0, 0. 6)	260	99, 6	1	0, 4		261

30

40

【 0 2 4 0 】

【 表 7 】

系統学的集団	合計	t1049a (V127D)							合計
		f	(95% CI)	TT	%	TA	%	AA	
アフリカ系アメリカ人	50	1,0	(0, 3.0)	48	98,0	1	2,0		49
アメリカインディアン	15			14	100				14
カリブ人	10			10	100				10
ヨーロッパ系白人	99			98	100				98
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系白人	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	0,2	(0, 0.6)	264	99,6	1	0,4		265

10

系統学的集団	合計	t1155a (C162STOP)							合計
		f	(95% CI)	TT	%	TA	%	AA	
アフリカ系アメリカ人	50	1,0	(0, 3.0)	48	98,0	1	2,0		49
アメリカインディアン	15			15	100				15
カリブ人	10			9	100				9
ヨーロッパ系白人	99	3,6	(1.0, 6.2)	91	92,9	7	7,1		98
メキシコ人	10			10	100				10
非ヨーロッパ系白人	37			37	100				37
北東アジア人	20			20	100				20
南アメリカ人	10			10	100				10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	1,5	(0.5, 2.5)	257	97,0	8	3,0		264

20

系統学的集団	合計	a1204g (K179E)							合計
		f	(95% CI)	AA	%	AG	%	GG	
アフリカ系アメリカ人	50			50	100				50
アメリカインディアン	15	3,6	(0, 10.4)	13	92,9	1	7,1		14
カリブ人	10			10	100				10
ヨーロッパ系白人	99	1,0	(0, 2.4)	97	98,0	2	2,0		99
メキシコ人	10	10,0	(0, 23.1)	8	80,0	2	20,0		10
非ヨーロッパ系白人	37	2,7	(0, 6.4)	35	94,6	2	5,4		37
北東アジア人	20	17,5	(5.7, 29.3)	13	65,0	7	35,0		20
南アメリカ人	10	5,0	(0, 14.6)	9	90,0	1	10,0		10
東南アジア人	17			17	100				17
合計	268	2,8	(1.4, 4.2)	252	94,4	15	5,6		267

30

40

【0241】

前述の表において、

- Nは、個体数を表し、
- %は、特定の小集団の個体の割合を表し、
- 対立遺伝子頻度は、特定の小集団の変異対立遺伝子の割合を表し、
- 95%ICは、信頼度95%の最小及び最大区間を表す。

50

SNP c973aについて、例えばアンチセンス鎖に読み込まれた対立遺伝子gは、センス鎖に読み込まれた対立遺伝子cに対応し、かつ、未熟成型IFN - 21タンパク質配列の102位のグルタミン(Q)の存在に関係する、そしてアンチセンス鎖に読み込まれた対立遺伝子tは、センス鎖に読み込まれた対立遺伝子aに対応し、対応するタンパク質の配列中のこの位置のリジン(K)に相当することを明確にすることが必要である。

【0242】

系統学的集団による、そしてSNPによるこれらの結果を検討することによって、以下のことに気付いた：

【0243】

- SNP c794gについて、6人のヘテロ接合体個体、CGは、小集団、アフリカ系アメリカ人及び東南アジア人の出身である。 10

- SNP c973aについて、4人ヘテロ接合体個体、CAは、小集団、ヨーロッパ系及び非ヨーロッパ系白人の出身である。

- SNP g1011cについて、唯一のヘテロ接合体個体、GCは、小集団、ヨーロッパ系白人の出身である。

【0244】

- SNP t1049aについて、唯一のヘテロ接合体個体、TAは、小集団、アフリカ系アメリカ人の出身である。

- SNP t1155aについて、8人のヘテロ接合体個体、TAは、小集団、アフリカ系アメリカ人及びヨーロッパ系白人の出身である。 20

- SNP a1204gについて、15人のヘテロ接合体個体、AGは、小集団、アメリカインディアン、ヨーロッパ系及び非ヨーロッパ系白人、メキシコ人、北東アジア人、並びに南アメリカ人の出身である。

【0245】

実施例3. 酵母による天然の野生型IFN - 21及びA42G、Q102K、Q114H/V127D、K179E変異IFN - 21の発現

a) 真核生物発現ベクターpPicZ - topo内への天然の野生型IFN - 21及び変異IFN - 21のクローニング

【0246】

天然の野生型IFN - 21及びA42G、Q102K、のQ114H/V127D、K179E変異IFN - 21の成熟部分をコードするヌクレオチド配列を、対応するSNP(s)に関してヘテロ接合体である個体由来のゲノムDNAを鋳型として使用したPCRによって増幅する。 30

【0247】

そのような増幅を可能にするPCRプライマーは以下の：

配列番号19：センス・プライマー：TGTGATCTGCCTCAGACCCAC

配列番号20：アンチセンス・プライマー：TCATTCCTTCCTCCTTAATCTTTCTTG、

である。

PCR産物を、メタノールにより誘導可能なハイブリッド・プロモーターA0X1(TOP0(商標) - cloning; Invitrogen社)の制御下にある真核生物発現ベクターpPicZ - TOP0内に挿入する。 40

【0248】

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

組み換えタンパク質をコードするベクターの領域のヌクレオチド配列の確認後に、このベクターを、Pme1制限酵素によって線状にし、そしてP.パストリス酵母菌株(Invitrogen)をこの組み換え発現ベクターにより形質転換する。

【0249】

b) P.パストリスによる異種発現、そして天然の野生型IFN - 21及び変異IFN - 21タンパク質の精製

【0250】

200回転/分 (rpm)の撈拌、30、24~48時間で、天然の野生型IFN - 21をコードするか、又はA42G、Q102K、Q114H/V127D若しくはK179E変異IFN - 21をコードするクローンを含む50 mLのBMY培地(2%のペプトン、1%の酵母エキス、1.34%のYNB、1%のグリセロール、100 mMのリン酸カリウム、0.4 mg/LのピオチンpH6.0)の2つの飽和状態の前培養を実行した。

【0251】

前記培養物が飽和細胞密度に達したとき(600 nmの波長で計測された吸光度12に相当する)、これを、5 OD/mLで、250 mLのBMY培地(2%のペプトン、1%の酵母エキス、1.34%のYNB、0.5%のメタノール、100 mMのリン酸カリウム、0.4 mg/LのピオチンpH6.0)の接種に使用する。

【0252】

次に、前記タンパク質の発現を、180 rpmで培養フラスコを撈拌しながら、30で24時間、1%の終濃度のメタノールによって誘発する。

【0253】

コード配列の上流、「因子」のシグナルペプチド配列の存在により、タンパク質は、酵母により培地中に分泌される。因子は自然にプロセッシング中に切断される。この懸濁液を遠心分離し、前記タンパク質を、得られた上清から開始するHPLCによって精製する。

開始準備ステップにおいて、透析が続く限外濾過(Labscale、5000 Da排除、Millipore)が、50 mMのTris - Cl pH9.0、25 mMのNaClのバッファー中への前記酵母上清の10倍濃縮を可能にする。

【0254】

最初のクロマトグラフィー・ステップは、ブルー・セファローズ・カラム(Amersham Pharmacia)における親和性によるタンパク質の回収を可能にする。回収した画分中のタンパク質の存在を、一方でSDS-PAGE型電気泳動により、そしてもう一方でIFN - 21タンパク質に対する特異的抗体による免疫検出によって確認する。このステップにおいて、着目のタンパク質の純度は75%より高かった。

【0255】

第2の精製ステップにおいて、ゲル濾過は、50 mMのTris pH9.0、25 mMのNaClに対してIFN - 21タンパク質に相当する回収された画分のバッファー交換を可能にする。

【0256】

精製の最後のステップは、イオン交換クロマトグラフィー・カラムによるタンパク質の分離から成る。

組み換えタンパク質を含む画分を、あらかじめ50 mMのTris pH9、25 mMのNaClバッファーにより平衡化した陰イオン交換カラム(ResourceQ 6.0 mL、Pharmacia)に投入する。タンパク質の溶出を、50 mMのTris pH9バッファー中の0.025~1 MのNaClの濃度勾配の移動によって実行する。

着目のタンパク質の純度をSDS/PAGEゲルにより評価し、このタンパク質の濃度を、濃度測定(Quantity one, Biorad)、及びBCAアッセイ(ピシンコニン酸及び硫酸銅、Sigma)によって計測した。

【0257】

より大量のタンパク質を製造するために最終的にスケールアップされる、このプロトコールに従って得られた、精製された天然の野生型IFN - 21、並びにA42G、Q102K、Q114H/V127D又はK179E変異IFN - 21タンパク質を以下に記載の機能性の試験のために使用する。

【0258】

実施例4. 天然の野生型IFN - 21及びA42G、Q114H/V127D又はK179E変異IFN - 21の免疫調節性活性についての評価

【0259】

IFNsタイプI(IFN 及びIFN)は、免疫系の特定の機能を調節することができる。それらは、樹状細胞(DC)の成熟を増進させる：MHCクラスI(HLA-ABC)及びII(HLA-DR)分子の発現を高める、Tリンパ球、CD80、CD86及びCD83分子の共同刺激に関与する分子の発現を高め

10

20

30

40

50

る、並びにTリンパ球の刺激機能を高めることが証明された。

【0260】

a) 樹状細胞の成熟に対するA42G、Q114H/V127D又はK179E変異IFN α -21の効果
A42G、Q114H/V127D又はK179E変異IFN α -21の免疫調節性を、まず、樹状細胞の成熟において調査し、そして商業的なイントロンA産物の代表として選ばれた野生型IFN α -2のそれと比較した。

【0261】

そのために、まず、樹状細胞を、GM-CSF及びIL-4サイトカインの存在下で培養した成熟型末梢血単球から産生した。CD14+細胞精製キットを使った精製の後に、これらの樹状細胞を、100 ng/mLの野生型IFN α -2、又はA42G、Q114H/V127D若しくはK179E変異IFN α -21の存在下に移し、そしてそれらの表現型を、MHCクラスI及びII分子、並びにCD40、CD80、CD86、CD83及びCD1aマーカーの発現を捜すことを目的とするFACS分析によって測定した。これらの樹状細胞の成熟状態を、無刺激樹状細胞を提供するためにIFN α 処理なしに得られたものとも比較した。

【0262】

各々のマーカー、及び任意の単位で表された3つの実験条件についての蛍光強度の計測値の中央値を以下の表に示す：

【0263】

【表8】

	HLA ABC	HLA DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD1a
刺激なし	64	133	24	25	14	15	26
野生型 IFN α -2	87	281	331	76	45	15	155
A42G変異 IFN α -21	76	127	117	37	5	8	209
Q114H/V127D変異 IFN α -21	68	122	163	46	8	8	191
K179E変異 IFN α -21	181	322	491	87	44	14	127

【0264】

この試験の結果は、K179E変異IFN α -21タンパク質が樹状細胞の成熟を刺激する高い能力を有し、この刺激効果が野生型IFN α -2のそれより高いことを証明する。

【0265】

b) Tリンパ球によるサイトカイン放出に対するQ114H/V127D又はK179E変異IFN α -21の効果
侵襲に対する免疫応答をまねるための強力な抗原(SEB)を伴うか又はそれなしに対応の変異IFN α -21タンパク質の存在下に置かれたTリンパ球によるサイトカイン放出を計測することによって、Q114H/V127D又はK179E変異IFN α -21の免疫調節性を調査した。この試験を、対照として使用され、かつ、イントロンA商品の代表として選ばれた野生型IFN α -2の存在下でも実施した。

【0266】

そのために、末梢血単核細胞(PBMC)を健常なドナーから単離し、そして抗CD3及び抗CD28抗体又はSEBを含む好適な培地中で16時間の刺激した。各々の培養中に4 μ g/mLの野生型I

FN - 2、又はQ114H/V127D若しくはK179E変異IFN - 21を加えた。刺激の後に、Tリンパ球を、抗CD3、抗CD4及び抗CD69抗体、又は抗CD3、抗CD8及び抗CD69抗体により細胞外で標識し、そしてTh1型サイトカイン(IFN-)又はTh2型サイトカイン(IL-10)に対して特異的な抗体により細胞内で標識した。蛍光を発する細胞を、FACScalibur及びCellQuestソフトウェアを使って分析した。

【0267】

得られた結果は、変異IFN - 21タンパク質及び野生型IFN - 2がIL-10及びIFN- の放出を刺激せず、したがってSEBの不存在下でTリンパ球を活性化しないことを示す。対照的に、以下の表で示されるように、変異IFN - 21タンパク質及び野生型IFN - 2は、SEBにより活性化されたTリンパ球によるサイトカイン(IL-10及びIFN-)の放出を刺激する。この表は、CD4+ Tリンパ球及びCD8+ Tリンパ球についての、それぞれCD4+、CD69+細胞又はCD8+、CD69+細胞の割合、並びに全細胞におけるCD69+細胞の割合として表される、SEBの存在下でのTリンパ球によるサイトカインの放出を表す。

10

【0268】

【表9】

T-リンパ球		IFNガンマ	IL-10	CD69+細胞/合計
CD4+CD69+	負の対照	11.9	7.5	1.26
	野生型IFN α -2	19.6	24.68	2.7
	Q114H/V127D IFN α -21	38.9	14.6	4.67
	K179E IFN α -21	29.5	15.1	3.84
CD8+CD69+	負の対照	8.73	0.65	4.69
	野生型IFN α -2	16.37	4.26	10.02
	Q114H/V127D IFN α -21	32.24	4.91	14.98
	K179E IFN α -21	28.28	3.8	13.48

20

30

【0269】

これらの結果は、Q114H/V127D変異IFN - 21及びK179E変異IFN - 21が強力に前もってSEB抗原により活性化されたCD4+及びCD8+ T-リンパ球によるサイトカイン放出(IFN-及びIL-10)を強力に刺激することをはっきりと証明する。この試験において、Tリンパ球によるインターフェロン 産生は、野生型IFN - 2の存在下よりもQ114H/V127D変異IFN - 21又はK179E変異IFN - 21の存在下でより高かった。

40

【0270】

c) 単球によるサイトカイン放出に対するQ114H/V127D又はK179E変異IFN - 21の効果最後に、細菌毒性物質(LPS)の不存在下、又は存在下での単球によるサイトカイン放出を計測することによって、Q114H/V127D又はK179E変異IFN - 21の免疫調節性活性を調査した。この試験を、対照として使用され、かつ、イントロンA商品の代表として選ばれた野生型IFN - 2の存在下でも実施した。

【0271】

そのために、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を健常なドナーから単離し、そしてそれらの発現型を、CD64+ CD4dim細胞(CD64及びCD4dimは、血中単球に関するマーカーである)の相対的

50

な量を測定するために分析した。一晚の培養後に、これらのPBMCを、培地中、単独(刺激されていない細胞)又はLPSの存在下(刺激された細胞)でインキュベートした。各々の培養中に、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の野生型IFN- α -2又は変異IFN- α -21を加えた。培養後に、細胞を、抗CD64及び抗CD4dimにより細胞外で標識し、Th1型サイトカイン(TNF- α)、IL-12及びIL-10に対する特異的抗体により細胞内で標識した。

【0272】

蛍光を発する細胞を、FACScalibur及びCellQuestソフトウェアを使って分析した。得られた結果は、LPSの不存在下において、変異IFN- α -21タンパク質及び野生型IFN- α -2がサイトカイン(IL-10、IL-12及びTNF- α)の放出を刺激しないことを示す。対照的に、以下の表で示されるように、LPSの存在下において、Q114H/V127D及びK179E変異IFN- α -21タンパク質及び野生型IFN- α -2は、単球によるサイトカイン(IL-10、IL-12及びTNF- α)の放出を刺激する。この表は、CD64+ CD4dim細胞の割合、並びに全細胞におけるCD4dim CD64+細胞の割合として表される、LPSの存在下での単球によるサイトカインの放出を表す。

10

【0273】

【表10】

	IL-10	IL-12	TNF- α	CD4dim CD64+ 細胞/合計
刺激なし	16.21	8.52	13.88	3.1
野生型IFN α -2	49.34	34.48	50.87	2.71
Q114H/V127D IFN α -21	50.63	31.81	56.5	2.31
K179E IFN α -21	60.14	36.42	60.16	4.43

20

【0274】

実施例5. A42G、Q102K、Q114H/V127D及びK179E変異IFN- α -21の抗増殖性活性の評価

a) ヒト・リンパ芽球のDaudiパーキット細胞系の増殖において

これらの試験を、A42G、Q102K、Q114H/V127D及びK179E変異IFN- α -21タンパク質、並びに野生型IFN- α -21タンパク質において実行する。あらかじめRPMI1640培地(10%の胎仔ウシ血清及び2 mMのL-グルタミンを補足)中で培養された細胞(ヒトDaudiパーキット・リンパ腫細胞系、以降「Daudi細胞」と呼ぶ)を、 $4 \cdot 10^4$ の細胞/ウェルの細胞密度で96ウェルプレート中に接種する。

【0275】

各々のウェルにおいて、Daudi細胞を、高められた濃度の変異又は野生型IFN- α -21タンパク質のいずれかとの接触状態に置く。特徴づけるべき各々のIFN- α -21について、0.003 pM~600 nMの終濃度を試験する。

40

【0276】

次に、Daudi細胞を5%のCO₂下、37°Cで66時間インキュベートし、その後Uptiblue試薬(Uptima)を前記培養物に加える。4時間のさらなるインキュベーション期間の後に、590 nm(励起560 nm)で、発光される蛍光を計測することによって細胞増殖速度を定量する。

変異又は野生型IFN- α -21の抗増殖性活性は、細胞成長の50%を抑えるIFN- α -21濃度に相当するIC50の計測値に基づく。

【0277】

各々の実験条件について、少なくとも3つの実験を3重で実行し、それは、各々のIFN- α -2

50

1に関する平均IC50値の測定を可能にする。変異タンパク質のIC50の値、割る野生型タンパク質の値に相当する比率が、比較を可能にする。結果を以下の表にまとめる(括弧内は標準偏差を意味する)：

【0278】

【表11】

	野生型 IFN α -21	A42G IFN α -21	Q102K IFN α -21	Q114H/V127D IFN α -21	K179E IFN α -21
IC50 (pM)	1.02	2.55	1.05	13.92	3.73
比率 野生型/ 変異	—	2.15 (0.78)	1.30 (0.24)	13.10 (3.06)	3.72 (0.83)

10

【0279】

この試験は、Daudi細胞に対するA42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN α -21タンパク質の細胞抗増殖性活性が、野生型IFN α -21のそれより低いことを証明する。特にDaudi細胞に対する細胞抗増殖性活性は、野生型IFN α -21に比べてQ114H/V127D IFN α -21の存在下で、約10~16倍低い。

20

【0280】

b)TF-1赤白血病細胞系において

TF-1赤白血病細胞系に対するA42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN α -21の効果をも評価した。この試験を、対照として使用され、かつ、イントロンA商品の代表として選ばれた野生型IFN α -2の存在下でも実施した。

そのために、TF-1細胞を、高められた濃度の変異IFN α -21又は野生型IFN α -2(0.001~1000 ng/mL)との接触状態に置き、そして細胞増殖を計測した。

【0281】

前記結果を、細胞増殖の30%を抑制するIFN α -2濃度に相当するIC30として表し、以下の表にまとめる：

30

【0282】

【表12】

	野生型 IFN α -2	A42G IFN α -21	Q114H/V127D IFN α -21	K179E IFN α -21
IC30 (ng/mL)	0.66	2.33	1.97	1.62

40

【0283】

これらのデータは、3つの変異IFN α -21がTF-1細胞に対して弱い抗増殖性効果を有し、そしてこの効果は、野生型IFN α -2のそれと類似していることを示し、A42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN α -21の血液毒性が野生型IFN α -2のそれより優れていないことを示唆する。

【0284】

実施例6. A42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN α -21の抗ウイルス活性についての評価

50

IFNsは、抗ウイルス防衛において重要な役割を担っている。以下のように、IFN抗ウイルス活性は、部分的に以下のIFNs誘導酸素系による：

【0285】

- アデノシン・オリゴマー合成を触媒する酵素である、2'5'オリゴアデニレート・シナーターゼ。これらのオリゴマーは、一旦活性化するとウイルス性RNAを破壊するエンドリボヌクレアーゼであるRNase Lを活性化する。
- ウイルス性転写物の合成及び/又は成熟を抑制するMxタンパク質(GTPases)。この活性は、主にインフルエンザウイルスに発揮される。
- 2本鎖RNAによって活性化されるPKRタンパク質(又はp68キナーゼ)。活性化されたPKRは、タンパク質合成を抑制する。

10

【0286】

IFNs抗ウイルス活性は、他の機構、例えばレトロウイルスの場合、細胞内へのウイルス粒子の侵入、複製、結合、粒子の退出、そしてウイルス粒子の感染力の抑制に関して誘発されもする。

【0287】

最後に、IFNsは、免疫系の特定の機能を調節することによって、特に細胞介在(特に、MHCクラスI及びII分子の増加、IL-12及びIFN- γ 産生の増加、CTL活性の上昇を含む)への応答を助けることによって間接的な抗ウイルス活性を発揮する。

【0288】

A42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN- α -21の抗ウイルス活性を、インビトロで細胞培養により、インビボでマウス・モデルにより評価した。両試験を、対照として使用され、かつ、イントロンA商品の代表として選ばれた野生型IFN- α -2と平行して実行した。

20

【0289】

a) 細胞培養によるインビトロにおける抗ウイルス活性
このアッセイは、水疱性口内炎ウイルス(VSV)を使った細胞培養によりA42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN- α -21、並びに野生型IFN- α -2の抗ウイルス活性についての評価を可能にする。

【0290】

そのために、WISHヒト上皮細胞を、下げられた濃度の変異IFN- α -21及び野生型IFN- α -2の存在下で24時間培養する。次に、細胞をさらに24~48時間、水疱性口内炎(VSV)ウイルスによって感染させ、そして細胞の溶解を計測する。

30

試験された様々なIFN- α の抗ウイルス効果を、VSVによって誘発された細胞溶解の50%を抑制するIFN濃度に相当するIC50値を比較することによって測定する。

【0291】

類似の実験を2回実行し、そして計測された平均IC50値を以下の表に示す：

【0292】

【表13】

	野生型 IFN α -2	A42G IFN α -21	Q114H/V127D IFN α -21	K179E IFN α -21
IC50 (ng/mL)	4	14	22	25

40

【0293】

このように、VSVに感染した細胞培養において、A42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN- α -21は、野生型IFN- α -2より低い抗ウイルス活性を有する。

【0294】

50

b) マウス・モデルによるインピボにおける抗ウイルス活性

このインピボにおける試験を、EMCV(脳心筋炎ウイルス)マウス・モデルにより実施する。ヒトIFNsは、マウスにおいて服用量依存的な抗ウイルス活性を示し、それは、同量のマウスIFNで示されたものよりおおむね100~1,000倍少ない(Meister et al. (1986). J. Gen. Virol. 67, 1633-1644)。

【0295】

脳心筋炎ウイルス(EMCV)のマウス腹膜内注入は、中枢神経系関連及び脳炎にを特徴とする急速に進行する致命的な病気を発生させる(Finter NB(1973)Front Biol. 2: 295 - 360)。マウス及びヒト・インターフェロン- は、ともに致命的なEMCV感染に対抗してマウスの保護に有効であることが示された(Tovey and Maury (1999). J. IFN Cytokine Res. 19:1 10 45-155)。

【0296】

1群20匹の6週齢のスイス・マウスを、100×LD50のEMCVにより腹腔内への注入により(ip)感染させ、そして1時間後、及びその後3日間は1日1回、2µgのA42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN - 21又は野生型IFN - 2製剤により治療した。対照群を、賦形剤だけで治療した動物で行った。動物を、21日間、生存について毎日追跡した。

【0297】

結果は、図6に示され、そしてA42G、Q114H/V127D又はK179E変異IFN - 21により治療されたマウスの相対的な生存率は、治療を受けなかったマウスの生存率よりかなり高かったが、しかし野生型IFN - 2により治療されたマウスについて観察されたそれに依然として類似したままであることを示す。 20

これらの結果の全てが、A42G、Q114H/V127D及びK179E変異IFN - 21が独特の生物学的性質を有することを証明している。

【図面の簡単な説明】

【0298】

【図1】SNP c973a(Q79K)を含む本発明によるコード・タンパク質及び天然の野生型IFN - 21タンパク質のモデルを表す。図1Bは、図1Aに表された各々1つのタンパク質の下部についてのモデルの拡大図を表す。

図1A及び1Bにおいて、黒リボンは天然の野生型IFN - 21タンパク質の構造を表し、白リボンはQ79K変異IFN - 21タンパク質の構造を表す。 30

【図2】SNP g1011c(Q91H)を含む本発明によるコード・タンパク質及び天然の野生型IFN - 21タンパク質のモデルを表す。図2Bは、図2Aに表された各々1つのタンパク質の左部についてのモデルの拡大図を表す。

図2A及び2Bにおいて、黒リボンは天然の野生型IFN - 21タンパク質の構造を表し、白リボンはQ91H変異IFN - 21タンパク質の構造を表す。

【図3】SNP t1049a(V104D)を含む本発明によるコード・タンパク質及び天然の野生型IFN - 21タンパク質のモデルを表す。図3Bは、図3Aに表された各々1つのタンパク質の上部についてのモデルの拡大図を表す。

図3A及び3Bにおいて、黒リボンは天然の野生型IFN - 21タンパク質の構造を表し、白リボンはV104D変異IFN - 21タンパク質の構造を表す。 40

【図4】SNP t1155a(C139stop)(図4B)を含む本発明によるコード・タンパク質及び天然の野生型IFN - 21タンパク質(図4A)のモデルを表す。図4Cは、図4A及び4Bの2つのタンパク質の重ね合わせを表す。図4において、黒リボンは天然の野生型IFN - 21タンパク質の構造を表し、白リボンはC139stop変異IFN - 21タンパク質の構造を表す。

【図5】SNP a1204g(K156E)を含む本発明によるコード・タンパク質及び天然の野生型IFN - 21タンパク質のモデルを表す。図5Bは、図5Aに表された各タンパク質の上部についてのモデルの拡大図を表す。

図5において、黒リボンは天然の野生型IFN - 21タンパク質の構造を表し、白リボンはK156E変異IFN - 21タンパク質の構造を表す。

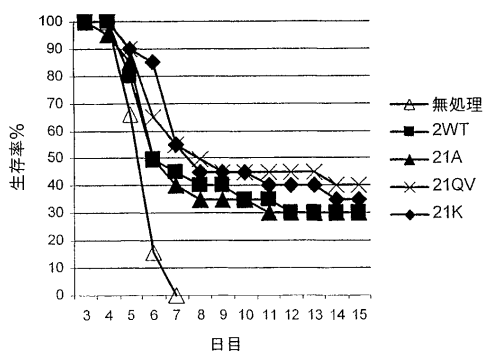
【図6】前もってVSVウイルスに感染させた、そしてA42G、Q114H/V127D又はK179E変異IFN 50

- 21タンパク質により治療したマウスの、野生型 IFN γ - 2で治療したもの又は治療していないものと比較した生存率を表す。

この図面において、横軸は生存時間(日間)に相当し、縦軸はVSV感染マウスの相対的な生存率に相当する。黒三角、十字形、黒ダイヤモンドは、それぞれA42G変異IFN γ - 21、Q114H/V127D変異IFN γ - 21、及びK179E変異IFN γ - 21により治療したVSV感染マウスに関するデータを表す。黒四角は、野生型IFN γ - 2により治療したVSV感染マウスに関するデータを表し、白三角は、治療していないVSV感染マウスに関するデータを表す。

【 図 6 】

FIGURE 6



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/079249 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/56, C12Q 1/68, C07K 16/18, C12N 15/10, 15/85, 5/10
- (21) International Application Number: PCT/EP02/04082
- (22) International Filing Date: 29 March 2002 (29.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01/04404 30 March 2001 (30.03.2001) FR
- (71) Applicant (for all designated States except US): GEN-ODYSSEE [FR/FR]; Parc d'Affaires Technopolis, 3, avenue du Canada, Bat. Alpha, BP 810 Les Ulis, F-91974 Courtabœuf (FR).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ESCARY, Jean-Louis [FR/FR]; 4, rue Moxouris, F-78510 Le Chesnay (FR).
- (74) Agent: RINUÿ, Santarelli, 14, avenue de la Grande-Armée, B.P. 237, F-75822 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/079249 A2

(54) Title: NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN α (A)-21 GENE(57) Abstract: The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide sequence of the IFN α -21 gene comprising new SNPs, and new polypeptides derived from the natural wild-type IFN α -21 protein comprising at least one mutation caused by at least one SNP of the invention as well as their therapeutic uses.

WO 02/079249

PCT/EP02/04062

1

NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN α -21 GENE

RELATED APPLICATIONS:

The present invention claims priority to French Patent Application 0104404 filed on
5 30 March 2001 titled <<Nouveaux polynucléotides comportant des polymorphismes de type
SNP fonctionnels dans la séquence nucléique du gène IFN α 21 ainsi que de nouveaux
polypeptides codés par ces polynucléotides et leurs utilisations thérapeutiques.>>

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 *Field of the Invention.*

The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide
sequence of the IFN α -21 gene comprising new SNPs, and new polypeptides derived from the
natural wild-type IFN α -21 protein comprising mutations caused by these SNPs, as well as
their therapeutic uses.

15

Related Art.

The interferon alpha 21 gene, hereinafter referred to as IFN α -21, is described in the
publications:

- Goeddel, D. V., Leung, D. W; "The structure of eight distinct cloned human
20 leukocyte interferon cDNAs"; Nature 290 (5801), 20-26 (1981).

- Olopade OI, Bohlander SK.; "Mapping of the shortest region of overlap of
deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia"; Genomics 14
(2), 437-443 (1992).

The nucleotide sequence of this gene is accessible in the HTG section of the GenBank
25 database under accession number AC009445.

The sequence of the messenger RNA of IFN α -21 is mentioned in the database of the
NCBI, under accession code NM_002175.

IFN α -21 is a gene possessing a structural and functional homology close to that of
human interferons alpha (IFN α), specifically IFN α -2.

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

The IFN α are also known to inhibit the expression of several other cytokines at the
level of the hematopoietic stem cells, as well as to inhibit the cellular proliferation of certain

WO 02/079249

2

PCT/EP02/04082

tumors.

The IFN α are also known to reduce the expression of the receptors to the EGF in renal carcinomas, to inhibit the expression of certain mitochondrial genes, to inhibit the proliferation of fibroblasts, monocytes and B lymphocytes, especially in vitro, and to block
5 the synthesis of antibodies by B lymphocytes.

The IFN α are also known to induce the expression of tumor specific antigens on the surface of tumor cells and also to induce the genes placed under the control of promoter regions of the ISRE type (Interferon-Stimulated Response Element) by acting on the specific transcription factors of these ISRE.

10 It is known that the IFN α are involved in different disorders and/or human diseases, such as the different cancers like for example, carcinomas, melanomas, lymphomas, leukemias and cancers of the liver, neck, head and kidneys, cardiovascular diseases, metabolic diseases such as those that are not connected with the immune system like, for example, obesity, infectious diseases such as hepatitis B and C and AIDS, pneumonias,
15 ulcerative colitis, diseases of the central nervous system like, for example, Alzheimer's disease, schizophrenia and depression, the rejection of tissue or organ grafts, healing of wounds, anemia in dialyzed patients, allergies, asthma, multiple sclerosis, osteoporosis, psoriasis, rheumatoid arthritis, Crohn's disease, autoimmune diseases and disorders, gastrointestinal disorders or even disorders connected with chemotherapy treatments.

20 The IFN α are particularly used for the treatment of certain leukemias, metastasized renal carcinomas as well as tumors that appear following an immunodeficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS. The IFN α are also effective against other types of tumors and against certain viral infections. The IFN α are also recognized by the FDA (Food and Drug Administration) for the treatment of genital warts or venereal diseases.

25 More specifically, IFN α -21 was located by *in situ* hybridization in the brains of patients suffering from Parkinson's disease or Alzheimer's disease.

Compared to other cells, microglial cells express IFN α -21 in large quantities.

In patients suffering from Alzheimer's disease, the presence of IFN α -21 was shown in the neurons of the parietal lobes, suggesting that IFN α -21 may be involved in this
30 pathology (See e.g. Kawaguchi N, Yamada T, Yoshiyama Y. No To Shinkei. 1997 Jan.; 49(1): 69-73).

However, the IFN α , and in particular IFN α -21, have numerous side effects when they are used in pharmaceutical compositions, such as reactions of acute hypersensitivity

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

3

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

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

The inventors have found new polypeptide and new polynucleotide analogs to the IFN α -21 gene capable of having a different functionality from the natural wild-type IFN α -21 protein.

These new polypeptides and polynucleotides can notably be used to treat or prevent the disorders or diseases previously mentioned and avoid all or part of the disadvantages, which are tied to them.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The invention has as its first object new polynucleotides that differ from the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN α -21 gene, in that it comprises one or several SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

The nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the human reference wild-type IFN α -21 gene is composed of 2001 nucleotides and comprises a coding sequence of 570 nucleotides, from nucleotide 670 (start codon) to nucleotide 1239 (stop codon).

The applicant has identified 8 SNPs in the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN α -21 gene. These 8 SNPs are the following: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c.

It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponding to the positioning of the SNP previously defined is relative to the numbering of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

The letters a, t, c and g correspond respectively to the nitrogenous bases adenine, thymine, cytosine and guanine.

The first letter corresponds to the wild-type nucleotide, whereas the last letter corresponds to the mutated nucleotide.

Thus, for example, the SNP c794g corresponds to a mutation of the nucleotide cytosine (c) at position 794 of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the reference wild-type IFN α -21 gene, into nucleotide guanine (g).

These SNPs were identified by the applicant using the determination process

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

4

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

5 The process described in this patent application permits the identification of one (or several) preexisting SNP(s) in at least one individual from a random population of individuals.

In the scope of the present invention, a fragment of the nucleotide sequence of the IFN α -21 gene, comprising, for example, the coding sequence, was isolated from different
10 individuals in a population of individuals chosen in a random manner.

Sequencing of these fragments was then carried out on certain of these samples having a heteroduplex profile (that is a profile different from that of the reference wild-type IFN α -21 gene sequence) after analysis by DHPLC ("Denaturing-High Performance Liquid Chromatography").

15 The fragment sequenced in this way was then compared to the nucleotide sequence of the fragment of the reference wild-type IFN α -21 gene and the SNPs in conformity with the invention identified.

Thus, the SNPs are natural and each of them is present in certain individuals of the world population.

20 The reference wild-type IFN α -21 gene codes for an immature protein of 189 amino acids, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, that will be converted to a mature protein of 166 amino acids, by cleavage of the signal peptide that includes the first 23 amino acids.

Each of the coding SNPs of the invention, namely: c794g, c973a, g1011c, t1049a,
25 t1155a, a1204g, causes modifications, at the level of the amino acid sequence, of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN α -21 gene.

These modifications in the amino acid sequence are the following:

The SNP c794g causes a mutation of the amino acid alanine (A) at position 42 in the immature protein of the IFN α -21 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID
30 NO. 2, in glycine (G) and at position 19 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP either A19G or A42G according to whether one refers to the mature protein or to the immature protein respectively.

The SNP c973a causes a mutation of the amino acid glutamine (Q) at position 102 in

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

5

the immature protein of the IFN α -21 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in lysine (K) and at position 79 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP Q79K or Q102K according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

5 The SNP g1011c causes a mutation of the amino acid glutamine (Q) at position 114 in the immature protein of the IFN α -21 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in histidine (H) and at position 91 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP Q91H or Q114H according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

10 The SNP t1049a causes a mutation of the amino acid valine (V) at position 127 in the immature protein of the IFN α -21 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in aspartic acid (D) and at position 104 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP V104D or V127D according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

15 The SNP t1155a causes a mutation of the amino acid cysteine (C) at position 162 in the immature protein of the IFN α -21 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in stop codon (stop) and at position 139 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP C139stop or C162stop according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

20 The SNP a1204g causes a mutation of the amino acid lysine (K) at position 179 in the immature protein of the IFN α -21 gene, corresponding to the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, in glutamic acid (E) and at position 156 of the mature protein. In the description of the present invention, one will call the mutation encoded by this SNP K156E or K179E according to whether one refers respectively to the mature protein or to the immature protein.

25 The SNPs c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g cause modifications of the spatial conformation of the polypeptides in conformity with the invention compared to the polypeptide encoded by the nucleotide sequence of the wild-type reference IFN α -21 gene.

These modifications can be observed by computational molecular modeling, according to methods that are well known to a person skilled in the art, making use of, for
30 example, the modeling tools *de novo* (for example, SEQFOLD/MSI), homology (for example, MODELER/MSI), minimization of the force field (for example, DISCOVER, DELPHI/MSI) and/or molecular dynamics (for example, CFF/MSI).

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

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

6

Computational molecular modeling shows that the mutation Q79K on the mature mutated protein involves the displacement of helix C N-end in the wild-type IFN α -21 protein due to hydrogen bonds disturbance as shown in Figures 1A and 1B.

Indeed, hydrogen bonds between the oxygen atom of Q79 residue's side chain, E83 residue's acidic group and helix C of the wild-type IFN α -21 protein disappear in the Q79K mutated IFN α -21 protein.

Thus, the Q79K mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN α -21 protein involving a significant change in its structure and function.

10 Computational molecular modeling shows that the mutation Q91H on the mature mutated protein involves a displacement of helix C at the mutation position as shown in Figures 2A and 2B. Several hydrogen bonds and salt bridges appear, especially between H91 and D76 amino acids side chains, which make the helix more rigid.

Thus, the Q91H mutated protein possesses a three-dimensional conformation different 15 from the natural wild-type IFN α -21 protein involving a significant change in its structure and function.

Computational molecular modeling shows that the mutation V104D on the mature mutated protein involves modifications in the structure of the loop between helices C and D at the mutation position as shown in Figures 3A and 3B. In the mutated structure several 20 hydrogen bonds appear (between Q102 and G105 on the one hand, and Q52, E107 and T109 on the other hand) which make the loop between helices C and D more rigid. Moreover, a slight displacement of helix B N-end is also observed.

These spatial modifications affect the residues involved in IFN α -21 binding to its receptor.

25 Thus, the V104D mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN α -21 protein involving a significant change in its structure and function.

Computational molecular modeling shows that the mutation C139stop on the mature mutated protein causes a premature arrest in protein translation leading to the disappearance 30 of a polypeptidic fragment normally involved in helix E in the wild-type IFN α -21 protein, as shown in Figure 4.

Helix E is essential for IFN α -21 binding to its receptor. The absence of helix E causes an incorrect folding of the mutated protein and leads to a modification in the three-

WO 02/079249

7

PCT/EP02/04082

dimensional conformation of the protein in which the hydrophobe core of the protein is in contact with the hydrophilic external medium. Thus, the mutated protein must modify its three-dimensional conformation so as its hydrophobic core is covered with hydrophilic residues in order to avoid contact with hydrophilic external medium.

5 Thus, the C139stop mutated protein possesses a three-dimensional conformation different from the natural wild-type IFN α -21 protein involving a significant change in its structure and function.

Computational molecular modeling shows that the mutation K156E on the mature mutated protein involves unfolding of helix E C-end and modification of the C-terminus loop
10 shape as shown in Figures 5A and 5B.

This mutation increases the hydrogen bonds network and creates a salt bridge between E156 and R161 residues. These modifications render IFN α -21 protein structure more rigid in this area. This area in the protein is known to be involved in its antiviral activity. Thus, it is possible to predict that the K156E mutated IFN α -21 protein's antiviral activity is
15 dramatically disturbed and that the glutamic acid at position 156 causes a modification in the structure and the function of mature IFN α -21.

Other SNPs in conformity with the invention, namely: t1265c, t1277c do not involve modification of the protein encoded by the nucleotide sequence of the IFN α -21 gene at the level of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2. The SNPs t1265c, t1277c are non-coding.

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

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

25 In this regard, it is possible to measure, for example, the anti-proliferative effect on a Daudi cell line of polypeptides in conformity with the invention in comparison with the natural wild-type IFN α -21 protein (Pielher et al. *J. Biol. Chem.*; Vol. 275, Issue 51, 40425-40433, December 22, 2000; "New structural and Functional Aspects of the type I Interferon-Receptor interaction revealed by comprehensible mutational analysis of the binding
30 interface").

The invention also has for an object the use of polynucleotides and of polypeptides in conformity with the invention as well as of therapeutic molecules obtained and/or identified

WO 02/079249

8

PCT/EP02/04082

starting from these polynucleotides and polypeptides, notably for the prevention and the treatment of certain human disorders and/or diseases.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5 Figures 1A and 1B represent a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP c973a (Q79K) and the natural wild-type IFN α -21 protein. Figure 1B represents a close up of the model of the inferior part of each one of the proteins represented in Figure 1A.

10 In Figures 1A and 1B, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN α -21 protein and the white ribbon represents the structure of the Q79K mutated IFN α -21 protein.

15 Figures 2A and 2B represent a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP g1011c (Q91H) and the natural wild-type IFN α -21 protein. Figure 2B represents a close up of the model of the left part of each of the proteins represented on Figure 2A.

 In Figures 2A and 2B, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN α -21 protein and the white ribbon represents the structure of the Q91H mutated IFN α -21 protein.

20 Figures 3A and 3B represent a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP t1049a (V104D) and the natural wild-type IFN α -21 protein. Figure 3B represents a close up of the model of the superior part of each of the proteins represented on Figure 3A.

25 In Figures 3A and 3B, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN α -21 protein and the white ribbon represents the structure of the V104D mutated IFN α -21 protein.

30 Figure 4 represents a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP t1155a (C139stop) (Figure 4B) and the natural wild-type IFN α -21 protein (Figure 4A). Figure 4C represents the superposition of the two proteins of figures 4A and 4B. In Figure 4, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN α -21 protein and the white ribbon represents the structure of the C139stop mutated IFN α -21 protein.

WO 02/079249

9

PCT/EP02/04082

Figures 5A and 5B represent a model of the encoded protein according to the invention comprising the SNP a1204g (K156E) and the natural wild-type IFN α -21 protein.

Figure 5B represents a close up of the model of the upper part of each of the proteins represented on Figure 5A. In Figure 5, the black ribbon represents the structure of the natural wild-type IFN α -21 protein and the white ribbon represents the structure of the K156E mutated IFN α -21 protein.

Figure 6 represents the survival rate of mice previously infected by VSV virus and treated with A42G, Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21 protein, in comparison to those treated with wild-type IFN α -2, or those that have not been treated.

In this figure, the abscissas correspond to the time of survival (days) and the ordinates correspond to the relative survival rate of VSV infected mice. The black triangles, the crosses, the black diamonds represent the data for VSV infected mice treated with A42G mutated IFN α -21, Q114H/V127D mutated IFN α -21, and K179E mutated IFN α -21, respectively. The black squares represent the data for VSV infected mice treated with wild-type IFN α -2, and the open triangles represent the data for VSV infected mice that have not been treated.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions.

"Nucleotide sequence of the reference wild-type gene" is understood as the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 of the human IFN α -21 gene.

This sequence is accessible in GenBank under Accession number AC009445 and the sequence of the IFN α -21 messenger RNA is mentioned in the database of the NCBI under accession code NM_002175. Moreover, the human IFN α -21 gene is described in Goeddel, D. V., Leung, D. W "The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs"; Nature 290 (5801), 20-26 (1981), and Olopade OI., Bohlander SK. "Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia"; Genomics 14 (2), 437-443 (1992).

"Natural wild-type IFN α -21 protein" is understood as the mature protein encoded by the nucleotide sequence of the reference wild-type IFN α -21 gene. The natural wild-type immature protein IFN α -21 corresponds to the peptide sequence shown in SEQ ID NO. 2.

"Polynucleotide" is understood as a polyribonucleotide or a polydeoxyribonucleotide that can be a modified or non-modified DNA or an RNA.

The term polynucleotide includes, for example, a single strand or double strand DNA, a DNA composed of a mixture of one or several single strand region(s) and of one or several double strand region(s), a single strand or double strand RNA and an RNA composed of a mixture of one or several single strand region(s) and of one or several double strand region(s). The term polynucleotide can also include an RNA and/or a DNA including one or several triple strand regions. By polynucleotide is equally understood the DNAs and RNAs containing one or several bases modified in such a fashion as to have a skeleton modified for reasons of stability or for other reasons. By modified base is understood, for example, the unusual bases such as inosine.

"Polypeptide" is understood as a peptide, an oligopeptide, an oligomer or a protein comprising at least two amino acids joined to each other by a normal or modified peptide bond, such as in the cases of the isosteric peptides, for example.

A polypeptide can be composed of amino acids other than the 20 amino acids defined by the genetic code. A polypeptide can equally be composed of amino acids modified by natural processes, such as post translational maturation processes or by chemical processes, which are well known to a person skilled in the art. Such modifications are fully detailed in the literature. These modifications can appear anywhere in the polypeptide: in the peptide skeleton, in the amino acid chain or even at the carboxy- or amino-terminal ends.

A polypeptide can be branched following an ubiquitination or be cyclic with or without branching. This type of modification can be the result of natural or synthetic post-translational processes that are well known to a person skilled in the art.

For example, polypeptide modifications is understood to include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent fixation of flavine, covalent fixation of heme, covalent fixation of a nucleotide or of a nucleotide derivative, covalent fixation of a lipid or of a lipidic derivative, the covalent fixation of a phosphatidylinositol, covalent or non-covalent cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, cysteine formation, pyroglutamate formation, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodization, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processes, phosphorylation, prenylation, racemization, seneloylation, sulfatation, amino acid addition such as arginylation or ubiquitination. Such modifications are fully detailed in the literature: PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES,

WO 02/079249

11

PCT/EP02/04082

2nd Ed., T. E. Creighton, New York, 1993, POST-TRANSLATIONAL COVALENT
MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983,
Seifter et al. "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth. Enzymol.
(1990) 182: 626-646, and Rattan et al. "Protein Synthesis: Post-translational Modifications
5 and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48-62.

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

"Identity" is understood as the measurement of nucleotide or polypeptide sequence
10 identity.

Identity is a term well known to a person skilled in the art and well described in the
literature. See COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., Ed., Oxford
University Press, New York, 1998; BIOCOMPUTING INFORMATICS AND GENOME
PROJECT, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; COMPUTER ANALYSIS
15 OF SEQUENCE DATA, PART I, Griffin, A.M. and Griffin H.G., Ed, Humana Press, New
Jersey, 1994; and SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G.,
Academic Press, 1987.

The methods commonly employed to determine the identity and the similarity
between two sequences are equally well described in the literature. See GUIDE TO HUGE
20 COMPUTER, Martin J. Bishop, Ed, Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo H. and
Lipton D., Siam J Applied Math (1988) 48: 1073.

A polynucleotide having, for example, an identity of at least 95 % with the nucleotide
sequence SEQ ID NO. 1 is a polynucleotide which contains at most 5 points of mutation over
100 nucleotides, compared to said sequence.

25 These points of mutation can be one (or several) substitution(s), addition(s) and/or
deletion(s) of one (or several) nucleotide(s).

In the same way, a polypeptide having, for example, an identity of at least 95 % with
the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 is a polypeptide that contains at most 5 points of
mutation over 100 amino acids, compared to said sequence.

30 These points of mutation can be one (or several) substitution(s), addition(s) and/or
deletion(s) of one (or several) amino acid(s).

The polynucleotides and the polypeptides according to the invention which are not
totally identical with respectively the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or the amino acid

WO 02/079249

12

PCT/EP02/04082

sequence SEQ ID NO. 2, it being understood that these sequences contains at least one of the SNPs of the invention, are considered as variants of these sequences.

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

In similar fashion, usually a polypeptide according to the invention possesses the same or practically the same biological activity as the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 comprising at least one of the coding SNPs of the invention.

A variant, according to the invention, can be obtained, for example, by site-directed
10 mutagenesis or by direct synthesis.

By "SNP" is understood any natural variation of a base in a nucleotide sequence. A SNP, on a nucleotide sequence, can be coding, silent or non-coding.

A coding SNP is a polymorphism included in the coding sequence of a nucleotide sequence that involves a modification of an amino acid in the sequence of amino acids
15 encoded by this nucleotide sequence. In this case, the term SNP applies equally, by extension, to a mutation in an amino acid sequence.

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

A non-coding SNP is a polymorphism included in the non-coding sequence of a nucleotide sequence. This polymorphism can notably be found in an intron, a splicing zone, a transcription promoter or a site enhancer sequence.

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

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

The functionality of a polypeptide or of a polynucleotide according to the invention can consist in a conservation, an augmentation, a reduction or a suppression of the biological activity of the polypeptide encoded by the nucleotide sequence of the wild-type reference
30 gene or of this latter nucleotide sequence.

The functionality of a polypeptide or of a polynucleotide according to the invention can equally consist in a change in the nature of the biological activity of the polypeptide

WO 02/079249

13

PCT/EP02/04082

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

The biological activity can, notably, be linked to the affinity or to the absence of affinity of a polypeptide according to the invention with a receptor.

5

Polynucleotide

The present invention has for its first object an isolated polynucleotide comprising:

- a) a nucleotide sequence having at least 80 % identity, preferably at least 90 % identity, more preferably at least 95 % identity and still more preferably at least 99 % identity with the sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence (from nucleotide 670 to nucleotide 1239), it being understood that this nucleotide sequence comprises at least one of the following coding SNPs c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g or
- b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

- 10
- It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponds to the positioning of the SNPs in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

15 The present invention relates equally to an isolated polynucleotide comprising:

- a) a nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following coding SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, or
- 20 b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).

Preferably, the polynucleotide of the invention consists of the sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following coding SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g.

- 25 According to the invention, the polynucleotide previously defined comprises a single coding SNP selected from the group consisting of: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, and a1204g.

A polynucleotide such as previously defined can equally include at least one of the following non-coding SNPs: t1265c, t1277c.

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

- a) a nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following non coding SNPs: t1265c, t1277c, or

WO 02/079249

14

PCT/EP02/04082

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

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

a) a nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or its coding sequence, it being understood that each of these sequences comprises at least one of the following SNPs: c794g, c973a,
5 g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c, or

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

said isolated polynucleotide being composed of at least 10 nucleotides.

Preferably, the isolated polynucleotide as defined above is composed of 10 to 40 nucleotides.

10 The present invention also has for its object an isolated polynucleotide coding for a polypeptide comprising:

a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or

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

15 it being understood that each of the amino acid sequences under a) and b) comprises at least one of the following coding SNPs: A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, K179E.

It is understood, in the sense of the present invention, that the numbering corresponding to the positioning of the A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, K179E

20 SNPs is relative to the numbering of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2.

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

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

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

A polynucleotide according to the invention can equally be obtained by site-directed mutagenesis starting from the nucleotide sequence of the IFN α -21 gene by modifying the wild-type nucleotide by the mutated nucleotide for each SNP on the nucleotide sequence
30 SEQ ID NO. 1.

For example, a polynucleotide according to the invention, comprising a SNP c794g can be obtained by site-directed mutagenesis starting from the nucleotide sequence of the

WO 02/079249

15

PCT/EP02/04062

IFN α -21 gene by modifying the nucleotide cytosine (c) by the nucleotide guanine (g) at position 794 on the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

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

An isolated polynucleotide can equally include, for example, nucleotide sequences coding for pre-, pro- or pre-pro-protein amino acid sequences or marker amino acid sequences, such as hexa-histidine peptide.

A polynucleotide of the invention can equally be associated with nucleotide sequences coding for other proteins or protein fragments in order to obtain fusion proteins or other purification products.

A polynucleotide according to the invention can equally include nucleotide sequences such as the 5' and/or 3' non-coding sequences, such as, for example, transcribed or non-transcribed sequences, translated or non-translated sequences, splicing signal sequences, polyadenylated sequences, ribosome binding sequences or even sequences which stabilize mRNA.

A nucleotide sequence complementary to the nucleotide or polynucleotide sequence is defined as one that can hybridize with this nucleotide sequence, under stringent conditions.

"Stringent hybridization conditions" is generally but not necessarily understood as the chemical conditions that permit a hybridization when the nucleotide sequences have an identity of at least 80 %, preferably greater than or equal to 90 %, still more preferably greater than or equal to 95 % and most preferably greater than or equal to 97 %.

The stringent conditions can be obtained according to methods well known to a person skilled in the art and, for example, by an incubation of the polynucleotides, at 42° C, in a solution comprising 50 % formamide, 5xSSC (150 mM of NaCl, 15 mM of trisodium citrate), 50 mM of sodium phosphate (pH = 7.6), 5x Denhardt Solution, 10 % dextran sulfate and 20 μ g denatured salmon sperm DNA, followed by washing the filters at 0.1x SSC, at 65° C.

Within the scope of the invention, when the stringent hybridization conditions permit hybridization of the nucleotide sequences having an identity equal to 100 %, the nucleotide sequence is considered to be strictly complementary to the nucleotide sequence such as described under a).

WO 02/079249

16

PCT/EP02/04082

It is understood within the meaning of the present invention that the nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence comprises at least one anti-sense SNP according to the invention.

Thus, for example, if the nucleotide sequence comprises the SNP c794g, its
5 complementary nucleotide sequence comprises the cytosine (c) nucleotide at the equivalent of position 794.

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

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

- 10 a) a polynucleotide having 80 to 100 % identity (preferably at least 90 % identity, more preferably 95 % identity and particularly 100 % identity) with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, and/or
- b) a polynucleotide according to the invention comprising at least one SNP
in order to identify, hybridize and/or amplify all or part of a polynucleotide having 80 to
15 100 % identity (preferably at least 90 % identity, more preferably 95 % identity and particularly 100 % identity) with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or if necessary its coding sequence (of the nucleotide 670 to the nucleotide 1239),
it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following
SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c.

20 Genotyping and determination of the frequency of a SNP

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

- 25 a) a polynucleotide having 80 to 100 % identity (preferably at least 90 % identity, more preferably 95 % identity and particularly 100 % identity) with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, and/or
- b) a polynucleotide according to the invention comprising at least one SNP
for the genotyping of all or part of a polynucleotide having 80 to 100 % identity
(preferably at least 90 % identity, more preferably 95 % identity and particularly 100 %
identity) with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 or if necessary its coding sequence
30 (from nucleotide 670 to nucleotide 1239),
it being understood that each one of these sequences comprises at least one of the following
SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c.

According to the invention, the genotyping may be carried out on an individual or a

WO 02/079249

17

PCT/EP02/04082

population of individuals.

Within the meaning of the invention, genotyping is defined as a process for the determination of the genotype of an individual or of a population of individuals. Genotype consists of the alleles present at one or more specific loci.

5 "Population of individuals" is understood as a group of individuals selected in random or non-random fashion. These individuals can be humans, animals, microorganisms or plants.

Usually, the group of individuals comprises at least 10 persons, preferably from 100 to 300 persons.

10 The individuals can be selected according to their ethnicity or according to their phenotype, notably those who are affected by the following disorders and/or diseases: carcinomas, melanomas, lymphomas, leukemias and cancers of the liver, neck, head and kidneys, cardiovascular diseases, metabolic diseases such as those that are not connected with the immune system like, for example, obesity, infectious diseases in particular viral infections like hepatitis B and C and AIDS, pneumonias, ulcerative colitis, diseases of the central nervous
15 system like, for example, Alzheimer's disease, schizophrenia and depression, the rejection of tissue or organ grafts, healing of wounds, anemia in dialyzed patients, allergies, asthma, multiple sclerosis, osteoporosis, psoriasis, rheumatoid arthritis, Crohn's disease, autoimmune diseases and disorders, gastrointestinal disorders or even disorders connected with chemotherapy treatments.

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

Multiple technologies exist which can be implemented in order to genotype SNPs (see notably Kwok Pharmacogenomics, 2000, vol 1, pp 95-100. "High-throughput genotyping assay approaches"). These technologies are based on one of the four following principles:
25 allele specific oligonucleotide hybridization, oligonucleotide elongation by dideoxynucleotides optionally in the presence of deoxynucleotides, ligation of allele specific oligonucleotides or cleavage of allele specific oligonucleotides. Each one of these technologies can be coupled to a detection system such as measurement of direct or polarized fluorescence, or mass spectrometry.

30 Genotyping can notably be carried out by minisequencing with hot ddNTPs (2 different ddNTPs labeled by different fluorophores) and cold ddNTPs (2 different non labeled ddNTPs), in connection with a polarized fluorescence scanner. The minisequencing protocol with reading of polarized fluorescence (FP-TDI Technology or Fluorescence Polarization

WO 02/079249

18

PCT/EP02/04082

Template-direct Dye-Terminator Incorporation) is well known to a person skilled in the art.

It can be carried out on a product obtained after amplification by polymerase chain reaction (PCR) of the DNA of each individual. This PCR product is selected to cover the polynucleotide genic region containing the studied SNP. After the last step in the PCR
5 thermocycler, the plate is then placed on a polarized fluorescence scanner for a reading of the labeled bases by using fluorophore specific excitation and emission filters. The intensity values of the labeled bases are reported on a graph.

For the PCR amplification, in the case of a SNP of the invention, the sense and antisense primers, respectively, can easily be selected by a person skilled in the art according
10 to the position of the SNPs of the invention.

For example, the sense and antisense nucleotide sequences for the PCR amplification primers can be, respectively:

SEQ ID NO. 3: Sense primer: GGTTC AAGGTTACCCATCTC

SEQ ID NO. 4: Antisense primer: TTTGAAATGGCAGAAGTCAT

15 The nucleotide sequences permit amplification of a fragment having a length of 696 nucleotides, from nucleotide 620 to nucleotide 1315 in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

A statistical analysis of the frequency of each allele (allelic frequency) encoded by the gene comprising the SNP in the population of individuals is then achieved, which permits
20 determination of the importance of their impact and their distribution in the different sub-groups and notably, if necessary, the diverse ethnic groups that constitute this population of individuals.

The genotyping data are analyzed in order to estimate the distribution frequency of the different alleles observed in the studied populations. The calculations of the allelic
25 frequencies can be carried out with the help of software such as SAS-suite® (SAS) or SPLUS® (MathSoft). The comparison of the allelic distributions of a SNP of the invention across different ethnic groups of the population of individuals can be carried out by means of the software ARLEQUIN® and SAS-suite®.

30 SNPs of the invention as genetic markers.

Whereas SNPs modifying functional sequences of genes (e.g. promoter, splicing sites, coding region) are likely to be directly related to disease susceptibility or resistance, all SNPs (functional or not) may provide valuable markers for the identification of one or several

WO 02/079249

19

PCT/EP02/04082

genes involved in these disease states and, consequently, may be indirectly related to these disease states (See Cargill et al. (1999). *Nature Genetics* 22:231-238; Riley et al. (2000). *Pharmacogenomics* 1:39-47; Roberts L. (2000). *Science* 287: 1898-1899).

Thus, the present invention also concerns a databank comprising at least one of the following SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c, in a polynucleotide of the IFN α -21 gene.

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

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

- (i) at least one of the following SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c, in a polynucleotide of the IFN α -21 gene, and
- (ii) a disease or a resistance to a disease.

The present invention also concerns the use of at least one of the following SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c, in a polynucleotide of the IFN α -21 gene, for developing diagnostic/prognostic kits for a disease or a resistance to a disease.

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

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

Expression vector and host cells.

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

Numerous expression systems can be used, including without limitation chromosomes, episomes, and derived viruses. More particularly, the recombinant vectors used can be derived from bacterial plasmids, transposons, yeast episomes, insertion elements, yeast chromosome elements, viruses such as baculovirus, papilloma viruses such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fox pox viruses, pseudorabies viruses, retroviruses.

These recombinant vectors can equally be cosmid or phagemid derivatives. The nucleotide sequence can be inserted in the recombinant expression vector by methods well known to a person skilled in the art such as, for example, those that are described in

WO 02/079249

20

PCT/EP02/04082

MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrook *et al.*, 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

The recombinant vector can include nucleotide sequences that control the regulation of the polynucleotide expression as well as nucleotide sequences permitting the expression and the transcription of a polynucleotide of the invention and the translation of a polypeptide of the invention, these sequences being selected according to the host cells that are used.

Thus, for example, an appropriate secretion signal can be integrated in the recombinant vector so that the polypeptide, encoded by the polynucleotide of the invention, will be directed towards the lumen of the endoplasmic reticulum, towards the periplasmic space, on the membrane or towards the extracellular environment.

The present invention also has for its object a host cell comprising a recombinant vector according to the invention.

The introduction of the recombinant vector in a host cell can be carried out according to methods that are well known to a person skilled in the art such as those described in BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis *et al.*, 2nd ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995, and MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, *supra*, such as transfection by calcium phosphate, transfection by DEAE dextran, transfection, microinjection, transfection by cationic lipids, electroporation, transduction or infection.

The host cell can be, for example, bacterial cells such as cells of streptococci, staphylococci, *E. coli* or *Bacillus subtilis*, cells of fungi such as yeast cells and cells of *Aspergillus*, *Streptomyces*, insect cells such as cells of *Drosophila* S2 and of *Spodoptera* Sf9, animal cells, such as CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 cells and human cells of the subject to treat or even plant cells.

The host cells can be used, for example, to express a polypeptide of the invention or as active product in pharmaceutical compositions, as will be seen hereinafter.

Polypeptide.

The present invention also has for its object an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 80 % identity, preferably at least 90 % identity, more preferably at least 95 % identity and still more preferably at least 99 % identity with:

- a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2 or with

WO 02/079249

21

PCT/EP02/04082

- b) the amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2,
it being understood that each of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, K179E.
- 5 The polypeptide of the invention can equally comprise:
- a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or
b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2,
it being understood that each of the amino acid sequences under a) and b) contains at least
- 10 one of the following coding SNPs: A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, K179E.
- The polypeptide of the invention can more particularly consist of:
- a) the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or
b) the amino acid sequence containing the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2,
- 15 it being understood that each one of the amino acid sequences under a) and b) contains at least one of the following coding SNPs: A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, K179E.
- Preferably, a polypeptide according to the invention contains a single coding SNP selected from the group consisting of: A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E.
- 20 The present invention equally has for its object a process for the preparation of the above-described polypeptide, in which a previously defined host cell is cultivated in a culture medium and said polypeptide is isolated from the culture medium.
- The polypeptide can be purified starting from the host cells' culture medium, according to methods well known to a person skilled in the art such as precipitation with the
- 25 help of chaotropic agents such as salts, in particular ammonium sulfate, ethanol acetone or trichloroacetic acid, acid extraction; ion exchange chromatography; phosphocellulose chromatography; hydrophobic interaction chromatography; affinity chromatography; hydroxyapatite chromatography or exclusion chromatographies.
- "Culture medium" is understood as the medium in which the polypeptide of the
- 30 invention is isolated or purified. This medium can be composed of the extracellular medium and/or the cellular lysate. Techniques well known to a person skilled in the art equally permit the latter to give back an active conformation to the polypeptide, if the conformation of said polypeptide was altered during the isolation or the purification.

Antibodies.

The present invention also has for its object a process for obtaining an immunospecific antibody.

5 "Antibody" is understood as the monoclonal, polyclonal, chimeric, simple chain, humanized antibodies as well as the Fab fragments, including Fab or immunoglobulin expression library products.

An immunospecific antibody can be obtained by immunization of an animal with a polypeptide according to the invention.

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

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

15 The term "immunospecific" means that the antibody possesses a better affinity for the polypeptide of the invention than for other polypeptides known in the prior art.

The immunospecific antibodies can be obtained by administration of a polypeptide of the invention, of one of its fragments, of an analog or of an epitopic fragment or of a cell expressing this polynucleotide in a mammal, preferably non human, according to methods

20 well known to a person skilled in the art.

For the preparation of monoclonal antibodies, typical methods for antibody production can be used, starting from cell lines, such as the hybridoma technique (Kohler et al., *Nature* (1975) 256: 495-497), the trioma technique, the human B cell hybridoma technique (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* (1983) 4: 72) and the EBV hybridoma

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

The techniques of single chain antibody production such as described, for example, in

30 US Patent No. 4,946, 778 can equally be used.

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

Agents interacting with the polypeptide of the invention.

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

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

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

These compounds can be activating (agonists) or inhibiting (antagonists) agents of intrinsic activity of a polypeptide according to the invention. These compounds can equally be ligands or substrates of a polypeptide of the invention. See Coligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1 (2), Chapter 5 (1991).

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

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

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

Step d) of the above process can be implemented by using an agent to be tested that is directly or indirectly labeled. It can also include a competition test, by using a labeled or non-labeled agent and a labeled competitor agent.

25 It can equally be determined if an agent to be tested generates an activation or inhibition signal on cells expressing the polypeptide of the invention by using detection means appropriately chosen according to the signal to be detected.

30 Such activating or inhibiting agents can be polynucleotides, and in certain cases oligonucleotides or polypeptides, such as proteins or antibodies, for example.

The present invention also has for its object a process for the identification of an agent activated or inhibited by a polypeptide according to the invention, comprising:

- a) the preparation of a recombinant vector comprising a polynucleotide according to the

WO 02/079249

24

PCT/EP02/04082

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

An agent activated or inhibited by the polypeptide of the invention is an agent that
responds, respectively, by an activation or an inhibition in the presence of this polypeptide.
The agents, activated or inhibited directly or indirectly by the polypeptide of the invention,
can consist of polypeptides such as, for example, membranal or nuclear receptors, kinases
10 and more preferably tyrosine kinases, transcription factor or polynucleotides.

Detection of diseases.

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

- a) Determining the presence or the absence of a polynucleotide according to the invention in
the genome of a subject;
- b) Determining the level of expression of a polynucleotide according to the invention in a
subject;
- 20 c) Determining the presence or the absence of a polypeptide according to the invention in a
subject;
- d) Determining the concentration of a polypeptide according to the invention in a subject;
and/or
- e) Determining the functionality of a polypeptide according to the invention in a subject.

25 These biological characteristics may be analyzed in a subject or in a sample from a
subject.

These biological characteristics may permit to carry out a genetic diagnosis and to
determine whether a subject is affected or at risk of being affected or, to the contrary, presents a
partial resistance to the development of a disease, an indisposition or a disorder linked to the
30 presence of a polynucleotide according to the invention and/or a polypeptide according to the
invention.

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

WO 02/079249

25

PCT/EP02/04082

diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS.

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

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

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

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

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

This process also permits genetic diagnosis of a disease or of a resistance to a disease linked to the presence, in a subject, of the mutant allele encoded by a SNP according to the invention.

Preferably, in step a), the presence or absence of a polynucleotide, containing at least one coding SNP such as previously defined, is going to be detected.

The detection of the polynucleotide may be carried out starting from biological samples from the subject to be studied, such as cells, blood, urine, saliva, or starting from a biopsy or an autopsy of the subject to be studied. The genomic DNA may be used for the detection directly or after a PCR amplification, for example. RNA or cDNA can equally be used in a similar fashion.

It is then possible to compare the nucleotide sequence of a polynucleotide according to the invention with the nucleotide sequence detected in the genome of the subject.

The comparison of the nucleotide sequences can be carried out by sequencing, by DNA hybridization methods, by mobility difference of the DNA fragments on an electrophoresis gel with or without denaturing agents or by melting temperature difference. See Myers et al., Science (1985) 230: 1242. Such modifications in the structure of the

WO 02/079249

26

PCT/EP02/04082

nucleotide sequence at a precise point can equally be revealed by nuclease protection tests, such as RNase and the S1 nuclease or also by chemical cleaving agents. See Cotton et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1985) 85:4397-4401. Oligonucleotide probes comprising a polynucleotide fragment of the invention can equally be used to conduct the screening.

5 Many methods well known to a person skilled in the art can be used to determine the expression of a polynucleotide of the invention and to identify the genetic variability of this polynucleotide (See Chee et al., Science (1996), Vol 274, pp 610-613).

In step b), the level of expression of the polynucleotide may be measured by quantifying the level of RNA encoded by this polynucleotide (and coding for a polypeptide) according to methods well known to a person skilled in the art as, for example, by PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blot, and other hybridization methods.

10 In step c) and d) the presence or the absence as well as the concentration of a polypeptide according to the invention in a subject or a sample from a subject may be carried out by well known methods such as, for example, by radioimmunoassay, competitive binding tests, Western blot and ELISA tests.

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

A person skilled in the art can identify the threshold above or below which appears the sensitivity or, to the contrary, the resistance to the disease, the indisposition or the disorder evoked above, with the help of prior art publications or by conventional tests or assays, such as those that are previously mentioned.

20 In step e), the determination of the functionality of a polypeptide according to the invention may be carried out by methods well known to a person skilled in the art as, for example, by in vitro tests such as above mentioned or by an use of host cells expressing said polypeptide.

Therapeutic compounds and treatments of diseases.

30 The present invention also has for its object a therapeutic compound containing, by way of active agent, a polypeptide according to the invention.

The invention also relates to the use of a polypeptide according to the invention, for the manufacture of a therapeutic compound intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases. These diseases can be disorders and/or human diseases, such

WO 02/079249

27

PCT/EP02/04062

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

5 Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS.

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

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

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

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

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

20 Preferably, a polypeptide according to the invention can also be used for the manufacture of a therapeutic compound intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases, such as certain viral infections such as chronic hepatitis B and C, leukemias such as hairy-cell leukemia and chronic myeloid leukemia, multiple myelomas, follicular lymphomas, carcinoid tumors, malignant melanomas, metastasized renal carcinomas, 25 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, as well as tumors that appear following an immune deficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, and genital warts or venereal diseases.

30 Certain of the compounds permitting to obtain the polypeptide according to the invention as well as the compounds obtained or identified by or from this polypeptide can likewise be used for the therapeutic treatment of the human body, i.e. as a therapeutic compound.

This is why the present invention also has for an object a medicament containing, by way of active agent, a polynucleotide according to the invention containing at least one

WO 02/079249

28

PCT/EP02/04082

previously defined coding SNP, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody.

The invention also relates to the use of a polynucleotide according to the invention containing at least one previously defined coding SNP, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases. These diseases can be disorders and/or human diseases, such as cancers and tumors, infectious diseases, venereal diseases, immunologically related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS.

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

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

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

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

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

Preferably, the invention concerns the use of a polynucleotide according to the invention containing at least one previously defined SNP, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody, for the manufacture of a medicament intended for the prevention or the treatment of different human disorders and/or diseases, such as certain viral infections such as chronic hepatitis B and C, leukemias such as hairy-cell leukemia and chronic myeloid leukemia, multiple myelomas, follicular lymphomas, carcinoid tumors, malignant melanomas, metastasized renal

WO 02/079249

29

PCT/EP02/04082

carcinomas, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, as well as tumors that appear following an immune deficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, and genital warts or venereal diseases.

5 The dosage of a polypeptide and of the other compounds of the invention, useful as active agent, depends on the choice of the compound, the therapeutic indication, the mode of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject and the judgment of the doctor.

When it is used as active agent, a polypeptide according to the invention is generally administered at doses ranging between 1 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of the subject.

10 The invention also has as an object a pharmaceutical composition that contains, as active agent, at least one above-mentioned compound such as a polypeptide according to the invention, a polynucleotide according to the invention containing at least one previously defined SNP, a previously defined recombinant vector, a previously defined host cell, and/or a previously defined antibody, as well as a pharmaceutically acceptable excipient.

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

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

The active agent(s) can be incorporated into excipients usually employed in pharmaceutical compositions such as talc, Arabic gum, lactose, starch, dextrose, glycerol, ethanol, magnesium stearate, cocoa butter, aqueous or non-aqueous vehicles, fatty substances 25 of animal or vegetable origin, paraffinic derivatives, glycols, various wetting agents, dispersants or emulsifiers, preservatives.

The active agent(s) according to the invention can be employed alone or in combination with other compounds such as therapeutic compounds such as other cytokines such as interleukins or interferons, for example.

30 The different formulations of the pharmaceutical compositions are adapted according to the mode of administration.

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

WO 02/079249

30

PCT/EP02/04082

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

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

The present invention equally has as an object the use:

- a) of a therapeutically effective quantity of a polypeptide according to the invention, and/or
 - b) of a polynucleotide according to the invention, and/or
 - c) of a host cell from the subject to be treated, previously defined,
- to prepare a therapeutic compound intended to increase the expression or the activity, in a subject, of a polypeptide according to the invention.

Thus, to treat a subject who needs an increase in the expression or in the activity of a polypeptide of the invention, several methods are possible.

It is possible to administer to the subject a therapeutically effective quantity of a polypeptide of the invention, with a pharmaceutically acceptable excipient.

It is likewise possible to increase the endogenous production of a polypeptide of the invention by administration to the subject of a polynucleotide according to the invention. For example, this polynucleotide can be inserted in a retroviral expression vector. Such a vector can be isolated starting from cells having been infected by a retroviral plasmid vector containing RNA encoding for the polypeptide of the invention, in such a fashion that the transduced cells produce infectious viral particles containing the gene of interest. See Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, Chapter 20, in Human Molecular Genetics, Strachan and Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996).

In accordance with the invention, a polynucleotide containing at least one coding SNP such as previously defined will be preferably used.

It is equally possible to administer to the subject host cells belonging to him, these host cells having been preliminarily taken and modified so as to express the polypeptide of the invention, as previously described.

The present invention equally relates to the use:

- a) of a therapeutically effective quantity of a previously defined immunospecific antibody, and/or

b) of a polynucleotide permitting inhibition of the expression of a polynucleotide according to the invention,

in order to prepare a therapeutic compound intended to reduce the expression or the activity, in a subject, of a polypeptide according to the invention.

5 Thus, it is possible to administer to the subject a therapeutically effective quantity of an inhibiting agent and/or of an antibody such as previously defined, possibly in combination, with a pharmaceutically acceptable excipient.

10 It is equally possible to reduce the endogenous production of a polypeptide of the invention by administration to the subject of a complementary polynucleotide according to the invention permitting inhibition of the expression of a polynucleotide of the invention.

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

15 The present invention concerns also the use of a *IFN α -21* protein for the preparation of a medicament for the prevention or the treatment of a patient having a disorder or a disease caused by a *IFN α -21* variant linked to the presence in the genome of said patient of a nucleotide sequence having at least 95% identity (preferably, 97% identity, more preferably 99% identity and particularly 100% identity) with the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1, provided that said nucleotide sequence comprises one of the following SNPs: c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, t1265c, t1277c.

20 Preferably, said medicament is used for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of cancers and tumors, infectious diseases, venereal diseases, immunologically related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

25 Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising 30 Kaposi's sarcoma in the case of AIDS.

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

Said immunologically and auto-immunologically related diseases may include the

WO 02/079249

32

PCT/EP02/04062

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

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

Said diseases of the central nervous system may include Alzheimer's disease,

- 5 Parkinson's disease, schizophrenia and depression.

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

Mimetic compounds of an IFN α -21 polypeptide comprising the SNPs of the invention.

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

a) amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or

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

- 15 provided that said amino acid sequences under a) and b) comprise the SNP K179E.

Said biological activity may be evaluated, for example, by measuring the capacity to stimulate dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, in vitro or in vivo antiviral activity, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line as

- 20 described in the experimental part.

As mentioned in the experimental section, the K179E mutated IFN α -21 differs from the wild-type IFN α -2 in the following ways:

▲ K179E mutated IFN α -21 possesses higher capacity to stimulate dendritic cell maturation;

- 25 ▲ K179E mutated IFN α -21 possesses a higher capacity to stimulate IFN-gamma release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes;

▲ K179E mutated IFN α -21 possesses an antiviral activity in cell culture infected with VSV which is lower than that of wild-type IFN α -2.

- 30 As mentioned in the experimental part, K179E mutated IFN α -21 possesses a cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line which is slightly lower than that of the natural wild-type IFN α -21.

Also as mentioned in the experimental part, the K179E mutated IFN α -21 possesses a cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line which is similar to that of wild-type IFN α -

WO 02/079249

33

PCT/EP02/04082

2, and an antiviral activity in EMCV mouse model which is similar to that of wild-type IFN α -2.

A new compound of the invention, such as previously defined, may possess a biological activity substantially similar to that of the K179E mutated IFN α -21.

5 Said compound may also have a biological activity which is even lower or higher, according to the kind of biological activity considered, than that of the K179E mutated IFN α -21.

Said compound may be a biochemical compound, such as a polypeptide or a peptide for example, or an organic chemical compound, such as a synthetic peptide-mimetic for
10 example.

The present invention also concerns the use of a polypeptide of the invention containing the K179E SNP, for the identification of a compound such as defined above.

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

15 a) Determining the biological activity of the compound to be tested, such as dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, in vitro or in vivo antiviral activity, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, for example;

b) Comparing:

20 i) the activity determined in step a) of the compound to be tested, with
ii) the activity of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences
comprise the K179E SNP; and

25 c) Determining on the basis of the comparison carried out in step b) whether the compound to be tested has a substantially similar, or lower or higher, activity compared to that of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences comprise the K179E
30 SNP.

Preferably, the compound to be tested may be previously identified from synthetic peptide combinatorial libraries, high-throughput screening, or designed by computer-aided drug design so as to have the same three-dimensional structure as that of the polypeptide of

WO 02/079249

34

PCT/EP02/04082

amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences comprise the K179E SNP.

- 5 The present invention also concerns a new compound having a biological activity substantially similar to that of the polypeptide of:
- a) amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or
 - b) amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2;
- 10 provided that said amino acid sequences under a) and b) comprise the SNPs Q114H and V127D.

Said biological activity may be evaluated, for example, by measuring the capacity to stimulate dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, in vitro or in vivo antiviral activity, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line as

15 described in the experimental part.

As mentioned in the experimental section, IFN α -21 containing both SNPs Q114H and V127D (such double mutation shall be referred to hereafter as "Q114H/V127D") differs from the wild-type IFN α -2 in the following ways:

- 20 ▲ the Q114H/V127D mutated IFN α -21 possesses a higher capacity to stimulate IFN-gamma release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes;
- ▲ the Q114H/V127D mutated IFN α -21 possesses a lower antiviral activity in cell culture infected with VSV;

As mentioned in the experimental part, the Q114H/V127D mutated IFN α -21

25 possesses a cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line which is lower than that of the natural wild-type IFN α -21.

Also as mentioned in the experimental part, the Q114H/V127D mutated IFN α -21 possesses an antiviral activity in EMCV mouse model which is similar to that of wild-type IFN α -2, a capacity to stimulate IL-10, IL-12 and TNF- α release by monocytes which is

30 similar to that of wild-type IFN α -2, and cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line which is similar to that of wild-type IFN α -2.

A new compound of the invention, such as previously defined, may possess a biological activity substantially similar to that of the Q114H/V127D mutated IFN α -21.

WO 02/079249

35

PCT/EP02/04082

Said compound may also have a biological activity which is even lower or higher, according to the kind of biological activity considered, than that of the Q114H/V127D mutated IFN α -21.

5 Said compound may be a biochemical compound, such as a polypeptide or a peptide for example, or an organic chemical compound, such as a synthetic peptide-mimetic for example.

The present invention also concerns the use of a polypeptide of the invention containing the Q114H/V127D SNP, for the identification of a compound such as defined above.

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

a) Determining the biological activity, such as dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, in vitro or in vivo antiviral activity, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, for

15 example;

b) Comparing:

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

ii) the activity of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2;

20

provided that said amino acid sequences comprise the Q114H/V127D SNP; and

c) Determining on the basis of the comparison carried out in step b) whether the compound to be tested has a substantially similar, or lower or higher, activity compared to that of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence

25

comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences comprise the Q114H/V127D SNP.

Preferably, the compound to be tested may be previously identified from synthetic peptide combinatorial libraries, high-throughput screening, or designed by computer-aided

30 drug design so as to have the same three-dimensional structure as that of the polypeptide of amino acid sequence SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2; provided that said amino acid sequences comprise the Q114H/V127D SNPs.

WO 02/079249

36

PCT/EP02/04082

The methods to identify and design compounds are well known by a person skilled in the art.

Publications referring to these methods may be, for example:

- 5 - Silverman R.B. (1992). "Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action". Academic Press, 1st edition (January 15, 1992).
- Anderson S and Chiplin J. (2002). "Structural genomics; shaping the future of drug design" Drug Discov. Today. 7(2):105-107.
- Selick HE, Beresford AP, Tarbit MH. (2002). "The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery". Drug Discov. Today. 7(2):109-116.
- 10 - Burbidge R, Trotter M, Buxton B, Holden S. (2001). "Drug design by machine learning: support vector machines for pharmaceutical data analysis". Comput. Chem. 26(1): 5-14.
- Kauvar L.M. (1996). "Peptide mimetic drugs: a comment on progress and prospects" 14(6): 709.

15 The compounds of the invention may be used for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of cancers and tumors, infectious diseases, venereal diseases, immunologically related diseases and/or autoimmune diseases and disorders, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments.

20 Said cancers and tumors include carcinomas comprising metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising

25 Kaposi's sarcoma in the case of AIDS.

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

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

30 sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.

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

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

WO 02/079249

37

PCT/EP02/04082

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

The compounds of the invention may be used for the preparation of a medicament intended for the prevention or the treatment of one of the diseases selected from the group consisting of certain viral infections such as chronic hepatitis B and C, leukemias such as hairy-cell leukemia and chronic myeloid leukemia, multiple myelomas, follicular lymphomas, carcinoid tumors, malignant melanomas, metastasized renal carcinomas, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, as well as tumors that appear following an immune deficiency, such as Kaposi's sarcoma in the case of AIDS, and genital warts or venereal diseases.

EXPERIMENTAL SECTION

Example 1: Modeling of a protein encoded by a polynucleotide of nucleotide sequence containing SNP c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g and of the protein encoded by the nucleotide sequence of the wild-type reference gene

In a first step the three-dimensional structure of IFN α -21 was constructed starting from that of IFN α -2 whose structure is available in the PDB database (code 1ITF) and by using the software Modeler (MSI, San Diego, CA).

The mature polypeptide fragment was then modified in such a fashion as to reproduce the mutation A19G, Q79K, Q91H, V104D, C139stop, and K156E.

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

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

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

The result of this modeling is visualized on Figures 1, 2, 3, 4, and 5.

Example 2: Genotyping of the SNPs c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g in a population of individuals

The genotyping of SNPs is based on the principle of the minisequencing wherein the product is detected by a reading of polarized fluorescence. The technique consists of a fluorescent minisequencing (FP-TDI Technology or Fluorescence Polarization Template-

WO 02/079249

38

PCT/EP02/04082

direct Dye-terminator Incorporation).

The minisequencing is performed on a product amplified by PCR from genomic DNA of each individual of the population. This PCR product is chosen in such a manner that it covers the genic region containing the SNP to be genotyped. After elimination of the PCR primers that have not been used and the dNTPs that have not been incorporated, the minisequencing is carried out.

The minisequencing consists of lengthening an oligonucleotide primer, placed just upstream of the site of the SNP, by using a polymerase enzyme and fluorolabeled dideoxynucleotides. The product resulting from this lengthening process is directly analyzed by a reading of polarized fluorescence.

All these steps, as well as the reading, are carried out in the same PCR plate.

Thus, the genotyping requires 5 steps:

- 1) Amplification by PCR
- 2) Purification of the PCR product by enzymatic digestion
- 3) Elongation of the oligonucleotide primer
- 4) Reading
- 5) Interpretation of the reading

The genotyping steps 1 and 2 are carried out in the same conditions for each of the SNPs c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g. The steps 3, 4 and 5 are specific to each one of these polymorphisms.

1) The PCR amplification of the nucleotide sequence of the IFN α -21 gene is carried out starting from genomic DNA coming from 268 individuals of ethnically diverse origins.

These genomic DNAs were provided by the Coriell Institute in the United States.

The 268 individuals are distributed as follows:

Phylogenic Population	Specific Ethnic Population	Total	%
African American	African American	50	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>50</i>	<i>18.7</i>
Amerind	South American Andes	10	68.7
	South West American Indians	5	33.3
	<i>Subtotal</i>	<i>15</i>	<i>5.6</i>
Caribbean	Caribbean	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>10</i>	<i>3.7</i>
European Caucasoid	North American Caucasian	79	79.8
	Iberian	10	10.1
	Italian	10	10.1
	<i>Subtotal</i>	<i>99</i>	<i>36.9</i>
Mexican	Mexican	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>10</i>	<i>3.7</i>
Northeast Asian	Chinese	10	50.0
	Japanese	10	50.0
	<i>Subtotal</i>	<i>20</i>	<i>7.5</i>
Non-European Caucasoid	Greek	8	21.6
	Indo-Pakistani	9	24.3
	Middle-Eastern	20	54.1
	<i>Subtotal</i>	<i>37</i>	<i>13.8</i>
Southeast Asian	Pacific Islander	7	41.2
	South Asian	10	58.8
	<i>Subtotal</i>	<i>17</i>	<i>6.3</i>
South American	South American	10	100.0
	<i>Subtotal</i>	<i>10</i>	<i>3.7</i>
		<i>Total</i>	<i>288</i>
			<i>100</i>

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

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

5 primers:

SEQ ID NO. 5: Sense primer: GGTCAAGGTTACCCATCTC

SEQ ID NO. 6: Antisense primer: TTTGAAATGGCAGAAGTCAT

These nucleotide sequences permit amplification of a fragment of a length of 696 nucleotides, from nucleotide 620 to nucleotide 1315 in the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1.

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

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

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

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

- These reagents are distributed in a black PCR plate having 384 wells provided by
- 5 ABGene (ref: TF-0384-k). The plate is sealed, centrifuged, then placed in a thermocycler for 384-well plates (Tetrad of MJ Research) and undergoes the following incubation: PCR Cycles: 1 min at 94° C, followed by 36 cycles composed of 3 steps (15 sec. at 94° C, 30 sec. at 56° C, 1 min at 68° C).

- 2) The PCR amplified product is then purified using two enzymes: Shrimp Alkaline
- 10 Phosphatase (SAP) and exonuclease I (Exo I). The first of these enzymes permits the dephosphorylation of the dNTPs which have not been incorporated during the PCR amplification, whereas the second eliminates the single stranded DNA residues, in particular the primers which have not been used during the PCR.

This digestion is done by addition, in each well of the PCR plate, of a reaction

- 15 mixture of 5 μ l per sample. This reaction mixture is composed of the following reagents:

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

Once filled, the plate is sealed, centrifuged, then placed in a thermocycler for 384 well plates (Tetrad of MJ Research) and undergoes the following incubation: Digestion SAP-EXO: 45 min at 37° C, 15 min at 80° C.

The elongation or minisequencing step is then carried out on the product of PCR digested by addition of a reaction mixture of 5 µl per prepared sample.

The minisequencing 3) and the reading steps 4) and interpretation of reading 5) are specific to each SNP c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g.

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

3) Minisequencing

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

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

SNP	Primers tested	Optimal condition for the genotyping
c794g	SEQ ID NO. 7: Sense: gagggccttgatactctgg SEQ ID NO. 8: Antisense: gagagattctcccatttgt	antisense primer + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra
c973a	SEQ ID NO. 9: Sense: actcatctgctactgggaa SEQ ID NO. 10: Antisense: aaattttctagaggctct	antisense primer + dGTP-R110 + ddTTP-Tamra
g1011c	SEQ ID NO. 11: Sense: tttccactgaacttaacca SEQ ID NO. 12: Antisense: gctccaggtcattcagctg	antisense primer + ddGTP-R110 + ddCTP-Tamra
t1049a	SEQ ID NO. 13: Sense: agcctgcgtgatacaggagg SEQ ID NO. 14: Antisense: ggggagctcttcccaccca	antisense primer + ddATP-R110 + ddTTP-Tamra
t1155a	SEQ ID NO. 15: Sense: gagaagaatacagcccttg SEQ ID NO. 16: Antisense: gctctgacaacctcccaggc	antisense primer + ddATP-R110 + ddTTP-Tamra
a1204g	SEQ ID NO. 17: Sense: tgagatcctctcttataca SEQ ID NO. 18: Antisense: taatctttctgaaaaattt	sense primer + ddGTP-R110 + ddATP-Tamra

The minisequencing of the SNPs was first validated over 16 samples, then genotyped over the set of the population of individuals composed of 268 individuals and 10 controls.

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

42

The elongation or minisequencing step is then carried out as indicated in the following table:

Supplier	Reference	Reactant	Initial conc.	Vol. per tube (μ l)	Final conc.
Own preparation		Elongation Buffer ¹ (X)	5	1	1
Life Technologies	On request	Miniseq Primer (μ M) A or B	10	0.5	1
AP Biotech	27-2051 (61,71,81)-01	ddNTPs ² (μ M) 2 are non labeled	2.5 of each	0.25	0.125 of each
NEN	Nel 472/5 and Nel 492/5	ddNTPs ² (μ M) 2 are labeled with Tamra and R110	2.5 of each	0.25	0.125 of each
AP Biotech	E79000Z	Thermo-sequenase	3.2 U/ μ l	0.125	0.4 U/ reaction
		H ₂ O	Qsp 5 μ l	3.125	
		digested PCR product		10	
		Total volume		15	

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

² For the ddNTPs, a mixture of the 4 bases is carried out according to the polymorphism studied. Only the 2 bases of interest (wild-type nucleotide/mutated nucleotide) composing the functional SNP are labeled, either in Tamra, or in R110. For example:

10 For SNP c973a, the mixture of ddNTPs is composed of:

- 2.5 μ M of ddCTP non labeled,
- 2.5 μ M of ddATP non-labeled,
- 2.5 μ M of ddTTP (1.875 μ M of ddTTP non labeled and 0.625 μ M of ddTTP Tamra labeled),
- 2.5 μ M of ddGTP (1.875 μ M of ddGTP non labeled and 0.625 μ M of ddGTP R110 labeled).

15 Once filled, the plate is sealed, centrifuged, then placed in a thermocycler for 384-well plates (Tetrad of MJ Research) and undergoes the following incubation: Elongation cycles: 1 min. at 93° C, followed by 35 cycles composed of 2 steps (10 sec. at 93° C, 30 sec. at 55° C).

20 After the last step in the thermocycler, the plate is directly placed on a polarized fluorescence reader of type Analyst® HT of LIL Biosystems Inc. The plate is read using Criterion Host® software by using two methods. The first permits reading the Tamra labeled base by using emission and excitation filters specific for this fluorophore (excitation 550-10 nm, emission 580-10 nm) and the second permits reading the R110 labeled base by using the excitation and emission filters specific for this fluorophore (excitation 490-10 nm, emission 520-10 nm). In the two cases, a dichroic double mirror (R110/Tamra) is used and the other

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

43

reading parameters are:

Z-height: 1.5 mm

Attenuator: out

Integration time: 100,000 μ sec.

5 Raw data units: counts/sec

Switch polarization: by well

Plate settling time: 0 msec

PMT setup: Smart Read (+), sensitivity 2

Dynamic polarizer: emission

10 Static polarizer: S

A file result is thus obtained containing the calculated values of mP (milliPolarization) for the Tamra filter and that for the R110 filter. These mP values are calculated starting from intensity values obtained on the parallel plane ($I//$) and on the perpendicular plane ($I\perp$) according to the following formula:

$$15 \quad MP = 1000(I// - gI\perp)/(I// + gI\perp).$$

In this calculation, the value $I\perp$ is weighted by a factor g . It is a machine parameter that must be determined experimentally beforehand.

4) and 5) Interpretation of the reading and determination of the genotypes.

The mP values are reported on a graph using Microsoft Inc. Excel software, and/or
20 Allele Caller[®] software developed by LJJ Biosystems Inc.

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

25 Up to three homogenous groups of nucleotide sequences having different genotypes may be obtained.

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

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

44

Results of the minisequencing for the SNPs c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g

After the completion of the genotyping process, the determination of the genotypes of the individuals of the population of individuals for the SNPs studied here was carried out using the graphs described above.

5 For SNP c794g, the genotype is in theory either homozygote CC, or heterozygote CG, or homozygote GG in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype GG is not detected in the population of individuals.

For SNP c973a, the genotype is in theory either homozygote CC, or heterozygote CA, or homozygote AA in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote
10 genotype AA is not detected in the population of individuals.

For SNP g1011c, the genotype is in theory either homozygote GG, or heterozygote GC, or homozygote CC in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype CC is not detected in the population of individuals.

For SNP t1049a, the genotype is in theory either homozygote TT, or heterozygote TA, or homozygote AA in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote
15 genotype AA is not detected in the population of individuals.

For SNP t1155a, the genotype is in theory either homozygote TT, or heterozygote TA, or homozygote AA in the tested individuals. In reality, and as shown below, the homozygote genotype AA is not detected in the population of individuals.

For SNP a1204g, the genotype is in theory either homozygote AA, or heterozygote AG, or homozygote GG in the tested individuals. In reality, and as shown below, the
20 homozygote genotype GG is not detected in the population of individuals.

The results of the distribution of the determined genotypes in the population of individuals and the calculation of the different allelic frequencies for the 6 SNPs studied are
25 presented in the following tables:

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

45

Phylogenetic Population	Total	c794g (A42G)						Total		
		f	(95% CI)	CC	%	CG	%		GG	%
African American	50	5,0	(0,7, 9,3)	45	90,0	5	10	50		
Amerind	15			15	100			15		
Caribbean	10			10	100			10		
European Caucasoid	99			99	100			99		
Mexican	10			10	100			10		
Non-European Caucasoid	37			37	100			37		
Northeast Asian	20			20	100			20		
South American	10			10	100			10		
Southeast Asian	17			2,9	(0, 8,6)	16	94,1	1	5,9	17
Total	268			1,1	(0,2, 2,0)	262	97,8	6	2,2	268

Phylogenetic Population	Total	c973a (Q102K)						Total
		f	(95% CI)	CC	%	CA	%	
African American	50	1,5	(0, 3,2)	49	100			49
Amerind	15			15	100			15
Caribbean	10			10	100			10
European Caucasoid	99			96	97,0	3	3,0	99
Mexican	10			9	100			9
Non-European Caucasoid	37			36	97,3	1	2,7	37
Northeast Asian	20			20	100			20
South American	10			10	100			10
Southeast Asian	17			17	100			17
Total	268			0,8	(0, 1,5)	262	98,5	4

Phylogenetic Population	Total	g1011c (Q114H)						Total
		f	(95% CI)	GG	%	GC	%	
African American	50	0,5	(0, 1,6)	49	100			49
Amerind	15			15	100			15
Caribbean	10			10	100			10
European Caucasoid	99			92	98,9	1	1,1	93
Mexican	10			10	100			10
Non-European Caucasoid	37			37	100			37
Northeast Asian	20			20	100			20
South American	10			10	100			10
Southeast Asian	17			17	100			17
Total	268			0,2	(0, 0,6)	260	99,6	1

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

46

Phylogenetic Population	Total	t1049a (V127D)								
		f	(95% CI)	TT	%	TA	%	AA	%	Total
African American	50	1,0	(0, 3.0)	48	96,0	1	2,0			49
Amerind	15			14	100					14
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99			98	100					98
Mexican	10			10	100					10
Non-European Caucasoid	37			37	100					37
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10			10	100					10
Southeast Asian	17			17	100					17
Total	268	0,2	(0, 0.6)	264	99,6	1	0,4			265

Phylogenetic Population	Total	t1155a (C162STOP)								
		f	(95% CI)	TT	%	TA	%	AA	%	Total
African American	50	1,0	(0, 3.0)	48	96,0	1	2,0			49
Amerind	15			15	100					15
Caribbean	10			9	100					9
European Caucasoid	99	3,6	(1.0, 6.2)	91	92,9	7	7,1			98
Mexican	10			10	100					10
Non-European Caucasoid	37			37	100					37
Northeast Asian	20			20	100					20
South American	10			10	100					10
Southeast Asian	17			17	100					17
Total	268	1,5	(0.5, 2.5)	257	97,0	8	3,0			264

Phylogenetic Population	Total	a1204g (K179E)								
		f	(95% CI)	AA	%	AG	%	GG	%	Total
African American	50			50	100					50
Amerind	15	3,6	(0, 10.4)	13	92,9	1	7,1			14
Caribbean	10			10	100					10
European Caucasoid	99	1,0	(0, 2.4)	97	98,0	2	2,0			99
Mexican	10	10,0	(0, 23.1)	8	80,0	2	20,0			10
Non-European Caucasoid	37	2,7	(0, 6.4)	35	94,6	2	5,4			37
Northeast Asian	20	17,5	(5.7, 29.3)	13	65,0	7	35,0			20
South American	10	5,0	(0, 14.6)	9	90,0	1	10,0			10
Southeast Asian	17			17	100					17
Total	268	2,8	(1.4, 4.2)	252	94,4	15	5,6			267

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

47

In the above table,

- N represents the number of individuals,
- % represents the percentage of individuals in the specific sub-population,
- 5 - the allelic frequency represents the percentage of the mutated allele in the specific sub-population,
- 95 % IC represents the minimal and maximal interval of confidence at 95 %.

It is necessary to specify that for SNP c973a, for example, the allele g read in antisense corresponds to the allele c read in sense, and is related to the presence of a glutamine (Q) at position 102 of the immature IFN α -21 protein sequence and therefore
10 that the allele t read in antisense corresponds to the allele a read in sense corresponding to a lysine (K) for this position in the sequence of the corresponding protein.

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

- 15 - for SNP c794g, the 6 heterozygote individuals CG come from the sub-populations African American and Southeast Asian.
- for SNP c973a, the 4 heterozygote individual CA come from the sub-populations European and non-European Caucasoid.
- 20 - for SNP g1011c, the unique heterozygote individual GC comes from the sub-population European Caucasoid.
- for SNP t1049a, the unique heterozygote individual TA comes from the sub-population African American.
- for SNP t1155a, the 8 heterozygote individual TA come from the sub-populations African American and European Caucasoid.
- 25 - for SNP a1204g, the 15 heterozygote individual AG come from the sub-populations Amerind, European and non-European Caucasoid, Mexican, Northeast Asian and South American.

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

48

Example 3. Expression of natural wild-type IFN α -21 and A42G, Q102K, Q114H/V127D, K179E mutated IFN α -21 in yeast

a) Cloning of the natural wild-type IFN α -21 and mutated IFN α -21 in the eukaryote expression vector pPicZ α -topo

5 The nucleotide sequences coding for the mature part of the natural wild-type IFN α -21 and A42G, Q102K, Q114H/V127D, K179E mutated IFN α -21 are amplified by PCR using as template genomic DNA from an individual who is heterozygote for the corresponding SNP(s).

The PCR primers permitting such an amplification are:

10 SEQ ID NO. 19: Sense primer: TGTGATCTGCCTCAGACCCAC

SEQ ID NO. 20: Antisense primer: TCATTCCTTCCTTAATCITTCTTG

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

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

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

b) Heterologous expression in *P. pastoris* and purification of the natural wild-type IFN α -21 and mutated IFN α -21 proteins

25 Two saturated pre-cultures of 50 mL of BMGY medium (2% Peptone, 1% yeast extract, 1.34% YNB, 1% Glycerol, 100 mM potassium phosphate, 0.4 mg/Liter biotin pH 6.0) containing a clone coding for natural wild-type IFN α -21 or that coding for A42G, Q102K, Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21, were carried out for 24-48 hours at 30°C at an agitation of 200 rotations per minute (rpm).

When the culture reaches a saturating cellular density (corresponding to an
30 optical density of 12 measured at a wavelength of 600 nm), it is used to inoculate, at 5 OD/mL, 250 mL of BMMY medium (2% Peptone, 1% yeast extract, 1.34% YNB, 0.5%

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

49

Methanol, 100 mM potassium phosphate, 0.4 mg/Liter biotin pH 6.0).

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

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

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

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

The first chromatographic step permits protein recovery by affinity on a blue sepharose column (Amersham Pharmacia). The presence of the protein in the collected 15 fractions is verified, on the one hand by electrophoresis of SDS PAGE type and on the other hand by immuno-detection by a specific antibody directed against the IFN α -21 protein. At this step, the purity of the protein of interest is higher than 75%.

In a second purification step, a gel filtration permits buffer exchange of the collected fractions corresponding to IFN α -21 proteins against 50 mM Tris pH 9.0, 25 20 mM NaCl.

The last step of the purification consists of a separation of the proteins on an ion exchange chromatography column.

The fractions containing the recombinant protein are injected on an anion exchange column (ResourceQ 6.0 mL, Pharmacia) equilibrated beforehand in Tris 50 25 mM pH 9, NaCl 25 mM buffer. The elution of the proteins is carried out by the migration of a gradient between 0,025 and 1 M NaCl in the Tris 50 mM pH 9 buffer.

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

30 Purified natural wild-type IFN α -21 and A42G, Q102K, Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21 proteins obtained according to this protocols, eventually

scaled-up to produce higher amount of proteins, are used for the functional tests described below.

Example 4. Evaluation of immunomodulatory activity of natural wild-type IFN α -21 and A42G, Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21

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

a) Effect of A42G, Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21 on dendritic cell maturation.

Immunomodulatory activity of A42G, Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21 was first investigated on dendritic cells maturation and compared to that of wild-type IFN α -2 chosen as representative of commercial Intron A product.

To do so, dendritic cells were first generated from adult peripheral blood monocytes cultivated in the presence of GM-CSF and IL-4 cytokines. After purification using a CD14+ cells purification kit, these dendritic cells were placed in presence of 100 ng/mL of wild-type IFN α -2 or A42G, Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21 and their phenotype was determined by FACS analysis aiming at looking for the expression of the MHC class I and II molecules and the CD40, CD80, CD86, CD83 and CD1a markers. The maturation state of these dendritic cells has also been compared to that obtained without IFN α treatment, to provide a control with non-stimulated dendritic cells.

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

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

51

	HLA ABC	HLA DR	CD40	CD80	CD86	CD83	CD1a
No stimulation	64	133	24	25	14	15	26
Wild-type IFN α -2	87	281	331	76	45	15	155
A42G mutated IFN α -21	76	127	117	37	5	8	209
Q114H/V127D mutated IFN α -21	68	122	163	46	8	8	191
K179E mutated IFN α -21	181	322	491	87	44	14	127

The results of this test demonstrate that the K179E mutated IFN α -21 protein possesses a high capacity to stimulate dendritic cell maturation, this stimulatory effect being higher than that of the wild-type IFN α -2.

5

b) Effect of Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21 on cytokine release by T lymphocytes

Immunomodulatory activity of Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21 was also investigated by measuring cytokine release by T lymphocytes placed in presence of the corresponding mutated IFN α -21 proteins and with or without a strong antigen (SEB) in order to mimic an immune response against an aggression. This test was also performed in presence of wild-type IFN α -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

To do so, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors and stimulated for 16 hours in an appropriate medium containing anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or SEB. In each culture was added 4 μ g/mL of wild-type IFN α -2 or Q114H/V127D, or K179E mutated IFN α -21. After stimulation, T lymphocytes were extracellularly labelled with anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD69 antibodies or anti-CD3, anti-CD8 and anti-CD69 antibodies, and intracellularly labelled with specific antibodies directed against Th1-type cytokines (IFN-gamma) or Th2-type cytokines (IL-10). Fluorescent cells were analysed using FACScalibur and CellQuest software.

The results obtained indicate that mutated IFN α -21 proteins and wild-type

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

52

IFN α -2 do not stimulate IL-10 and IFN-gamma release and, thus, do not activate T lymphocytes in absence of SEB. In contrast, mutated IFN α -21 proteins and wild-type IFN α -2 stimulate cytokines (IL-10 and IFN-gamma) release by SEB-activated T-lymphocytes as shown in the table below. This table represents the cytokine release by T-lymphocytes in presence of SEB, expressed as percentage of the CD4+ CD69+ cells or CD8+ CD69+ cells for the CD4+ T-lymphocytes and CD8+ T-lymphocytes, respectively, and the percentage of CD69+ cells on total cells.

T-lymphocyte		IFN gamma	IL-10	CD69+ cells/total
CD4+ CD69+	Negative control	11.9	7.5	1.26
	Wild-type IFN α -2	19.6	24.68	2.7
	Q114H/V127D IFN α -21	38.9	14.6	4.67
	K179E IFN α -21	29.5	15.1	3.84
	Negative control	8.73	0.65	4.69
CD8+ CD69+	Wild-type IFN α -2	16.37	4.26	10.02
	Q114H/V127D IFN α -21	32.24	4.91	14.98
	K179E IFN α -21	28.28	3.8	13.48

10 These results clearly demonstrate that Q114H/V127D mutated IFN α -21 and K179E mutated IFN α -21 strongly stimulate cytokine release (IFN gamma and IL-10) by CD4+ and CD8+ T-lymphocytes previously activated by SEB antigen. In this test, the interferon gamma production by T-lymphocytes is higher in presence of Q114H/V127D mutated IFN α -21 or K179E mutated IFN α -21 than in presence of wild-type IFN α -2.

15 c) Effect of Q114H/V127D or K179E mutated IFN α -21 on cytokine release by monocytes

20 Finally, immunomodulatory activity of Q114H/V127D or K179E mutated IFN α -21 was investigated by measuring cytokine release by monocytes in absence or in presence of a bacterial toxic agent (LPS). This test was also performed in presence of

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

53

wild-type IFN α -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

To do so, human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy donors and their phenotype was analyzed to determine the relative amount of CD64+ CD4dim cells (CD64 and CD4dim are markers for blood monocytes). After an over-night culture, these PBMC were incubated in the culture medium alone (not stimulated cells) or in presence of LPS (stimulated cells). In each culture, 4 μ g/mL of wild-type IFN α -2 or mutated IFN α -21 was added. After culture, cells were extracellularly labelled with anti-CD64 and anti-CD4dim, and intracellularly labelled with specific antibodies directed against Th1-type cytokines (TNF-alpha), IL-12 and IL-10.

Fluorescent cells were analyzed using FACScalibur and CellQuest software.

The results obtained indicate that mutated IFN α -21 proteins and wild-type IFN α -2 do not stimulate cytokines (IL-10, IL-12 and TNF-alpha) release in absence of LPS. In contrast, in presence of LPS, Q114H/V127D and K179E mutated IFN α -21 proteins and wild-type IFN α -2 stimulate cytokines (IL-10, IL-12 and TNF-alpha) release by monocytes as shown in the table below. This table represents cytokine release by monocytes in presence of LPS, expressed as percentage of the CD64+ CD4dim cells, and the percentage of CD4dim CD64+ cells on total cells.

20

	IL-10	IL-12	TNF-α	CD4dim CD64+ cells/total
No stimulation	16.21	8.52	13.88	3.1
Wild-type IFN α -2	49.34	34.48	50.87	2.71
Q114H/V127D IFN α -21	50.63	31.81	56.5	2.31
K179E IFN α -21	60.14	36.42	60.16	4.43

Example 5. Evaluation of *in vitro* antiproliferative activity of A42G, Q102K, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21

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

25 These tests are carried out on A42G, Q102K, Q114H/V127D, and K179E

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

54

mutated IFN α -21 proteins and wild-type IFN α -21 protein. Cells (human Daudi Burkitt's lymphoma cell line, hereinafter called "Daudi cells") cultivated beforehand in a RPMI 1640 medium (supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM of L-Glutamine) are inoculated in 96-well plates at the cellular density of $4 \cdot 10^4$ cells/well.

5 In each well, Daudi cells are placed in contact of increasing concentrations of either mutated or wild-type IFN α -21 proteins. For each IFN α -21 to be characterized, final concentrations of 0.003 pM to 600 nM are tested.

The Daudi cells are then incubated for 66 h at 37 °C under 5% CO₂ after which the Uptiblu reagent (Uptima) is added to the cultures. The rate of cell proliferation is 10 quantified by measuring the fluorescence emitted at 590nm (excitation 560nm) after an additional period of incubation of 4 hours.

The antiproliferative activity of mutated or wild-type IFN α -21 is based on the measurements of the IC50 corresponding to the concentration of IFN α -21 inhibiting 50% of the cell growth.

15 For each experimental condition, at least three experiments have been carried out in triplicates, which permits the determination of the average IC50 value for each IFN α -21. The ratio corresponding to the value of the IC50 of the mutated protein over the value of the wild-type protein permits the comparison. The results are collected in the following table (in brackets is noted the standard deviation):

	Wild-type IFN α -21	A42G IFN α -21	Q102K IFN α -21	Q114H/V127D IFN α -21	K179E IFN α -21
IC50 (pM)	1.02	2.55	1.05	13.92	3.73
Ratio wild-type/ mutated	-	2.15 (0.78)	1.30 (0.24)	13.10 (3.06)	3.72 (0.83)

20 This test demonstrates that the cellular antiproliferative activity on Daudi cells of the A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21 proteins is lower than that of wild-type IFN α -21. In particular, the cellular antiproliferative activity on Daudi cells is approximately 10 to 16-fold lower in presence of Q114H/V127D IFN α -21 by 25 comparison with wild-type IFN α -21.

b) on the TF-1 erythroleukemia cell line

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

55

The effect of A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21 was also evaluated on TF-1 erythroleukemia cell line. This test was also performed in presence of wild-type IFN α -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

5 To do so, TF-1 cells were placed in contact of increasing concentrations of mutated IFN α -21 or wild-type IFN α -2 (0.001 to 1000 ng/mL) and the cell proliferation measured.

The results are expressed as the IC30 corresponding to the IFN α concentration inhibiting proliferation of 30% of cells and collected in the following table:

	Wild-type IFN α -2	A42G IFN α -21	Q114H/V127D IFN α -21	K179E IFN α -21
10 IC30 (ng/mL)	0.66	2.33	1.97	1.62

These data indicate that the three mutated IFN α -21 have a weak antiproliferative effect on TF-1 cells, and this effect is similar to that of wild-type IFN α -2, suggesting that the A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21's hematologic toxicity is not superior than that of wild-type IFN α -2.

15

Example 6. Evaluation of the antiviral activity of A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21

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

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

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

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

56

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

- 5 The antiviral activity of A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21 has been evaluated both *in vitro* in cell culture and *in vivo* in mouse model. Both tests have been carried out in parallel with wild-type IFN α -2 used as control and chosen as representative of the Intron A commercial product.

- 10 a) Antiviral activity *in vitro* in cell culture

This assay permits evaluation of the antiviral activity of A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21 and wild-type IFN α -2 in cell culture using the vesicular stomatitis virus (VSV).

- 15 To do so, WISH human epithelial cells are cultivated for 24 hours in the presence of decreasing concentrations of mutated IFN α -21 and wild-type IFN α -2. Then, the cells are infected by the virus of vesicular stomatitis (VSV) during 24 to 48 additional hours and the cell lysis is measured.

- The antiviral effect of the different IFN α tested is determined by comparing the IC50 value corresponding to the IFN concentration inhibiting 50% of cell lysis induced by the VSV.

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

	Wild-type IFN α -2	A42G IFN α -21	Q114H/V127D IFN α -21	K179E IFN α -21
IC50 (ng/mL)	4	14	22	25

- 25 Thus, in cell culture infected with VSV, the A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFN α -21 have a lower antiviral activity than the wild-type IFN α -2.

- b) Antiviral activity *in vivo* in mouse model

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

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

57

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

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

Groups of 20, six-week old Swiss mice were infected intraperitoneally (ip) with 100 x LD₅₀ EMCV and treated one hour later, and then once daily for 3 days thereafter with 2 µg of A42G, Q114H/V127D, K179E mutated IFNα-21 or wild-type IFNα-2 preparations. A control group was performed with animals having been treated with excipient only. The animals were followed daily for survival for 21 days.

Results are presented in Figure 6 and indicate that the relative survival rate of the mice which have been treated with A42G, Q114H/V127D, or K179E mutated IFNα-21 is much higher than the survival rate of the non-treated mice but remains similar to that observed for the mice which have been treated with wild-type IFNα-2.

All of these results demonstrate that A42G, Q114H/V127D, and K179E mutated IFNα-21 possess unique biological properties.

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

58

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide comprising all or part of:
 - a) the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 provided that such nucleotide sequence comprises at least one SNP selected from the group consisting of c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, and t1265c; or
 - b) a nucleotide sequence complementary to a nucleotide sequence under a).
2. The isolated polynucleotide of claim 1, comprising nucleotides 670 to 1239 of SEQ ID NO. 1, provided that the sequence contains at least one coding SNP selected from the group consisting of c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, and a1204g.
3. The isolated polynucleotide of claim 1, wherein said polynucleotide is composed of at least 10 nucleotides.
4. An isolated polynucleotide that codes for a polypeptide comprising all or part of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having at least one coding SNP selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E.
5. An isolated polynucleotide that codes for a polypeptide comprising all or part of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having the two coding SNPs Q114H and V127D.
6. An isolated polynucleotide that codes for a polypeptide comprising all or part of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having the coding SNP K179E.
7. A method for identifying or amplifying all or part of a polynucleotide having 80 to 100% identity with nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 comprising hybridizing, under appropriate hybridization conditions, said polynucleotide with the polynucleotide of claim 1.
8. A method for genotyping all or part of a polynucleotide having 80 to 100% identity with nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 comprising the steps of amplifying a region of interest in the genomic DNA of a subject or a population of subjects, and determining the allele of at least one positions in the nucleotide sequence SEQ ID

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

59

- NO. 1 chosen from the group consisting of 794, 973, 1011, 1049, 1155, 1204, and 1265.
9. The method of claim 8, wherein the genotyping is carried out by minisequencing.
10. A recombinant vector comprising a polynucleotide according to claim 1.
- 5 11. A host cell comprising a recombinant vector according to claim 10.
12. A method for separating a polypeptide, comprising cultivating a host cell according to claim 11 in a culture medium and separating said polypeptide from the culture medium.
13. The polypeptide encoded by the isolated polynucleotide of claim 1.
- 10 14. An isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E.
- 15 15. The polypeptide according to claim 13, comprising amino acids 24 through 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having at least one coding SNP selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E.
16. The polypeptide according to claim 13, comprising amino acids 24 through 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having the two coding SNPs Q114H and V127D.
- 20 17. The polypeptide according to claim 13, comprising amino acids 24 through 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, and having the coding SNP K179E.
18. A method for obtaining an immunospecific antibody, comprising immunizing an animal with the polypeptide according to claim 13, and collecting said antibody from said animal.
- 25 19. The immunospecific antibody resulting from the method of claim 18.
20. A method for identifying an agent among one or more compounds to be tested which activates or inhibits the activity of an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

60

selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E, said method comprising:

- a) providing host cells comprising the recombinant vector according to claim 10;
 - b) contacting said host cells with said compounds to be tested,
 - 5 c) determining the activating or inhibiting effect upon the activity of said polypeptide whereby said activating or inhibiting agent is identified.
21. A method for identifying an agent among one or more compounds to be tested whose activity is potentiated or inhibited by an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP
- 10 selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E, said method comprising:
- a) providing host cells comprising the recombinant vector according to claim 10;
 - b) contacting said host cells with said compounds to be tested,
 - c) determining the potentiating or inhibiting effect upon the activity of said agent
 - 15 whereby said potentiated or inhibited agent is identified.
22. A method for analyzing the biological characteristics of a subject, comprising performing at least one of the following steps:
- a) Determining the presence or the absence of the polynucleotide according to claim 1 in the genome of a subject;
 - 20 b) Determining the level of expression of the polynucleotide according to claim 1 in a subject;
 - c) Determining the presence or the absence of the polypeptide according to claim 13 in a subject;
 - d) Determining the concentration of the polypeptide according to claim 13 in a
 - 25 subject; or
 - e) Determining the functionality of the polypeptide according to claim 13 in a subject.
23. A therapeutic agent comprising one or more compounds selected from the group

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

61

- consisting of an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 provided that such nucleotide sequence comprises at least one SNP selected from the group consisting of c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, and t1265c, or a nucleotide sequence complementary to said
- 5 nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E; an antibody specific for said polypeptide.
- 10 24. A method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group consisting of cancers and tumors, infectious diseases, immunologically and auto-immunologically related diseases, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the
- 15 agent of claim 23, plus a pharmaceutically acceptable excipient.
25. The method of claim 24, wherein said cancers and tumors comprise metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck,
- 20 head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS.
26. The method of claim 24, wherein said metabolic diseases comprise non-immune associated diseases such as obesity.
27. The method of claim 24, wherein said infectious diseases comprise viral infections
- 25 including chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.
28. The method of claim 24, wherein said diseases of the central nervous system comprise Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.
29. The method of claim 24, wherein said immunologically and auto-immunologically
- 30 related diseases comprise the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma,

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

62

- psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.
30. A method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group consisting of healing of wounds, anemia in dialyzed patient, and/or osteoporosis, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the agent of claim 23, plus a pharmaceutically acceptable excipient.
31. A method for increasing or decreasing the activity in a subject of the polypeptide according to claim 13 comprising administering a therapeutically effective quantity of one or more of: an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 provided that such nucleotide sequence comprises at least one SNP selected from the group consisting of c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, and t1265c, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequence; a recombinant vector comprising said polynucleotide; a host cell comprising said recombinant vector, wherein said host cell may be obtained from said subject to be treated; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E; an antibody specific for said polypeptide; and a pharmaceutically acceptable excipient.
32. A method for preventing or treating in an individual a disorder or a disease linked to the presence in the genome of said individual of the polynucleotide of claim 1, comprising administering a therapeutically effective amount of one or more of: an isolated polynucleotide comprising all or part of the nucleotide sequence SEQ ID NO. 1 and having at least one SNP selected from the group consisting of c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, and t1265c, or a nucleotide sequence complementary to said nucleotide sequences; a recombinant vector comprising one of said polynucleotides; a host cell comprising said recombinant vector; an isolated polypeptide comprising all or part of amino acid sequence SEQ ID NO. 2 and having at least one coding SNP selected from the group consisting of A42G, Q102K, Q114H, V127D, C162stop, and K179E; an antibody specific for one of said

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

63

polypeptides; and a pharmaceutically acceptable excipient.

33. A method for determining statistically relevant associations between at least one SNP selected from the group consisting of c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, and t1265c, in the IFN α -21 gene, and a disease or resistance to disease comprising:
- 5
- a) Genotyping a group of individuals;
 - b) Determining the distribution of said disease or resistance to disease within said group of individuals;
 - c) Comparing the genotype data with the distribution of said disease or resistance to disease; and
 - 10 d) Analyzing said comparison for statistically relevant associations.
34. A method for diagnosing or determining a prognosis of a disease or a resistance to a disease comprising detecting at least one SNP selected from the group consisting of c794g, c973a, g1011c, t1049a, t1155a, a1204g, and t1265c, in the IFN α -21 gene.
- 15 35. A method for identifying a compound among one or more compounds to be tested having a biological activity substantially similar to the activity of Q114H/V127D mutated IFN α -21 gene product, said method comprising the steps of:
- a) Determining the biological activity of said compound, such as dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, in vitro or in vivo antiviral activity, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line;
 - 20 b) Comparing the activity determined in step a) of said compound with the activity of the Q114H/V127D mutated IFN α -21 gene product.
 - 25 c) Determining, on the basis of the comparison carried out in step b), whether said compound has a substantially similar activity compared to that of the Q114H/V127D mutated IFN α -21 gene product.
36. The method according to claim 35, wherein said compounds to be tested are

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

64

- identified from synthetic peptide combinatorial libraries, high-throughput screening, or designed by computer-aided drug design to have the same three-dimensional structure as that of the polypeptide of SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, provided that said amino acid sequences comprise the Q114H and V127D SNPs.
- 5
37. The compound identified by the method of claim 35.
38. A method for identifying a compound among one or more compounds to be tested having a biological activity substantially similar to the activity of K179E mutated IFN α -21 gene product, said method comprising the steps of:
- 10
- a) Determining the biological activity of said compound, such as dendritic cell maturation, cytokine release by CD4+ or CD8+ T-lymphocytes, cytokine release by monocytes, in vitro or in vivo antiviral activity, cellular antiproliferative activity on Daudi Burkitt's cell line, cellular antiproliferative activity on TF-1 cell line;
- 15
- b) Comparing the activity determined in step a) of said compound with the activity of the K179E mutated IFN α -21 gene product.
- c) Determining, on the basis of the comparison carried out in step b), whether said compound has a substantially similar activity compared to that of the K179E mutated IFN α -21 gene product.
- 20
39. The method according to claim 38, wherein said compounds to be tested are identified from synthetic peptide combinatorial libraries, high-throughput screening, or designed by computer-aided drug design to have the same three-dimensional structure as that of the polypeptide of SEQ ID NO. 2, or of amino acid sequence comprising the amino acids included between positions 24 and 189 of the amino acid sequence SEQ ID NO. 2, provided that said amino acid sequences comprise the K179E SNP.
- 25
40. The compound identified by the method of claim 38.
41. A method for preventing or treating in an individual a disease selected from the group

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

65

- consisting of cancers and tumors, infectious diseases, immunologically and auto-immunologically related diseases, cardiovascular diseases, metabolic diseases, central nervous system diseases, and disorders connected with chemotherapy treatments, comprising administering to said individual a therapeutically effective amount of the agent of claim 37 or 40, plus a pharmaceutically acceptable excipient.
- 5
42. The method of claim 41, wherein said cancers and tumors comprise metastasizing renal carcinomas, melanomas, lymphomas comprising follicular lymphomas, and cutaneous T cell lymphoma, leukemias comprising hairy-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia and chronic myeloid leukemia, cancers of the liver, neck, head and kidneys, multiple myelomas, carcinoid tumors and tumors that appear following an immune deficiency comprising Kaposi's sarcoma in the case of AIDS.
- 10
43. The method of claim 41, wherein said infectious diseases comprise viral infections including chronic hepatitis B and C and HIV/AIDS, infectious pneumonias, and venereal diseases, such as genital warts.
- 15
44. The method of claim 41, wherein said immunologically and auto-immunologically related diseases comprise the rejection of tissue or organ grafts, allergies, asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease and ulcerative colitis.
- 20
45. The method of claim 41, wherein said diseases of the central nervous system comprise Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and depression.
46. The method of claim 41, wherein said metabolic diseases comprise non-immune associated diseases such as obesity.

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

1/6

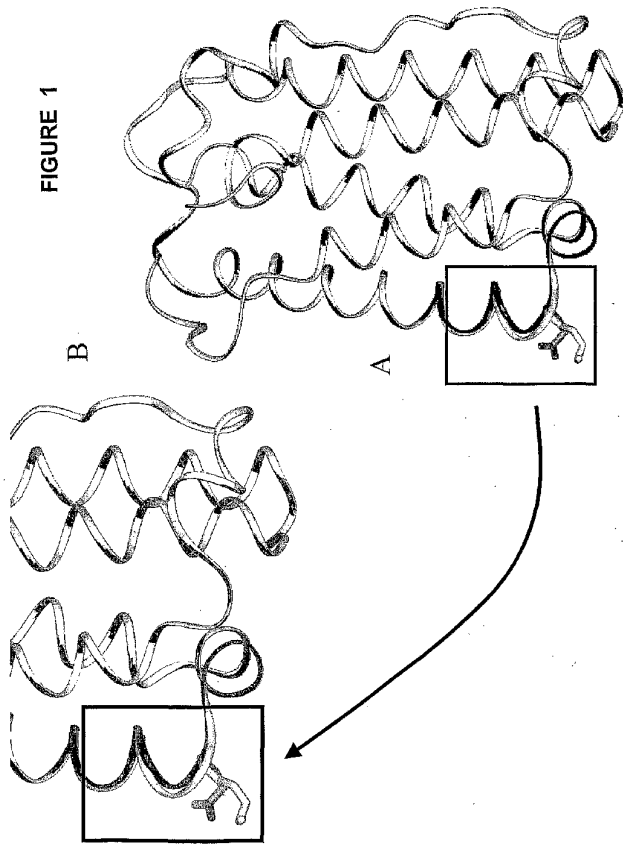
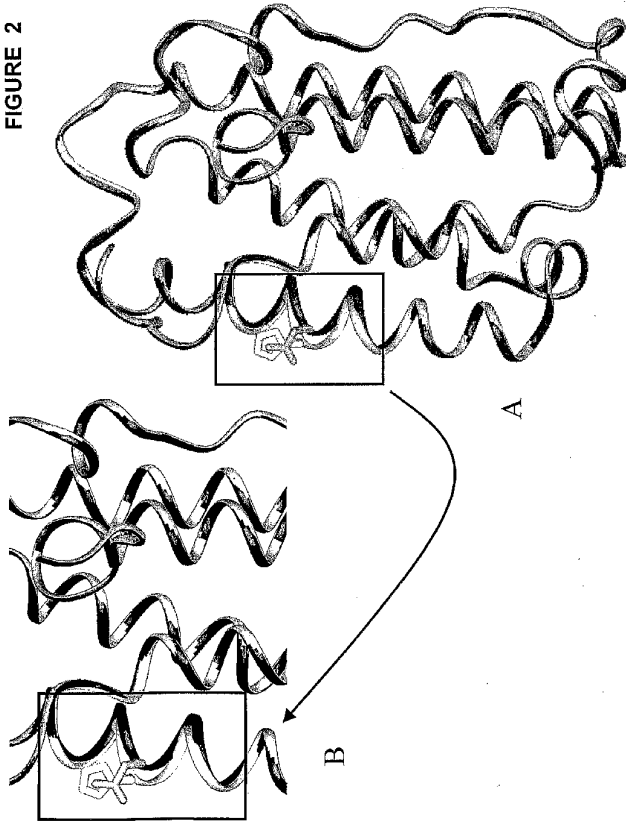


FIGURE 2



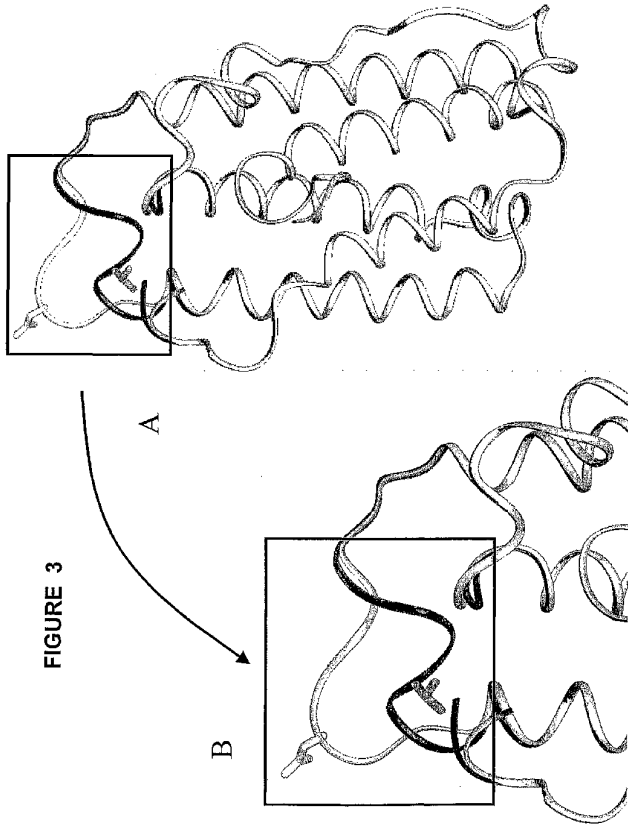


FIGURE 3

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

4/6

FIGURE 4

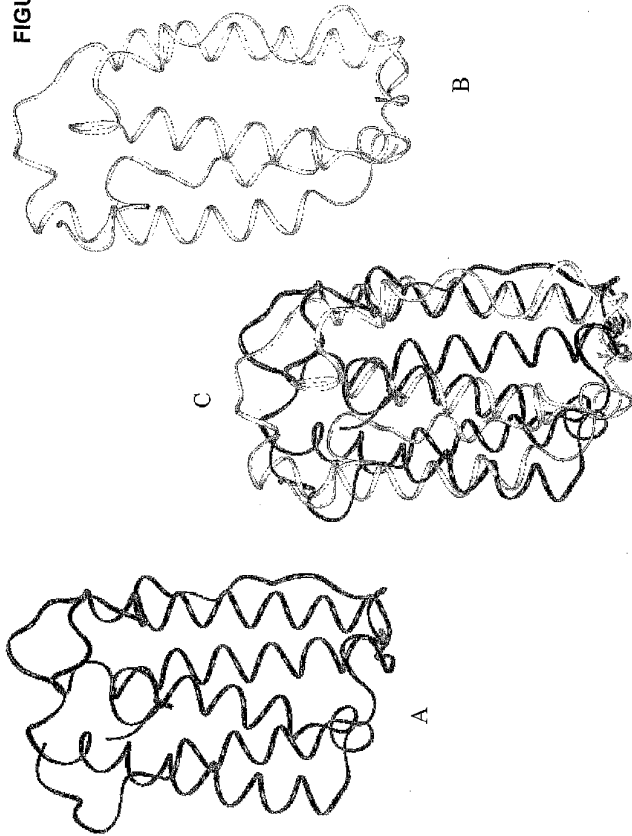


FIGURE 5

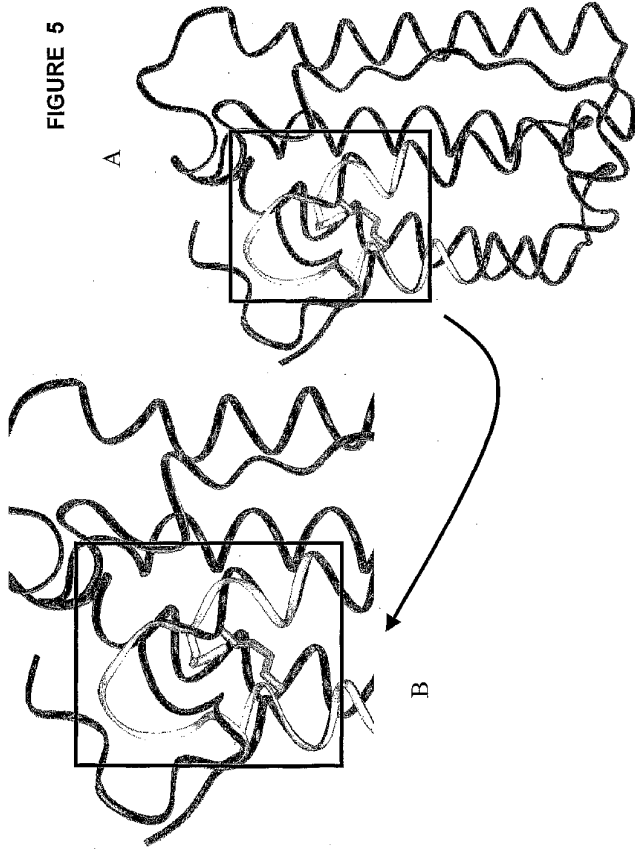
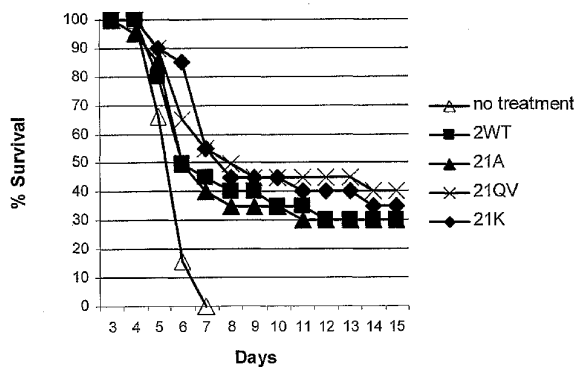


FIGURE 6



WO 02/079249

PCT/EP02/04082

1

SEQUENCE LISTING

<110> Escary, Jean-Louis
 <120> New Polynucleotides and Polypeptides of the IFNalpha-21 Gene
 <130> 021349/0012
 <150> FR 0104404
 <151> 2001-03-30
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 2001
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 atttgtcat ataaagcaaa attcnaagct tcatatata actatgagaa aaattttaa 60
 aaattattga ttcataatct tagcagtttt gaatgattaa ctatgtaatt atattcatal 120
 tattaatgtg tatttatata gatttttatt ttgcatatgt aatttoataa aacaaaatit 180
 acatgaacaa attacattaa aagttattcc acaaatatac ttatcaaat aagttaaatg 240
 tcaatagctt ttaaacttag abtttagttt aacattctcg tcaattottha ctttgaataa 300
 aaagagcaaa cttttatagtt tttatctgtg aagtagagat atacatatta tacataaata 360
 gataagccaa atctgtgta ctaaaatttc atgaagattt caattagaaa aaaataccat 420
 aaaatgtttt gagtgcaggg gaaaaatagg caatgatgaa aaaaaatgaa aaacatctgt 480
 aaacacatgt agagagtcca taaagaaagc aaaaacagag atagaagta aaactagggc 540
 atttagaaaa tggaaattag tatgttcaat atttaagacc tacgcacaga gcaaatcttt 600
 cagaaaaact agagcccaag gttcaagggt acccatctca agtagcctag caatattggc 660
 aacatcccaa tggccctgtc cttttcttta ctgatggcgg tgctgggtgt cagctacaaa 720
 tccatctgtt ctctgggctg tgatctcct cagaccaca gcctgggtaa taggagggcc 780
 ttgatactcc tggcacaat gggagaatc tctcctttct cctgcctgaa ggacagacat 840
 gaacttggat tccccagga ggagtttgat ggcaaccagt tocagaaggc tcaagccato 900
 tctgtcctcc atgagatgat ccagcagacc ttcaatctct tcagcacaaa ggactcatct 960

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

2

```

gctacttggg aacagagcct cctagaaaaa ttttccactg aacttaacca gcagctgaat 1020
gacctggaag cctgcgtgat acaggagggt ggggtggaag agactcccct gatgaatgtg 1080
gactccatcc tggctgtgaa gaaatacttc caaagaatca ctctttatct gacagagaag 1140
aaatacagcc cttgtgectg ggaggttgtc agagcagaaa tcatgagatc cttctcttta 1200
tcaaaaattt tcaagaagag attaaggagg aaggaatgaa acctgtttca acatggaat 1260
gatctgtatt gactaataca ccagtcacac cttctatgac ttctgccatt tcaagactc 1320
atctctccta taaccaccgc atgagttgaa tcaaaaattt cagatctttt caggagtgt 1380
aggaacatc atgtttacct gtgcaggcac tagtcttta cagatgacca tgcgataga 1440
tctaattatc tatctattga aatatttatt tatttattag atttaaatta tttttgtcca 1500
tgaataalta tgtgtacttt tacatttgtt tatatcaaaa tatgtgattt atatttagtc 1560
aatatattat tctttttaat taaattttac tattaaaact ttttatatta tttgtttatt 1620
ctttaataaa gaaataccaa gcccaaatgt gcaatctcat taaagaatgg atggtacaat 1680
tcatttacco atcatcattg tatocaaatt gtaagtaaaa attgactttc tctaagcgag 1740
gttttatatt gcccttagga tatccaggtg aacatacaaa atacogtttt cgtttctctg 1800
tatcttttat ttttgaagg aaaataataa ctatacttcc taatacctgt tacattaaat 1860
gctatagtga gaagaantaa naacaaatga aattcagtaa aatgagca aggcatatca 1920
aaattttttt taaaaaagta gtagatatcc tctatagcag acaagtagac atctaagtgc 1980
aagtgccat tggtaacctg a 2001

```

```

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

```

```

<400> 2

```

```

Met Ala Leu Ser Phe Ser Leu Leu Met Ala Val Leu Val Leu Ser Tyr
1          5          10          15
Lys Ser Ile Cys Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu
20          25          30
Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser
35          40          45
Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu
50          55          60

```

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

3

Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu
 65 70 75 80
 His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
 85 90 95
 Ser Ala Thr Trp Glu Gln Ser Leu Leu Glu Lys Phe Ser Thr Glu Leu
 100 105 110
 Asn Gln Gln Leu Asn Asp Met Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly
 115 120 125
 Val Glu Glu Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys
 130 135 140
 Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser
 145 150 155 160
 Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser
 165 170 175
 Leu Ser Lys Ile Phe Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
 180 185

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gggtcaaggt taccatctc

20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 gggtcaaggt taccatctc

20

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

<400> 5
 gggtcaaggt taccatctc

20

<210> 6
 <211> 20

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

4

<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 6
tttgaatgg cagaagtcac 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 7
gagggccttg atactcctgg 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 8
gagagattct tcccattgt 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 9
actcactgc tacttgggaa 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 10
aaatcttct aggagctct 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 11
ttttccactg aacttaacca 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

5

<213> Homo sapiens
<400> 12
gottccaggt cattcagctg 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 13
agcctgcgtg atacaggagg 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 14
ggggagtctc ttccacccca 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 15
gagaagaat acagcccttg 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 16
gctctgaaa cctcccaggc 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 17
tgagatcctt ctcttatca 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA

WO 02/079249

PCT/EP02/04082

6

```
<213> Homo sapiens
<400> 18
aaatctttct tgaaaaattt 20

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 19
tgtgatctgc ctcagaccac 21

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 20
tcattccttc ctcttaac tttcttg 27
```

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/079249 A3(51) International Patent Classification: C12Q 1/68,
G01N 33/68, C12N 15/85, 15/63, C07K 14/56, 16/00,
16/24, A61K 38/21, A61P 9/00, 31/12, 35/00, 37/00

(21) International Application Number: PCT/JP02/04082

(22) International Filing Date: 29 March 2002 (29.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 01/04404 30 March 2001 (30.03.2001) JP

(71) Applicant (for all designated States except US): GEN-
ODYSSEE [FR/FR]; Parc d'Affaires Technopolis, 3, av-
enue du Canada, Bât. Alpha, BP 810 Les Ulis, F-91974
Courtabœuf (FR).(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ESCARY, Jean-Louis
[FR/FR]; 4, rue Moxouris, F-78510 Le Chesnay (FR).(74) Agent: SANTARELLI, 14, avenue de la Grande-Armée,
B.P. 237, F-75822 Paris (FR).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
20 November 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/079249 A3

(54) Title: NEW POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES OF THE IFN α 21 GENE(57) Abstract: The present invention relates to new polynucleotides derived from the nucleotide sequence of the IFN α 21 gene comprising new SNPs, and new polypeptides derived from the natural wild-type IFN α 21 protein comprising at least one mutation caused by at least one SNP of the invention as well as their therapeutic uses.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Classification No
		PCT/EP 02/04082
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/68 C12N15/85 C12N15/63 C07K14/56 C07K16/00 C07K16/24 A61K38/21 A61P9/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C12N C07K G01N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ULLRICH A ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A PORTION OF HUMAN CHROMOSOME 9 CONTAINING A LEUKOCYTE INTERFERON GENE CLUSTER" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 156, no. 3, 15 April 1982 (1982-04-15), pages 467-486, XP000605299 ISSN: 0022-2836 * see especially nucleotide 2386 within Fig.2 * abstract page 468, paragraph 2 page 483, line 6 - line 14; figures 2,10,11 --- -/--	1-4, 7-11, 13-15,22
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 May 2003		13/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 600 nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/04082
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 84 00776 A (CETUS CORP) 1 March 1984 (1984-03-01) * see especially the nucleotide no.163 of the encoding sequence; as well as the claims * the whole document ---	1-4, 7, 8, 10-15, 22-24, 27
X	US 4 801 685 A (PESTKA SIDNEY ET AL) 31 January 1989 (1989-01-31)	1-4, 7-11, 13-15, 22
Y	* see especially Figure 3-1, nucleotide 125, as well as Figure 9 * abstract; claims 1-5; figures 3, 4, 9 ---	5, 6, 23-25, 29-34
X	VELAN B ET AL: "Bovine interferon alpha genes. Structure and expression" EMBL, 1987, XP002187983 * Accession number P05007; see especially amino acid residue no.102 * abstract ---	4, 14, 15
Y	WO 01 25438 A (MAXYGEN INC ;CHEN TEDDY (US); HEINRICHS VOLKER (US); PATTEN PHILLI) 12 April 2001 (2001-04-12) * see especially SEQ ID NOS: 19, 22, 24 (nucleotide 393) * abstract; claims 1, 20-26, 31, 41, 42, 60, 64, 66-80, 104-123 page 1, line 25 - line 32 page 9, line 3 - line 31 page 85, line 1 -page 100, line 31 ---	1-20, 22-34
Y	HUSSAIN M ET AL.: "Identification of interferon-alpha7, -alpha14 and -alpha21 variants in the genome of a large human population" JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, vol. 16, 1996, pages 853-859, XP008015634 abstract * see especially Fig.1 * page 853, column 2, paragraph 1; figures 1, 3; table 2 --- -/--	1-19, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/04082
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WEBER H ET AL.: "Single amino acid changes that render human IFN-alpha2 biologically active on mouse cells" THE EMBO JOURNAL, vol. 6, no. 3, 1987, pages 591-598, XP002242107 cited in the application * see especially Fig.'s 1 and 3, as well as table 2 * the whole document ---	20
Y	SYVANEN A-CH ET AL: "IDENTIFICATION OF INDIVIDUALS BY ANALYSIS OF BIALLELIC DNA MARKERS, USING PCR AND SOLID-PHASE MINISEQUENCING" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, US, vol. 52, no. 1, 1993, pages 46-59, XP002050638 ISSN: 0002-9297 the whole document ---	8,9,33, 34
Y	WO 00 39280 A (VIRAGEN INC) 6 July 2000 (2000-07-06) abstract; claim 20 ---	24-29,33
Y	JANSEN R L H ET AL.: "Interleukin-2 and interferon-alpha in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 12, 1992, pages 70-73, XP001148923 the whole document ---	24,25, 31-34
Y	MITA E ET AL.: "Predicting interferon therapy efficacy from hepatitis C virus genotype and RNA titer" DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, vol. 39, no. 5, 1995, pages 977-982, XP008016510 the whole document ---	24,27, 31-34
Y	YAMADA R ET AL: "IDENTIFICATION OF 142 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN 41 CANDIDATE GENES FOR RHEUMATOID ARTHRITIS IN THE JAPANESE POPULATION" HUMAN GENETICS, BERLIN, DE, vol. 106, 2000, pages 293-297, XP002947356 the whole document --- -/--	24,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Information	Application No.
		PCT/EP	02/04082
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
A	COHEN S ET AL.: "CLONING, EXPRESSION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF A NEW VARIANT OF HUMAN INTERFERON ALPHA IDENTIFIED IN VIRUS INDUCED LYMPHOBLASTOID CELLS" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, BASEL, CH, vol. 60, 1985, pages 111-122, XP002062570 the whole document -----		
P,A	FINK T ET AL.: "Biological characterization of three novel variants of IFN-alpha13 produced by human placental trophoblast" PLACENTA, vol. 22, September 2001 (2001-09), pages 673-680, XP001058217 the whole document -----		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern. Application No. PCT/EP 02/04082
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 23-32 are directed to a therapeutic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the gene's expression products as related to the underlying polymorphisms.
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 35-46 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 04082

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 35-46

Present claims 35-46 relate to methods as well as compounds resulting from such methods, defined by reference to a desirable characteristic or property, namely in possessing a biological activity being substantially similar to the activity of the Q114H/V127D- or K179E-mutated IFN α -21 gene product (claims 35 and 38), and further, in using compounds having the same three-dimensional structure as (parts of) the mutated polypeptide of SEQ ID NO:2 (claims 36, 37, 39 and 40), such methods and compounds being used for preventing or treating diseases (claims 41-46). Without comprising clear essential technical features allowing the person skilled in the art to understand what exactly is meant with '...substantially similar to the activity of the Q114H/V127D- or K179E-mutated IFN α -21 gene product...' or '...having the same three-dimensional structure...', it is without saying that such terms could be interpreted in any possible way. Thus, they are not fulfilling the requirements of giving a clear teaching about the content and the scope of these claims, and especially, how to execute the teaching of these claims successfully. In fact, these claims cover all possible methods and deriving compounds having these characteristics or properties without giving any clue in form of technical features how to do so, in contrast to the requirements of Article 6 PCT (need for support) and/or Article 5 PCT (need for disclosure). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT) since an attempt is made to define the methods and deriving compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, by lacking any technical feature making these claims clear, supported and disclosed, no search has been carried out for claims 35-46.

In addition, a limited search has been executed for claims 1-34 since it is not clear how and to what extent '...or part of the nucleotide sequence...' or '...or part of the amino acid sequence...' should be interpreted and be limited. From the description and the examples given, it appears that what is meant, is a mutated form of the IFN α -21 gene and its encoded gene product, provided they comprise at least one of the polymorphisms as claimed. However, present claims 1-34, comprising the wording '...or part of...' relate to an extremely large number of possible gene or polypeptide fragments. In fact, the claims contain so many possible permutations that a lack of clarity and/or conciseness within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the whole scope of these claims impossible. Consequently, the search has been limited and carried out to those parts of these claims which do appear to be clear and/or concise and/or supported, namely a mutated IFN α -21 gene and its encoded gene product, comprising at least one of the polymorphisms as claimed, as well as methods of genotyping and screening relying on

International Application No. PCT/EP 02/04082

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

such a mutated gene.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

 International Application No.
 PCT/EP 02/04082

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8400776 A	01-03-1984	AU 1946283 A	07-03-1984
		CA 1217440 A1	03-02-1987
		EP 0116090 A1	22-08-1984
		IT 1172320 B	18-06-1987
		WO 8400776 A1	01-03-1984
US 4801685 A	31-01-1989	EP 0072541 A2	23-02-1983
		JP 58041849 A	11-03-1983
		US 4810645 A	07-03-1989
WO 0125438 A	12-04-2001	AU 8001300 A	10-05-2001
		CA 2385045 A1	12-04-2001
		EP 1238082 A2	11-09-2002
		JP 2003511031 T	25-03-2003
		WO 0125438 A2	12-04-2001
WO 0039280 A	06-07-2000	US 6350589 B1	26-02-2002
		US 6433144 B1	13-08-2002
		EP 1140144 A2	10-10-2001
		WO 0039280 A2	06-07-2000

フロントページの続き

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

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

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 エスカリー, ジャン - ルイ

フランス国, エフ - 7 8 5 1 0 ル シュスネー, リュ モクリス, 4

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 CB01 DA36 FA29 FB03 FB12 FB13 GC15
4B024 AA01 AA11 BA23 BA61 CA03 CA04 CA09 HA12 HA17
4B063 QA12 QA18 QA19 QQ47 QR55 QR80 QS32
4B064 AG09 AG26 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 BA01 BA22 CA53 DA22
ZA022 ZA122 ZA162 ZA182 ZA362 ZA552 ZA592 ZA662 ZA682 ZA702
ZA752 ZA892 ZA962 ZA972 ZB072 ZB082 ZB132 ZB152 ZB262 ZB272
ZB332 ZB352 ZC212 ZC552
4C085 AA13 AA14 BB17 BB18 DD62 DD63 DD88
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 ZA02 ZA12 ZA16
ZA18 ZA36 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA70 ZA75 ZA89 ZA96
ZA97 ZB07 ZB08 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33 ZB35 ZC21
ZC55
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA16 DA75 EA21 EA22
EA23 EA27 EA28 EA29 FA74

专利名称(译)	IFN α -21基因的新多核苷酸和多肽		
公开(公告)号	JP2005503121A	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2002577873	申请日	2002-03-29
申请(专利权)人(译)	Jen'odise		
[标]发明人	エスカリージャンルイ		
发明人	エスカリー,ジャン-ルイ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/21 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/12 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/56 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/21 C12N15/85 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/53 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/12 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/56 C12N15/1034 C12N15/85 C12N2830/002 C12N2830/15 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/156		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.F A61K39/395.U A61K48/00 A61P1/04 A61P3/00 A61P3/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P31/14 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/56 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/66.G C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA23 4B024/BA61 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ47 4B063/QR55 4B063/QR80 4B063/QS32 4B064/AG09 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DA22 4C084/ZA022 4C084/ZA122 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA362 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA702 4C084/ZA752 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC212 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZA02 4C086/ZA12 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA36 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA70 4C086/ZA75 4C086/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZC21 4C086/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA16 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA23 4H045/EA27 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 中村弘 西山雅也		
优先权	2001004404 2001-03-30 FR		

摘要(译)

本发明中，IFN- α -21从新的多核苷酸，其包括新SNP，和包含至少一个突变的新的天然存在的野生型IFN- α -21蛋白的基因的核苷酸序列造成的本发明的至少一种SNP多肽及其用于治疗。

(P2005-50312)
(43) 公表日 平成17年2月3日 (2005. 2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09	C12N 15/00	Z N A A
A61K 31/7088	A61K 31/7088	2 G O 4 5
A61K 38/21	A61K 39/395	F
A61K 39/395	A61K 39/395	U
A61K 48/00	A61K 48/00	4 B O 6 3
		4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 138 頁) 最終頁に*

(21) 出願番号	特願2002-577873 (P2002-577873)	(71) 出願人	502073278
(86) (22) 出願日	平成14年3月29日 (2002. 3. 29)		ジェンオディセ
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月30日 (2003. 9. 30)		フランス国、91974 タールタブー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/004082		, レ ユリ, ベ, 810, バ アル
(87) 国際公開番号	W02002/079249		ア, アブニユ ナユ カナダ 3, パル
(87) 国際公開日	平成14年10月10日 (2002. 10. 10)		ダフェーレ テクノポリ
(31) 優先権主張番号	01/04404	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001. 3. 30)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広