



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2007/03/08
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2007/09/13
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2008/08/28
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2007/000419
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2007/101949
(30) Priorités/Priorities: 2006/03/08 (FR0602064);
2006/04/10 (FR0603150)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/23* (2006.01),
A61K 38/21 (2006.01), *C07K 14/57* (2006.01)

(71) Demandeur/Applicant:
BIOMETHODES, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
BERENQUER, JOSE, ES;
DELCOURT, MARC, FR;
CHAUTARD, HELENE, FR;
MENGUY, THIERRY, FR

(74) Agent: SMART & BIGGAR

(54) Titre : VARIANTS DE L'INTERFERON- GAMMA HUMAIN (INFGAMMA)

(54) Title: HUMAN INTERFERON-GAMMA (INFGAMMA) VARIANTS

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne des variants de l'interféron gamma humain présentant une thermostabilité améliorée, un acide nucléique codant pour celles-ci, une composition pharmaceutique les comprenant, ainsi que leur utilisation pour le traitement d'infection virale, et de cancer.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
13 septembre 2007 (13.09.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/101949 A3(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/23 (2006.01) A61K 38/21 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/000419

(22) Date de dépôt international : 8 mars 2007 (08.03.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0602064 8 mars 2006 (08.03.2006) FR
0603150 10 avril 2006 (10.04.2006) FR(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMETHODES [FR/FR]; Genavenir 8, 5, rue Henri
Besbruères, F-91030 Evry (FR).Déclaration en vertu de la règle 4.17 :
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BERENGUER, José [ES/ES]; Gimialcon, 13, Col-
menar Viejo, E-28770 Madrid (ES). DELCOURT, Marc
[FR/FR]; 43, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). CHAU-
TARD, Hélène [FR/FR]; 7, rue Léopold Robert, F-75014
Paris (FR). MENGUY, Thierry [FR/FR]; 6, résidence les
Quinconces, F-91190 Gif sur Yvette (FR).Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues
— avec la partie réservée au listage des séquences de la des-
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-
ponible sur demande auprès du Bureau international(74) Mandataires : GALLOIS, Valérie etc.; Becker et Asso-
cies, 25, rue Louis le Grand, F-75002 Paris (FR).(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 22 novembre 2007(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: HUMAN INTERFERON-GAMMA (INFGAMMA) VARIANTS

(54) Titre : VARIANTS DE L'INTERFERON- GAMMA HUMAIN (INFGAMMA)

(57) Abstract: The present invention relates to human interferon-gamma variants with improved thermostability, to a nucleic acid encoding said variants, to a pharmaceutical composition containing them, and to their use for the treatment of a viral infection and of cancer.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des variants de l'interféron gamma humain présentant une thermostabilité améliorée, un acide nucléique codant pour celles-ci, une composition pharmaceutique les comprenant, ainsi que leur utilisation pour le traitement d'infection virale, et de cancer.

WO 2007/101949 A3

VARIANTS AMELIORES DE L'INTERFERON- GAMMA HUMAIN (IFN γ)

Introduction

La présente invention relève du domaine de l'amélioration des protéines. Elle porte sur l'amélioration de l'interféron γ humain (IFN γ), ainsi que des compositions comprenant un IFN γ amélioré, un acide nucléique codant celui-ci, et leurs utilisations.

L'IFN γ est une cytokine de 166 acides aminés. La molécule possède un peptide signal permettant sa translocation membranaire et sa sécrétion, un site de clivage et une partie dite protéine mature. Le peptide signal de l'IFN γ est constitué des 23 premiers ou des 20 premiers acides aminés selon les auteurs. En effet, il existe un doute dans la littérature sur la présence du triplet d'acides aminés Cys-Tyr-Cys (CYC) en N-terminal de la séquence mature. L'IFN γ existe sous forme d'un homodimère dans lequel les deux sous-unités ne sont pas liées covalamment. Chaque sous-unité possède deux sites de N-glycosylation (positions 48 et 120 du précurseur de 166 aa). On notera, si les CYC ne sont pas inclus, l'absence de ponts disulfures et de cystéines sur la protéine mature *in vivo*. Chacun de ces monomères possède six hélices alpha avec une partie compacte constituée des 4 premières hélices alpha les plus N-terminales (hélices alpha A, B, C, et D) et une partie C-terminale composée de deux hélices alpha isolées et étroitement en interaction avec le second monomère d'IFN γ .

L'IFN γ est l'exemple type de cytokine pléiotrope au large spectre d'activités. En effet, les interférons (IFNs) sont doués d'activités telles que l'inhibition de la réplication virale, l'inhibition de la multiplication cellulaire et l'induction de l'apoptose.

Notamment, la stimulation des macrophages par l'IFN γ induit les réponses suivantes :

- l'augmentation de la phagocytose et de la bactéricidie (mécanismes directs anti-microbiens et anti-tumoraux) ;
- la stimulation des voies de présentation et de dégradation des antigènes, expression du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de type I et II à la surface des macrophages ;

- la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, ce qui a pour conséquence la production d'IgG et l'activation du complément ;

- l'activation de la NO synthase donnant naissance à la production de NO et de radicaux libres oxygénés cytotoxiques ; et/ou

- l'augmentation de la production de cytokines et la production d'IFN endogène.

L'action de l'IFN γ sur les lymphocytes T est de favoriser leur différenciation modulant ainsi la réponse immunitaire spécifique.

En raison de son large spectre d'activités (antivirale, antiproliférative et immunomodulatrice), l'IFN γ est une molécule développée comme agent thérapeutique humain dans le traitement de nombreuses maladies, de natures variées. Les IFN γ commerciaux (Actimmune, et Biogamma) sont aujourd'hui utilisés pour deux indications thérapeutiques principales : la granulomatose chronique et la fibrose pulmonaire idiopathique, en association avec la prednisolone par voie orale. De nombreuses nouvelles indications thérapeutiques secondaires sont actuellement en cours de développement à différentes phases cliniques, en particulier pour leur rôle d'immuno-suppresseur par exemple en complément des IFN α pégylés/ribavirine dans le cadre du traitement de l'Hépatite C. On peut citer aussi : infections à mycobactérie atypique ; cancer du rein ; ostéopétrose ; sclérodermie généralisée ; hépatite chronique à virus B ; hépatite chronique à virus C ; différentes infections virales dont à papillomavirus ; choc septique ; dermatite allergique ; la polyarthrite rhumatoïde ; cancer de l'ovaire ; la fibrose du foie ; l'asthme ; et le lymphome.

Les principaux effets indésirables des IFNs sont dose-dépendants et donc étroitement liés au rythme d'administration. Ces effets sont cumulatifs et s'aggravent avec le temps. Outre la toxicité aiguë entraînant après injection (2 à 8 heures après injection sous cutanée) malaises, nausées et vomissements, les effets indésirables les plus fréquents sont les symptômes pseudo-grippaux (frissons, céphalées, asthénie), les réactions inflammatoires au site d'injection et l'élévation des transaminases du foie. Les effets indésirables les plus sérieux sont des cas de dépressions, lymphopénies ou de rares cas de nécrose au site d'injection sous-cutanés. Chez des malades traités avec de fortes doses d'IFN, un diabète peut survenir après le début du traitement. En outre, la tolérance de l'injection d'IFN est parfois limitée dans le temps et se traduit par le

développement d'anticorps neutralisants (chez approximativement 10-20% des patients).

La demi-vie de l'IFN γ humain recombinant *in vivo* est de 25-35 min seulement. Pour cette raison, un traitement efficace avec l'IFN γ implique des injections fréquentes. Dès 1990, et l'utilisation de l'IFN γ humain recombinant commercialisé sous le nom d'Actimmune (Intermune inc), le besoin d'améliorer la demi-vie de l'IFN γ s'est fait ressentir, d'autant plus que de tous les interférons la stabilité thermique de l'IFN γ est la plus faible. Un IFN γ plus stable permettrait en effet une fréquence d'administration moins importante, ce qui améliorerait le confort du patient. Un IFN γ plus stable permettrait également un meilleur effet *in vivo*, puisque l'effet *in vivo* est la conséquence de la combinaison entre l'activité spécifique de la protéine et sa durée d'action. Les intérêts économiques à améliorer la stabilité de l'IFN γ sont donc clairs : une molécule plus stable (soit parce qu'il s'agit d'un variant, soit parce que des additifs sont ajoutés à la molécule, soit parce que la formulation est améliorée, etc...) pourra permettre d'obtenir des médicaments de seconde génération, susceptibles de remplacer les molécules actuellement sur le marché. On peut même considérer qu'un IFN γ plus stable permettrait d'étendre les indications de cette molécule : En effet, dans le cas d'un certain nombre de pathologies, les IFN α et β , entre autres molécules, ont constitué le traitement de référence. L'IFN γ n'a pas été retenu en raison de sa durée de vie trop courte. Enfin, à plus long terme, on peut espérer qu'un IFN γ stabilisé puisse permettre des formulations différentes d'administration de la molécule (forme orale notamment).

De nombreux travaux de recherche ont déjà été menés sur l'IFN γ :

Variants naturels de l'IFN γ

Plusieurs formes mutées naturelles ont été décrites. L'une de ces formes est celle incluant la séquence N-terminale CYC. Deux variants naturels de l'IFN γ humain présentant une mutation ponctuelle ont également été décrits K29Q et R160Q (Nishi et al. (J. Biochem. 97:153-159, 1985). Mais ces polymorphismes ne sont associés pour l'instant à aucun effet.

Mutants artificiels de l'IFN γ

US 4,832,959 contient des polypeptides avec des séquences partielles de l'IFN γ humain comprenant les résidus 1-127, 5-146 et 5-127 de l'IFN γ mature et possédant les 3 acides aminés additionnels CYC.

US 6,120,762 décrit un fragment peptidique comprenant les résidus 118-157 de l'IFN γ précurseur et son utilisation.

WO2004005341 décrit les méthodes pour générer et produire une série de mutants actifs de l'IFN γ comprenant les 143 acides aminés de la forme mature de l'IFN γ sans CYC avec une variation comprenant au moins une des mutations dans le groupe S155 et S165 et au moins une mutation dans le groupe R160, R162 et R163. Ces mutants seraient utiles notamment dans le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique.

De nombreuses formes tronquées à divers endroits de la région C-terminale de l'IFN γ ont été décrites. EP 0 219 781 décrit l'utilisation de séquences partielles d'IFN γ humain comprenant les acides aminés 3-124 de la protéine mature. L'importance des 20 derniers acides aminés sur l'activité et la stabilité de l'IFN γ a constitué et constitue encore une source d'études controversées. Des IFN γ humains avec l'extrémité C-terminale tronquée ont été décrits par Slodowski et al qui ont réalisé des troncatures de taille différente (de 10 à 20 acides aminés tronqués) (Eur. J. Biochem. 202:1133-1140, 1991).

Dans le brevet EP 0 306870, des variants de l'IFN γ ont été générés avec une activité qui est significativement augmentée en coupant de 7 à 11 résidus C-terminaux. De plus, il est connu que, lorsque l'IFN γ est produit en cellules de mammifères, une population hétérogène de polypeptide IFN γ est obtenue à cause de troncatures naturelles par des activités d'endo- et d'exo- protéases sécrétées par la cellule hôte productrice. L'une des façons de résoudre ce problème de production est décrit dans le brevet US 6,958,388 : cela consiste à produire un IFN γ tronqué contenant les 155 premiers acides aminés de la protéine totale associée par exemple aux mutations améliorant la glycosylation de la molécule (S122T, E61N+S63T).

WO 2004/022593 analyse *in silico* des séquences de nombreuses protéines à visée thérapeutique, y compris l'IFN γ , pour l'existence de sites de protéolyse sensibles à des protéases présentes dans le sérum humain (telles que la trypsine, l'endoprotéinase Asp-N, la chymotrypsine et la proline endopeptidase). Les mutations censées apporter une protection contre les protéases citées sont les suivantes : L53V, L53I, K57Q, K57N, K60Q, K60N, E61Q, E61N, E61H, E62Q, E62N, E62H, K78Q, K78N, K81Q, K81N, K84Q, K84N, D85Q, D85N, D86Q.

Les améliorations (activité ou stabilité) susceptibles d'être apportées par ces mutations n'ont à ce jour pas été vérifiées expérimentalement pour aucun de ces mutants : il ne s'agit donc ici que de théories scientifiques.

Mutants de l'IFN γ avec une amélioration de la thermostabilité

On sait que l'IFN γ (sous forme monomérique en particulier) est peu stable. Cela se traduit par une sensibilité importante de la protéine dite sauvage à deux critères : pH acide et température. Il est attendu que la stabilité accrue de mutants dans ces conditions non physiologiques sera associée au même gain de stabilité dans les conditions physiologiques. Des travaux ont ainsi porté sur la recherche de mutants ayant en premier lieu gagné en thermostabilité, ce paramètre étant le plus simple à mesurer.

WO 92/08737 décrit des variants de l'IFN γ comprenant une méthionine additionnelle en N-terminal en position -1, les 132 premiers acides aminés de la séquence mature sans CYC, le 133ème acide aminé étant une leucine au lieu d'une glutamine. Ce variant, tronqué des 10 acides aminés C-terminaux de l'IFN γ , est appelé Delta 10 L ou encore C10L. Il aurait une activité biologique améliorée et présente une stabilité à la température légèrement améliorée (t_m 55°C) comparée à l'IFN γ sauvage (t_m = 52-53°C).

US 4,898,931 décrit une série de mutants de l'IFN γ produit chez *E.coli* avec des troncatures des 9 derniers résidus C-terminaux couplées aux mutations de certains acides aminés N- et C-terminaux. Ces mutations introduisent des ponts disulfures qui confèrent alors à ces molécules des propriétés thermostables tout en conservant une

activité anti-virale et anti-tumorale. Dans ce brevet, les acides aminés CYC font partie de la protéine mature et des variants des cystéines de ce triplet ont été réalisés.

Sauvage (séquence totale)	25% d'activité résiduelle après 1 h à 50°C
Mutation M157C + Delta 9	81% d'activité résiduelle après 1 h à 50°C
Mutation C21S-M157C et Delta 9	86% d'activité résiduelle après 1 h à 50°C
Mutation C23S-M157C et Delta 9	98% d'activité résiduelle après 1 h à 50°C
Mutation C21S-C23S-M157C et Delta 9	23% d'activité résiduelle après 1 h à 50°C

US 6,046,034 décrit des variants thermostables de l'IFN γ humain pour lesquels des paires de cystéines ont été incorporées à des endroits précis de la structure de l'IFN γ de façon à créer des ponts disulfures inter-monomère et intra-monomère et ainsi assurer la stabilisation de l'homodimère d'IFN γ . La seule paire de cystéines qui permet la conservation de l'activité biologique de l'IFN γ est E30C-S92C qui relie les hélices A et D d'un même monomère, les autres paires de cystéines inter-monomère détruisant l'activité biologique de l'IFN γ . Dans ce brevet, ces mutants possèdent aussi une extrémité C-terminale tronquée correspondant au mutant Delta 10.

La modification de l'IFN γ par ajout de polymères a été reportée par Kita et al. (Drug Des. Deliv. 6:157-167, 1990), et dans les brevets EP 236987 et US 5,109,120.).

WO 99/03887 décrit des variants de protéines de la super-famille structurale de l'hormone de croissance (dont fait partie l'IFN γ). Dans ce brevet, certains résidus non essentiels de la structure peptidique sont remplacés par une cystéine : l'IFN γ y est décrit comme exemple de cette super-famille mais aucun exemple expérimental de modifications n'est décrit dans le cas de l'IFN γ .

WO 01/36001 décrit de nouvelles molécules d'IFN γ modifiées par insertions de sites de glycosylations et/ou de dérivation par des entités type PEG. Ces molécules ont des propriétés améliorées telles qu'une demi-vie améliorée et/ou une bio-disponibilité améliorée.

WO03002152 décrit une composition pharmaceutique contenant un dérivé sulfoalkyl éther cyclodextrine d'interféron, dont la stabilité serait améliorée.

Aucun de ces variants n'est pour l'instant disponible sous forme de médicament. C'est pour cette raison qu'il existe toujours une forte demande pour un IFN γ amélioré, et notamment un IFN γ présentant une meilleure stabilité dans les conditions physiologiques. Ce gain de stabilité en conditions physiologiques peut être évalué par un gain de stabilité à haute température.

Résumé de l'invention

La présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci.

En particulier, la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, et T95V, le variant ne portant pas de groupement non-peptidique attaché sur le(s) résidu(s) introduit(s) par la ou les premières substitution(s). Dans un mode de réalisation, le variant diffère d'un polypeptide présentant une séquence sélectionnée parmi les séquences SEQ ID Nos 2, 4 et 6 par au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s), de préférence par 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s). Dans un mode de réalisation particulier, le variant présente une unique substitution. Dans un autre mode de réalisation, le variant comprend en outre au moins une autre substitution sélectionnée parmi le groupe constitué de M157C, G41S et M100N. Notamment, le variant peut comprendre ou présenter une combinaison de deux substitutions sélectionnées parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, M100N, L126P, N58R, T95V, M157C et G41S. Dans un mode de réalisation préféré, le variant comprend ou présente une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C + L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S, E62C + F159C, E62C + D99Y, E62C + E116C, E62C + L158C, E62C + S74G, E62C + R162C, E62C + S122D, E62C + M100N, E62C + L126P, E62C + N58R, E62C +

T95V, E62C + M157C, E62C + G41S, F159C + D99Y, F159C + E116C, F159C + L158C, F159C + S74G, F159C + R162C, F159C + S122D, F159C + M100N, F159C + L126P, F159C + N58R, F159C + T95V, F159C + M157C, F159C + G41S, D99Y + E116C, D99Y + L158C, D99Y + S74G, D99Y + R162C, D99Y + S122D, D99Y + M100N, D99Y + L126P, D99Y + N58R, D99Y + T95V, D99Y + M157C, D99Y + G41S, E116C + L158C, E116C + S74G, E116C + R162C, E116C + S122D, E116C + M100N, E116C + L126P, E116C + N58R, E116C + T95V, E116C + M157C, E116C + G41S, L158C + S74G, L158C + R162C, L158C + S122D, L158C + M100N, L158C + L126P, L158C + N58R, L158C + T95V, L158C + M157C, L158C + G41S, S74G + R162C, S74G + S122D, S74G + M100N, S74G + L126P, S74G + N58R, S74G + T95V, S74G + M157C, S74G + G41S, R162C + S122D, R162C + M100N, R162C + L126P, R162C + N58R, R162C + T95V, R162C + M157C, R162C + G41S, S122D + L126P, S122D + N58R, S122D + T95V, S122D + M157C, S122D + M100N, S122D + G41S, L126P + N58R, L126P + T95V, L126P + M157C, L126P + M100N, L126P + G41S, N58R + T95V, N58R + M157C, N58R + M100N, N58R + G41S, T95V + M157C, T95V + M100N, T95V + G41S, M157C + M100N et M157C + G41S. Dans un mode de réalisation encore plus préféré, le variant comprend ou présente une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C + L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S. Dans le mode de réalisation tout particulièrement préféré, le variant comprend ou présente la combinaison S63C + G41S. Dans un mode de réalisation particulier, le variant ne présente pas de délétion de 1 à 11 résidus à l'extrémité C-terminale. Dans un autre mode de réalisation particulier, le variant présente une délétion de 1 à 11 résidus à l'extrémité C-terminale. Dans un mode de réalisation particulier, le variant ne porte pas de groupement non-peptidique sélectionné parmi le groupe constitué d'une molécule polymère, d'une molécule lipophile, et d'un agent organique de dérivatisation. Dans un autre mode de réalisation particulier, le variant porte un groupement non-peptidique sélectionné parmi le groupe constitué d'une molécule polymère, d'une molécule lipophile, et d'un agent organique de dérivatisation. Le groupement non-peptidique considéré est tout particulièrement une molécule polymère, de préférence un polyéthylène glycol. Dans un mode de réalisation particulier, le variant est glycosylé. Dans un autre mode de réalisation particulier, le

variant n'est pas glycosylé. Dans un mode de réalisation particulier, la composition pharmaceutique comprend en outre au moins un autre principe actif. L'au moins un autre principe actif est de préférence sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un agent anti-tumoral ou de chimiothérapie, un glucocorticoïde, un agent anti-histaminique, une hormone adrénocorticale, un agent anti-allergique, un vaccin, un broncodilatateur, un stéroïde, un agent bêta-adrénergique, un agent immunomodulateur, une cytokine telle que l'interféron alpha ou bêta, l'interleukine 1 ou 2, le TNF (facteur de nécrose tumorale), l'hydroxyurée, un agent alkylant, un antagoniste de l'acide folique, un antimétabolite du métabolisme des acides nucléiques, un poison fusoral, un antibiotique, un analogue de nucléotides, un rétinoïde, un inhibiteur de lipoxigénase et de cyclo-oxygénase, un acide fumarique et ses sels, un analgésique, un spasmolytique, et un antagoniste du calcium. Dans un mode de réalisation préféré, l'au moins un autre principe actif est un interféron de type I, notamment un interféron alpha ou bêta. La composition pharmaceutique peut être formulée pour une administration orale, parentérale (par exemple sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, ou intradermique), sublinguale, topique, locale, intratrachéale, intranasale, transdermique, rectale, intraoculaire, ou intra-auriculaire.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique selon la présente invention en tant que médicament.

La présente invention concerne un produit comprenant une composition pharmaceutique selon la présente invention et un autre principe actif pour une préparation combinée destinée à une utilisation simultanée, séquentielle ou séparée en tant que médicament antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur. De préférence, l'autre principe actif est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un agent anti-tumoral ou de chimiothérapie, un glucocorticoïde, un agent anti-histaminique, une hormone adrénocorticale, un agent anti-allergique, un vaccin, un broncodilatateur, un stéroïde, un agent bêta-adrénergique, un agent immunomodulateur, une cytokine telle que l'interféron alpha ou bêta, l'interleukine 1 ou 2, le TNF (facteur de nécrose tumorale), l'hydroxyurée, un agent alkylant, un antagoniste de l'acide folique, un antimétabolite du métabolisme des acides nucléiques, un poison fusoral, un antibiotique, un analogue de nucléotides, un rétinoïde, un inhibiteur de lipoxigénase et de cyclo-oxygénase, un acide

fumérique et ses sels, un analgésique, un spasmolytique, et un antagoniste du calcium. Dans un mode de réalisation préféré, l'autre principe actif est un interféron de type I, notamment un interféron alpha ou bêta. Les deux principes actifs peuvent être administrés par la même voie d'administration ou par deux voies d'administration distinctes. Dans un mode de réalisation particulier, le médicament est destiné au traitement d'une pathologie sélectionnée parmi l'asthme, la granulomatose chronique familiale, la fibrose pulmonaire idiopathique, une infection à mycobactérie atypique, le cancer du rein, l'ostéopétrose, une sclérodémie généralisée, une hépatite chronique à virus B ou C, un choc septique, une dermatite allergique, et l'arthrite rhumatoïde.

La présente invention concerne en outre l'utilisation d'une composition pharmaceutique selon la présente invention pour la préparation d'un médicament antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur. Dans un mode de réalisation préféré, le médicament est destiné au traitement d'une pathologie sélectionnée parmi l'asthme, la granulomatose chronique familiale, la fibrose pulmonaire idiopathique, une infection à mycobactérie atypique, le cancer du rein, l'ostéopétrose, une sclérodémie généralisée, une hépatite chronique à virus B ou C, un choc septique, une dermatite allergique, et l'arthrite rhumatoïde.

La présente invention concerne un acide nucléique codant un variant thermostable de l'IFN γ tel que décrit dans les compositions ci-dessus. Elle concerne également une cassette d'expression d'un acide nucléique selon la présente invention, un vecteur comprenant un acide nucléique ou une cassette d'expression selon la présente invention, et une cellule hôte comprenant un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur selon la présente invention. Elle concerne enfin l'utilisation d'un tel acide nucléique, d'une telle cassette d'expression, d'un tel vecteur ou d'une telle cellule hôte pour produire un variant thermostable de l'IFN γ tel que décrit dans les compositions ci-dessus.

Brève description des figures et tableaux

Figure 1 : Schéma du vecteur pNCK utilisé pour la génération des banques de mutants et leur sélection dans *Thermus thermophilus*.

Figure 2 : Résultats de l'analyse fonctionnelle des simples mutants de l'IFN γ sélectionnés par *Thermus thermophilus* - Analyse thermostabilité (% d'activité résiduelle panneau A), activité totale relative par rapport à la protéine sauvage (panneau B) et indice d'amélioration défini par produit (activité résiduelle par activité totale relative vis-à-vis de la protéine sauvage /100) (panneau C).

Figure 3 : Résultats de l'analyse fonctionnelle des simples mutants de l'IFN γ issus des positions doubles et multiples sélectionnées par *Thermus thermophilus* - Analyse thermostabilité (% d'activité résiduelle panneau A), activité totale relative par rapport à la protéine sauvage (panneau B) et indice d'amélioration défini par produit (activité résiduelle par activité totale relative vis-à-vis de la protéine sauvage /100) (panneau C).

Figure 4 : 1^{ère} partie des résultats d'analyse fonctionnelle des simples mutants ponctuels de l'IFN γ générés de façon systématique et ayant été améliorés pour leur stabilité et/ou leur activité - Analyse thermostabilité (% d'activité résiduelle panneau A), activité totale relative par rapport à la protéine sauvage (panneau B) et indice d'amélioration défini par produit (activité résiduelle par activité totale relative vis-à-vis de la protéine sauvage /100) (panneau C).

Figure 5 : 2^{ème} partie des résultats d'analyse fonctionnelle des simples mutants ponctuels de l'IFN γ générés de façon systématique et ayant été améliorés pour leur stabilité et/ou leur activité - Analyse thermostabilité (% d'activité résiduelle panneau A), activité totale relative par rapport à la protéine sauvage (panneau B) et indice d'amélioration défini par produit (activité résiduelle par activité totale relative vis-à-vis de la protéine sauvage /100) (panneau C).

Figure 6 : 3^{ème} partie des résultats d'analyse fonctionnelle des simples mutants ponctuels de l'IFN γ générés de façon systématique et ayant été améliorés pour leur stabilité et/ou leur activité - Analyse thermostabilité (% d'activité résiduelle panneau A), activité totale relative par rapport à la protéine sauvage (panneau B) et indice d'amélioration défini par produit (activité résiduelle par activité totale relative vis-à-vis de la protéine sauvage /100) (panneau C).

Figure 7 : Evaluation de la thermostabilité des variants protéiques de l'IFN γ humain par mesure de leur demi-vie *in vitro* lors d'une cinétique de dénaturation thermique à 59°C en présence d'une concentration de SVF ajustée. Ces mesures consistent au suivi en fonction du temps de dénaturation à 59°C de la conservation de l'activité de l'IFN γ . Ces

données nous permettent de calculer la « demi-vie *in vitro* » de ces molécules dans ces conditions. Ces calculs de demi vie sont répertoriés dans le tableau N°3.

Figure 8 : Pharmacocinétique de variants thermostables de l'IFN γ humain après administration par voie intraveineuse. Le suivi de la quantité d'IFN γ est réalisé par un test ELISA sur des prélèvements de sérum de souris C57BL/6 après injection intraveineuse de 100 μ l à 10 μ g/ml.

Figure 9 : Exemple de pharmacocinétique de variants thermostables de l'IFN γ humain après administration par voie sous-cutanée. Le suivi de la concentration plasmatique en IFN γ gamma est réalisé par quantification ELISA sur des prélèvements de sérum de souris C57BL/6 après injection en sous-cutané de 100 μ l à 6,7 μ g/ml.

Tableau 1 : Mutants issus de la sélection primaire de la banque de l'IFN γ dans *Thermus thermophilus*. Les numéros correspondent à la position de la mutation dans la forme du précurseur de 166 résidus.

Tableau 2 : Mutants validés en test de sélection secondaire dans *Thermus thermophilus*. Les numéros correspondent à la position de la mutation dans la forme du précurseur de 166 résidus.

Tableau 3 : Récapitulatif des calculs de demi-vie « *in vitro* » des variants thermostables de l'IFN γ lors des expériences d'inactivation thermique à 59°C et calcul du ratio d'amélioration des demi-vies des variants par rapport à la demi-vie de l'IFN γ sauvage produit en CHO.

Tableau 4 : Récapitulatif de calculs de demi-vie terminale d'élimination des variants thermostables de IFN γ lors des expériences d'injection par voie intraveineuse et calcul du ratio d'amélioration des demi-vies des variants par rapport à la demi-vie de IFN γ sauvage produit en CHO. Les demi-vies terminales d'élimination (T1/2i.v) ont été calculées à l'aide du logiciel Kinetica Vs 4.4 en modélisant l'administration par IV bolus dans un système non compartimenté.

Tableau 5 : Récapitulatif des calculs de l'aire totale sous la courbe (AUC tot. s.c) et des demi-vies d'élimination (T1/2. s.c) lors des expériences d'injection par voie sous-cutanée. Calcul des ratios d'amélioration respectif de l'aire totale sous la courbe et des demi-vies des variants par rapport à l'aire totale sous la courbe et la demi-vie de IFN γ sauvage produit en CHO. Ces paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel Kinetica Vs 4.4.

Description détaillée de l'invention

La présente invention concerne des variants de l'interféron gamma humain (IFN γ) dont la stabilité, en particulier la stabilité thermique, est accrue par rapport à l'IFN γ sauvage. Les variants protéiques de l'IFN γ de cette invention ont été obtenus en couplant la génération d'une grande diversité de mutations par évolution dirigée à une méthode de sélection directe des variants améliorées pour leur thermostabilité. La stabilité face à la dénaturation thermique des candidats améliorés ainsi que la conservation de leur activité a été validée par des tests biologiques. Les variants de cette invention constituent des alternatives aux IFN γ recombinants actuellement utilisés dans le domaine thérapeutique, notamment dans les traitements de la granulomatose chronique et de la fibrose pulmonaire idiopathique.

Compte-tenu des doutes résidants sur la présence des acides aminés CYC en N-terminal de la protéine mature de l'IFN γ , et de ce fait sur la numération correspondant aux acides aminés de la protéine mature, la numérotation adoptée dans la présente demande sera celle qui tient compte de l'ensemble des résidus de l'IFN γ avec la séquence du peptide signal incluse (numérotation en acides aminés totaux de 1 pour la méthionine N-terminale peptide signal inclus à 166 pour la glutamine de l'extrémité C-terminale de l'interféron – la séquence SEQ ID No 2). La position de la substitution dans les deux autres formes (mature sans CYC, SEQ ID No 4, ou avec CYC, SEQ ID No 6) pourra facilement être déterminée par l'homme du métier.

La terminologie utilisée pour désigner une substitution est la suivante. C21G indique la substitution du résidu cystéine en position 21 de la SEQ ID No 2 par une glycine. Les termes « substitution » et « mutation » sont interchangeables. Le signe « + » indique une combinaison de deux substitutions.

La présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution décrite dans le tableau 1, le tableau 2 et les figures 2 à 9.

La présente invention concerne de préférence un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution sélectionnée parmi un des groupes consistant en :

(a) C21G, C21W, Y22D, Y22T, Y22S, S23C, Q24A, D25V, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, S43C, S43G, S43T, G49K, T50Y, L51H, L51I, L53I, G54Q, G54S, G54T, K57S, N58R, N58C, N58H, N58Y, W59F, K60H, K60R, E61K, E62C, S63R, S63C, Q69F, Q69T, V73I, S74G, Y76D, K78Q, L79V, F80V, K81I, D86C, D86Q, D86H, D86I, D86V, Q87I, Q87P, S88N, S88Q, T95A, T95V, T95F, I96L, K97I, K97R, E98K, D99N, D99C, D99Q, D99E, D99I, D99M, D99S, D99T, D99W, D99Y, D99V, M100I, M100V, M100N, N101G, N101H, N101F, N101V, K103R, N106D, N106Q, N106G, S107C, S107G, S107E, K109C, K109Q, K109L, K110H, D113S, E116C, E116Q, E116H, E116I, E116V, T119C, T119I, T119M, T119V, T119Y, T119P, N120Q, N120E, N120L, N120T, Y121T, S122D, S122C, S122E, S122I, S122L, S122K, S122P, S122H, V123T, V123H, V123P, T124C, T124H, L126R, L126I, L126K, L126P, L126T, L126V, N127A, N127R, N127Q, N127E, N127G, N127I, N127K, N127F, N127S, N127W, N127Y, V128I, V128Y, Q129R, Q129C, Q129H, Q129I, Q129Y, Q129V, R130Q, R130L, R130K, R130T, K131M, K131I, E135V, M140P, A141H, A141V, E142F, L143I, S144G, S144L, S144W, S144V, A146K, A146M, A147R, A147G, A147E, A147F, A147L, A147M, A147P, A147S, T149E, T149M, K151A, K151C, K151H, K151S, K151V, M157Q, M157W, M157L, L158W, L158C, L158I, F159C, F159V, R160A, R162D, R162E, R162Q, R162C, R162I, R162L, R162K, R162V, R163T, R163L, R163G, A164G, A164S, A164E et S165V ou une combinaison de ceux-ci; ou

(b) C21G, C21W, Y22D, Y22T, Y22S, Q24A, D25V, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, S43C, S43G, S43T, G49K, T50Y, L51H, L51I, K57S, N58R, N58C, N58H, N58Y, W59F, K60H, K60R, E61K, E62C, S63R, S63C, Y76D, E98K, M100N, K109C, K109Q, K109L, K110H, T119Y, T119P, Y121T, S122H, S122P, K131I, E135V, M140P, A146K, A146M, A147R, A147G, A147E, A147F, A147L, A147M, A147P, A147S, M157Q, M157W, M157L, L158W, L158C, L158I, F159C, F159V, R160A, R162D, R162E, R162Q, R163T, R163L, R163G, A164E et S165V ou une combinaison de ceux-ci ; ou

(c) L53I, G54Q, G54S, G54T, Q69F, Q69T, V73I, S74G, K78Q, L79V, F80V, K81I, D86C, D86Q, D86H, D86I, D86V, Q87I, Q87P, S88N, S88Q, T95A, T95V, T95F,

I96L, K97I, K97R, D99N, D99C, D99Q, D99E, D99I, D99M, D99S, D99T, D99W, D99Y, D99V, M100I, M100V, N101G, N101H, N101F, N101V, K103R, N106D, N106Q, N106G, S107C, S107G, S107E, D113S, E116C, E116Q, E116H, E116I, E116V, T119C, T119I, T119M, T119V, N120Q, N120E, N120L, N120T, S122D, S122C, S122E, S122I, S122L, S122K, S122P, V123T, V123H, V123P, T124C, T124H, L126R, L126I, L126K, L126P, L126T, L126V, N127A, N127R, N127Q, N127E, N127G, N127I, N127K, N127F, N127S, N127W, N127Y, V128I, V128Y, Q129R, Q129C, Q129H, Q129I, Q129Y, Q129V, R130Q, R130L, R130K, R130T, K131I, K131M, A141H, A141V, E142F, L143I, S144G, S144L, S144W, S144V, T149E, T149M, K151A, K151C, K151H, K151S, K151V, R162C, R162E, R162I, R162L, R162K, R162V, A164G, A164S ou une combinaison de ceux-ci ; ou

(d) S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, et T95V.

Par « comprendre » est entendu que le variant ou le fragment de celui-ci présente une ou plusieurs substitutions telles qu'indiquées par rapport aux séquences polypeptidiques SEQ ID Nos 2, 4 et 6, mais qu'il peut présenter d'autres modifications, notamment des substitutions, des délétions ou des additions.

Par « présenter » est entendu que le variant ou le fragment de celui-ci ne comporte que la ou les substitution(s) indiquée(s) par rapport aux séquences polypeptidiques SEQ ID Nos 2, 4 et 6.

La présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant une combinaison de substitutions sélectionnées dans les groupes mentionnés ci-dessus. La combinaison peut consister en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substitutions sélectionnées dans ce groupe. Par ailleurs, le variant thermostable de l'IFN γ humain selon la présente invention peut comprendre d'autres mutations non-décrites dans ce groupe, de préférence des substitutions, notamment certaines connues dans le domaine. A titre d'illustration, les substitutions connues sont décrites dans WO 92/08737, WO 99/03887, WO01/36001, WO02/81507, WO03/002152, WO2004/005341, WO2004/022593, US 6,958,388, US 4,898,931, US 6,046,034 et WO2006/120580.

Par exemple, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution sélectionnée parmi le groupe consistant en C21W, Q24A, D25V, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, G49K, T50Y, L51H, K57S, N58R, N58C, N58H, N58Y, W59F, K60H, K60R, E61K, E62C, S63R, S63C, Y76D, E98K, K109C, K109L, K109Q, K110H, E135V, M140P, A146K, A146M, A147R, A147G, A147L, A147M, A147P, A147S, A147E, M157W, M157Q, M157L, L158C, L158I, L158W, F159C, F159V, R160A, R162D, R162Q et R162E ou une combinaison de ceux-ci. Dans un autre exemple, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une des mutations sélectionnées parmi le groupe consistant en Q24A, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, G49K, T50Y, L51H, K57S, N58R, N58C, N58H, N58Y, K60H, K60R, E61K, E62C, S63C, K109C, A146K, A146M, A147R, A147G, A147L, A147M, A147P, A147S, A147E, M157Q, M157L, L158I, F159C, F159V, R160A, R162E, R162Q et R162D ou une combinaison de ceux-ci.

Dans un mode de réalisation encore plus préféré, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une première substitution sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, et T95V. Dans un mode de réalisation préféré, le variant ne porte pas de groupement non-peptidique attaché sur le(s) résidu(s) introduit(s) par ladite ou lesdites premières substitutions. Ce variant peut comprendre en outre au moins une autre substitution sélectionnée parmi le groupe constitué de M157C, G41S et M100N.

Dans un autre mode de réalisation, la présente invention concerne également un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci présentant soit une unique substitution C23S ou M157C, soit une substitution C23S ou M157C en combinaison avec une ou plusieurs substitutions sélectionnées parmi le groupe consistant en C21G, C21W, Y22D, Y22T, Y22S, Q24A, D25V, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, S43C, S43G, S43T, G49K, T50Y, L51H, L51I, K57S, N58R, N58C, N58H, N58Y, W59F, K60H, K60R, E61K, E62C, S63R, S63C, Y76D, E98K, M100N,

K109C, K109Q, K109L, K110H, T119Y, T119P, Y121T, S122H, S122P, K131I, E135V, M140P, A146K, A146M, A147R, A147G, A147E, A147F, A147L, A147M, A147P, A147S, M157Q, M157L, L158W, L158C, L158I, F159C, F159V, R160A, R162D, R162E, R162Q, R163T, R163L, R163G, A164E, S165V, L53I, G54Q, G54S, G54T, Q69F, Q69T, V73I, S74G, K78Q, L79V, F80V, K81I, D86C, D86Q, D86H, D86I, D86V, Q87I, Q87P, S88N, S88Q, T95A, T95V, T95F, I96L, K97I, K97R, D99N, D99C, D99Q, D99E, D99I, D99M, D99S, D99T, D99W, D99Y, D99V, M100I, M100V, N101G, N101H, N101F, N101V, K103R, N106D, N106Q, N106G, S107C, S107G, S107E, D113S, E116C, E116Q, E116H, E116I, E116V, T119C, T119I, T119M, T119V, N120Q, N120E, N120L, N120T, S122D, S122C, S122E, S122I, S122L, S122K, S122P, V123T, V123H, V123P, T124C, T124H, L126R, L126I, L126K, L126P, L126T, L126V, N127A, N127R, N127Q, N127E, N127G, N127I, N127K, N127F, N127S, N127W, N127Y, V128I, V128Y, Q129R, Q129C, Q129H, Q129I, Q129Y, Q129V, R130Q, R130L, R130K, R130T, K131I, K131M, A141H, A141V, E142F, L143I, S144G, S144L, S144W, S144V, T149E, T149M, K151A, K151C, K151H, K151S, K151V, R162C, R162E, R162I, R162L, R162K, R162V, A164G et A164S. Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci présentant soit une unique substitution C23S ou M157C, soit une substitution C23S ou M157C en combinaison avec une ou plusieurs substitutions sélectionnées parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, M100N, T95V et G41S. Dans un mode de réalisation encore plus préféré, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci présentant soit une unique substitution M157C, soit une substitution M157C en combinaison avec une ou plusieurs substitutions sélectionnées parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, M100N, T95V et G41S.

Dans un mode de réalisation, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci présentant une unique substitution sélectionnée parmi un des groupes consistant en :

(a) C21G, C21W, Y22D, Y22T, Y22S, C23S, Q24A, D25V, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, S43C, S43G, S43T, G49K, T50Y, L51H, L51I, K57S, N58R, N58C, N58H,

N58Y, W59F, K60H, K60R, E61K, E62C, S63R, S63C, Y76D, E98K, M100N, K109C, K109Q, K109L, K110H, T119Y, T119P, Y121T, S122H, S122P, K131I, E135V, M140P, A146K, A146M, A147R, A147G, A147E, A147F, A147L, A147M, A147P, A147S, M157Q, M157W, M157L, M157C, L158W, L158C, L158I, F159C, F159V, R160A, R162D, R162E, R162Q, R163T, R163L, R163G, A164E et S165V. ou

(b) L53I, G54Q, G54S, G54T, Q69F, Q69T, V73I, S74G, K78Q, L79V, F80V, K81I, D86C, D86Q, D86H, D86I, D86V, Q87I, Q87P, S88N, S88Q, T95A, T95V, T95F, I96L, K97I, K97R, D99N, D99C, D99Q, D99E, D99I, D99M, D99S, D99T, D99W, D99Y, D99V, M100I, M100V, N101G, N101H, N101F, N101V, K103R, N106D, N106Q, N106G, S107C, S107G, S107E, D113S, E116C, E116Q, E116H, E116I, E116V, T119C, T119I, T119M, T119V, N120Q, N120E, N120L, N120T, S122D, S122C, S122E, S122I, S122L, S122K, S122P, V123T, V123H, V123P, T124C, T124H, L126R, L126I, L126K, L126P, L126T, L126V, N127A, N127R, N127Q, N127E, N127G, N127I, N127K, N127F, N127S, N127W, N127Y, V128I, V128Y, Q129R, Q129C, Q129H, Q129I, Q129Y, Q129V, R130Q, R130L, R130K, R130T, K131I, K131M, A141H, A141V, E142F, L143I, S144G, S144L, S144W, S144V, T149E, T149M, K151A, K151C, K151H, K151S, K151V, R162C, R162E, R162I, R162L, R162K, R162V, A164G et A164S; ou

(c) S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, et T95V.

Par exemple, la substitution est sélectionnée parmi le groupe consistant en C21W, C23S, Q24A, D25V, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, G49K, T50Y, L51H, K57S, N58R, N58C, N58H, N58Y, W59F, K60H, K60R, E61K, E62C, S63R, S63C, Y76D, E98K, K109C, K109L, K109Q, K110H, E135V, M140P, A146K, A146M, A147R, A147G, A147L, A147M, A147P, A147S, A147E, M157W, M157Q, M157C, M157L, L158C, L158I, L158W, F159C, F159V, R160A, R162D, R162Q et R162E. Notamment, la substitution peut être sélectionnée parmi le groupe consistant en C23S, Q24A, P26D, V28C, G41I, G41S, H42D, G49K, T50Y, L51H, K57S, N58R, N58C, N58H, N58Y, K60H, K60R, E61K, E62C, S63C, K109C, A146K, A146M, A147R, A147G, A147L, A147M, A147P, A147S, A147E, M157Q, M157C, M157L, L158I, F159C, F159V, R160A, R162E, R162Q et R162D. . De préférence, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci

présentant une unique substitution sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, et T95V.

Dans un mode de réalisation, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci présentant une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en C21G+F159C, A147E+R162D, M100N+T119Y, Y76D+K131I, T50Y+Y121T+M140P, P26D+S122P, Y22S+L158W+R163G, Y22D+S122H, R162Q+A164E, et Y22T+K109C+T119P+A147F+R163L.

Dans un autre mode de réalisation, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant ou présentant une combinaison de deux substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, M100N, L126P, N58R, T95V, M157C et G41S, de préférence une combinaison sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C + L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S, E62C + F159C, E62C + D99Y, E62C + E116C, E62C + L158C, E62C + S74G, E62C + R162C, E62C + S122D, E62C + M100N, E62C + L126P, E62C + N58R, E62C + T95V, E62C + M157C, E62C + G41S, F159C + D99Y, F159C + E116C, F159C + L158C, F159C + S74G, F159C + R162C, F159C + S122D, F159C + M100N, F159C + L126P, F159C + N58R, F159C + T95V, F159C + M157C, F159C + G41S, D99Y + E116C, D99Y + L158C, D99Y + S74G, D99Y + R162C, D99Y + S122D, D99Y + M100N, D99Y + L126P, D99Y + N58R, D99Y + T95V, D99Y + M157C, D99Y + G41S, E116C + L158C, E116C + S74G, E116C + R162C, E116C + S122D, E116C + M100N, E116C + L126P, E116C + N58R, E116C + T95V, E116C + M157C, E116C + G41S, L158C + S74G, L158C + R162C, L158C + S122D, L158C + M100N, L158C + L126P, L158C + N58R, L158C + T95V, L158C + M157C, L158C + G41S, S74G + R162C, S74G + S122D, S74G + M100N, S74G + L126P, S74G + N58R, S74G + T95V, S74G + M157C, S74G + G41S, R162C + S122D, R162C + M100N, R162C + L126P, R162C + N58R, R162C + T95V, R162C + M157C, R162C + G41S, S122D + L126P, S122D + N58R, S122D + T95V, S122D + M157C, S122D +

M100N, S122D + G41S, L126P + N58R, L126P + T95V, L126P + M157C, L126P + M100N, L126P + G41S, N58R + T95V, N58R + M157C, N58R + M100N, N58R + G41S, T95V + M157C, T95V + M100N, T95V + G41S, M157C + M100N et M157C + G41S. Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne un variant comprenant ou présentant une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C + L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S, de préférence la combinaison S63C + G41S.

Les séquences SEQ ID Nos 1-6 décrivent les séquences protéiques de l'IFN γ humain précurseur et mature ainsi que des séquences nucléiques codant celles-ci. Dans un mode de réalisation préféré, le variant selon la présente invention correspond à la protéine précurseur de 166 acides aminés (SEQ ID No 2), ou à la protéine mature avec ou sans le tripeptide CYC (SEQ ID Nos 6 et 4, respectivement) comprenant au moins une substitution ou une combinaison de substitutions selon la présente invention. Par « variant » est notamment entendu un polypeptide différant d'un polypeptide présentant une séquence sélectionnée parmi les séquences SEQ ID Nos 2, 4 et 6 par au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s), de préférence par 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s).

Par « fragment fonctionnel » est entendu un fragment de l'IFN γ humain présentant l'activité de l'IFN γ humain. Par exemple, ce fragment peut correspondre à l'IFN γ humain précurseur ou mature, avec ou sans le tripeptide CYC, avec une délétion C-terminale de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 acides aminés, de préférence de 1 à 15 résidus, de manière encore plus préféré de 1 à 11 résidus. Le fragment peut comprendre 100, 110, 120, 130 ou 140 acides aminés consécutifs de l'IFN γ humain.

Par « activité de l'IFN γ humain » est entendu la capacité de se fixer sur le récepteur à l'IFN γ humain et provoquer la transduction du signal induit par la fixation de l'IFN γ humain à son récepteur comme déterminé *in vitro* ou *in vivo*. L'activité de l'IFN γ

humain peut être mesurée par les méthodes décrites ci-après dans la description et dans les exemples.

Les variants selon la présente invention présentent une augmentation de la thermostabilité par rapport à l'IFN γ humain sauvage. Cette augmentation est d'au moins 5 %, de préférence au moins 10, 20 ou 30 %. Par « thermostabilité », est entendu la capacité de la protéine à conserver son activité après avoir été soumise à l'action de la chaleur. Par exemple, la protéine peut être incubée 10 minutes à 59°C. La thermostabilité du variant est alors estimée par le pourcentage d'activité résiduelle après ce prétraitement. Cette mesure de la thermostabilité d'un variant est alors comparée à la même valeur obtenue en utilisant l'IFN γ sauvage soumis aux mêmes conditions.

Un variant qui présente une thermostabilité améliorée mais une activité réduite peut être utilisable. De préférence, les variants thermostables de la présente invention conservent une activité (condition sans prétraitement) qui correspond à au moins 10 % de l'activité de l'IFN γ humain sauvage, de préférence à au moins 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 % de l'activité de l'IFN γ humain sauvage. Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, les variants thermostables de la présente invention conservent une activité équivalente à celle de l'IFN γ humain sauvage, voire augmentée.

Un facteur intéressant de sélection des variants d'intérêt est l'activité relative du variant multiplié par le pourcentage d'activité résiduelle.

Par « groupement non-peptidique » est entendu une molécule non-peptidique qui peut être attaché à la chaîne latérale d'un acide aminé de l'IFN γ humain. Cette molécule peut être une molécule polymère, une molécule lipophile, un carbohydrate ou un agent organique de dérivatisation. Le carbohydrate peut être attaché à l'IFN γ par glycosylation *in vitro* ou *in vivo*, par exemple par N- ou O-glycosylation. Une molécule lipophile peut être par exemple un acide gras saturé ou insaturé, un terpène, une vitamine, un stéroïde ou caroténoïde. Une molécule polymère peut être un polyol, un polyamine, un polycarboxylique acide ou un polyalkylène oxyde, en particulier un polyéthylène glycol (PEG). Ce type de molécules est bien connu de l'homme du métier. Un variant portant un groupe PEG sera désigné comme étant « peggylé ».

Le variant de l'IFN γ humain selon la présente invention peut être glycosylé, de préférence aux positions 48 et 120. Dans un autre mode de réalisation, le variant peut ne pas être glycosylé. Lorsque le variant comprend la substitution G41S, il peut être glycosylé en position N39 par une N-glycosylation. Dans un mode alternatif, un tel variant peut ne pas être glycosylé à cette position.

Dans un mode de réalisation, le variant peut être modifié par ajout d'une molécule polymère, en particulier par ajout de polymères (Kita et al., Drug Des. Deliv. 6:157-167, 1990 ; EP 236987 et US 5,109,120) ou par pégylation (WO99/03887 ; Voir WO2004005341 « Conjugation of a polymer molecule »). Dans un mode de réalisation préféré d'un variant de l'IFN γ humain selon la présente invention, la molécule polymère est attachée à une position autre que les positions 41, 58, 62, 63, 74, 95, 99, 100, 116, 122, 126, 157, 158, 159 et 162. Notamment, la molécule n'est pas attachée à un résidu introduit par une substitution faite dans un variant selon la présente invention, en particulier une substitution sélectionnée parmi S63C, E62C, F159C, D99Y, M100N, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, T95V, G41S et M157C.

Dans un autre mode de réalisation, le variant de la présente invention ne porte pas de molécule polymère. En particulier, il n'est pas peggylé.

L'activité *in vitro* de l'IFN γ est généralement déterminée par la réduction de l'effet cytopathique de virus sur une lignée cellulaire par traitement avec des quantités croissantes d'IFN γ . Il existe d'autres tests biologiques spécifiques de l'IFN γ (Meager, Journal of immunological Methods, 261, (2002) 21-36 pour une revue). Ces nouveaux tests permettent notamment d'évaluer plus spécifiquement l'une des caractéristiques de l'activité pléiotrope de l'IFN γ . Il existe également des tests d'activité *in vivo*.

La réponse anti-virale à des doses d'IFN γ peut être mesurée sur différents couples de systèmes (virus /lignée cellulaire adhérente répondant à l'IFN γ et sensible au virus employé). Par exemple, on peut citer les couples suivants : VSV/MDBK ; VSV ou EMCV/ A549 ; VSV, EMCV, SFV ou virus Sindbis/ WISH ; VSV ou EMCV/ HeLa ; VSV, EMCV ou Mengovirus/ FS4, FS71, ou Hep2 ; VSV, EMCV, Mengovirus ou virus

Sindbis/ FL ; EMCV/ 2D9, avec VSV = virus de la stomatite vésiculaire ; EMCV = virus de l'encéphalomyocardite ; SFV = virus de la forêt de Semliki. De préférence, les virus utilisés seront le virus de la vaccine ou le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Le virus de l'herpès simplex (HSV) et le cytomégalovirus peuvent également être utilisés.

L'activité de l'IFN γ peut également être testée en utilisant un gène rapporteur, par exemple la luciférase, sous le contrôle d'un promoteur sensible à l'IFN γ contenant des éléments GAS (gamma-interféron activation sites) ou ISRE (interferon stimulated response element) . Ainsi, le gène rapporteur est dosé suite à une stimulation par l'IFN γ . Les vecteurs pGAS/Luciférase et pISRE/Luciférase sont disponibles commercialement (#219091, Stratagene). Dans un mode de réalisation préféré, la méthode avec le vecteur pGAS/luciférase est utilisée pour mesurer l'activité de l'IFN γ .

L'augmentation de la thermostabilité de l'IFN γ tout en conservant son activité biologique permet d'envisager l'élaboration de traitements plus efficaces permettant, à activité biologique égale, une réduction des doses thérapeutiques utilisées, et par là même une réduction des effets secondaires associés au traitement. Cela permet également des traitements à plus forte dose d'IFN γ pour réduire les infections virales telles que l'herpès, ces traitements étant jusqu'ici inenvisageables avec ce type de molécules. Par ailleurs, les variants selon la présente invention peuvent présenter l'avantage d'avoir un temps de demi-vie plus long lors du stockage de ces variants, et donc une meilleure conservation, par rapport à l'IFN γ sauvage, notamment à température ambiante.

La présente invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant un variant de l'IFN γ thermostable selon la présente invention.

Ainsi, la présente invention concerne de préférence une composition pharmaceutique comprenant un variant de l'IFN γ thermostable ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, et T95V, le variant ne portant pas de groupement non-peptidique attaché sur le(s) résidu(s)

introduit(s) par la ou les premières substitution(s). Dans un mode de réalisation, le variant diffère d'un polypeptide présentant une séquence sélectionnée parmi les séquences SEQ ID Nos 2, 4 et 6 par au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s), de préférence par 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s). Dans un mode de réalisation particulier, le variant présente une unique substitution. Dans un autre mode de réalisation, le variant comprend en outre au moins une autre substitution sélectionnée parmi le groupe constitué de M157C, G41S et M100N. Notamment, le variant peut comprendre ou présenter une combinaison de deux substitutions sélectionnées parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, M100N, L126P, N58R, T95V, M157C et G41S. Dans un mode de réalisation préféré, le variant comprend ou présente une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C + L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S, E62C + F159C, E62C + D99Y, E62C + E116C, E62C + L158C, E62C + S74G, E62C + R162C, E62C + S122D, E62C + M100N, E62C + L126P, E62C + N58R, E62C + T95V, E62C + M157C, E62C + G41S, F159C + D99Y, F159C + E116C, F159C + L158C, F159C + S74G, F159C + R162C, F159C + S122D, F159C + M100N, F159C + L126P, F159C + N58R, F159C + T95V, F159C + M157C, F159C + G41S, D99Y + E116C, D99Y + L158C, D99Y + S74G, D99Y + R162C, D99Y + S122D, D99Y + M100N, D99Y + L126P, D99Y + N58R, D99Y + T95V, D99Y + M157C, D99Y + G41S, E116C + L158C, E116C + S74G, E116C + R162C, E116C + S122D, E116C + M100N, E116C + L126P, E116C + N58R, E116C + T95V, E116C + M157C, E116C + G41S, L158C + S74G, L158C + R162C, L158C + S122D, L158C + M100N, L158C + L126P, L158C + N58R, L158C + T95V, L158C + M157C, L158C + G41S, S74G + R162C, S74G + S122D, S74G + M100N, S74G + L126P, S74G + N58R, S74G + T95V, S74G + M157C, S74G + G41S, R162C + S122D, R162C + M100N, R162C + L126P, R162C + N58R, R162C + T95V, R162C + M157C, R162C + G41S, S122D + L126P, S122D + N58R, S122D + T95V, S122D + M157C, S122D + M100N, S122D + G41S, L126P + N58R, L126P + T95V, L126P + M157C, L126P + M100N, L126P + G41S, N58R + T95V, N58R + M157C, N58R + M100N, N58R + G41S, T95V + M157C, T95V + M100N, T95V + G41S, M157C + M100N et M157C + G41S. Dans un mode de réalisation encore plus préféré, le variant comprend ou présente une

combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C + L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S. Dans le mode de réalisation tout particulièrement préféré, le variant comprend ou présente la combinaison S63C + G41S. Dans un mode de réalisation particulier, le variant ne présente pas de délétion de 1 à 11 résidus à l'extrémité C-terminale. Dans un autre mode de réalisation particulier, le variant présente une délétion de 1 à 11 résidus à l'extrémité C-terminale. Dans un mode de réalisation particulier, le variant ne porte pas de groupement non-peptidique sélectionné parmi le groupe constitué d'une molécule polymère, d'une molécule lipophile, et d'un agent organique de dérivatisation. Dans un autre mode de réalisation particulier, le variant porte un groupement non-peptidique sélectionné parmi le groupe constitué d'une molécule polymère, d'une molécule lipophile, et d'un agent organique de dérivatisation. Le groupement non-peptidique considéré est tout particulièrement une molécule polymère, de préférence un polyéthylène glycol. Dans un mode de réalisation particulier, le variant est glycosylé. Le variant peut notamment être glycosylé en position N39 par une N-glycosylation lorsqu'il comprend la substitution G41S.

Une composition pharmaceutique selon la présente invention peut comprendre en outre un support ou un excipient pharmaceutiquement acceptable. De tels supports et excipients sont bien connus de l'homme du métier (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; and Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press[2000]).

Une composition pharmaceutique selon la présente invention peut être formulée sous différentes formes, notamment de liquide, de gel, lyophilisée, de poudre, de solide comprimé, et autres.

La présente invention concerne également un variant de l'IFN γ thermostable selon la présente invention ou une composition selon la présente invention en tant que médicament.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont appropriées ou formulées pour l'administration orale, parentérale (intradermique, intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée), sublinguale, topique, locale, intratrachéale, intranasale, transdermique, rectale, intraoculaire, intra-auriculaire, ledit principe actif pouvant être administré sous forme unitaire d'administration.

Un exemple de composition pharmaceutique est une solution adaptée pour une administration parentérale. Bien que la composition puisse être sous forme liquide, adaptée pour une administration immédiate, de telles formulations parentérales comprennent également les formes congelées ou lyophilisées. Dans ce cas, la composition sera décongelée ou mise en solution avant utilisation. Dans le cas de la lyophilisation, la composition sera préparée en ajoutant un diluant pharmaceutiquement acceptable tel que de l'eau stérile ou un tampon physiologique.

Les formes unitaires d'administration peuvent être par exemple des comprimés, des gélules, des gels des granules, des poudres, des solutions ou suspensions orales ou injectables, des timbres transdermiques (patch), des formes d'administration sublinguale, buccale, intratrachéale, intraoculaire, intranasale, intra-auriculaire, par inhalation, des formes d'administration topique, transdermique, sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse, des formes d'administration rectale ou des implants.

Pour l'administration topique, on peut envisager des crèmes, gels, pommades, lotions ou collyres. Ces formes galéniques sont préparées selon les méthodes usuelles des domaines considérés. Dans un mode de réalisation préféré, la composition pharmaceutique est liquide.

Lesdites formes unitaires sont dosées pour permettre une administration journalière de 0,001 à 100 µg de principe actif par kg de poids corporel, selon la forme galénique. Il peut y avoir des cas particuliers où des dosages plus élevés ou plus faibles sont appropriés; de tels dosages ne sortent pas du cadre de l'invention. Selon la pratique habituelle, le dosage approprié à chaque patient est déterminé par le médecin selon le mode d'administration, le poids et la réponse du patient.

Dans un mode de réalisation préféré, l'IFN γ est administré par la voie parentérale, et préférentiellement par injection sous-cutanée. Par exemple, une dose habituelle d'IFN γ par injection sous-cutanée est comprise entre 1 et 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ si la surface corporelle est supérieure à 0,5 m^2 et entre 0,01 et 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel si la surface corporelle est inférieure ou égale à 0,5 m^2 .

L'IFN γ est l'exemple type de cytokine pléiotrope au large spectre d'activités. En effet, les interférons (IFNs) sont doués d'activités telles que l'inhibition de la réplication virale, l'inhibition de la multiplication cellulaire et l'induction de l'apoptose.

Notamment, la stimulation des macrophages par l'IFN γ induit les réponses suivantes :

- l'augmentation de la phagocytose et de la bactéricidie (mécanismes directs anti-microbiens et anti-tumoraux) ;
- la stimulation des voies de présentation et de dégradation des antigènes, expression du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de type I et II à la surface des macrophages ;
- la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, ce qui a pour conséquence la production d'immunoglobuline de type G et l'activation du complément ;
- l'activation de la NO synthase donnant naissance à la production de NO et de radicaux libres oxygénés cytotoxiques ; et/ou
- l'augmentation de la production de cytokines et la production d'IFN endogène.

L'action de l'IFN γ sur les lymphocytes T est de favoriser leur différenciation modulant ainsi la réponse immunitaire spécifique.

Parmi les propriétés pharmacologiques de l'IFN γ , l'effet principal recherché et développé en phases cliniques est principalement l'aspect immunomodulateur, l'aspect de molécule thérapeutique anti-virale étant moins développé à ce jour.

En raison de son large spectre d'activités (antivirale, antiproliférative et immunomodulatrice), l'IFN γ est une molécule développée comme agent thérapeutique

humain dans le traitement de nombreuses maladies assez variées. Les IFN γ commerciaux (Actimmune, et Biogamma) sont notamment utilisés pour deux indications thérapeutiques principales : la granulomatose chronique et la fibrose pulmonaire idiopathique, en association avec la prednisolone par voie orale. En plus des indications thérapeutiques principales, de nombreuses nouvelles indications thérapeutiques secondaires sont actuellement en cours de développement à différentes phases cliniques (II et III), en particulier pour leur rôle d'immuno-suppresseur par exemple en complément des IFN α pégylés/ribavirine dans le cadre du traitement de l'Hépatite C. On peut citer aussi infections à mycobactérie atypique ; cancer du rein ; ostéopétrose ; sclérodermie généralisée ; hépatite chronique à virus B ; hépatite chronique à virus C ; choc septique ; dermatite allergique ; la polyarthrite rhumatoïde ; cancer de l'ovaire ; la fibrose du foie ; l'asthme ; et le lymphome.

L'IFN γ est également utile dans le traitement d'infections virales variées, possède une activité contre l'infection par les papillomavirus humains, et les infections hépatiques à virus B et à virus C.

De plus, si le problème de toxicité associée aux fortes doses d'IFN γ était atténué ou résolu par une molécule plus stable, et ayant donc un plus important effet *in vivo*, l'utilisation de l'IFN γ dans de nouvelles indications, et notamment pour traiter les infections virales type herpès (HSV) de type I et II pourrait être reconsidéré.

Ainsi, la présente invention concerne l'utilisation d'un variant de l'IFN γ thermostable selon la présente invention ou d'une composition pharmaceutique selon la présente invention pour la préparation d'un médicament antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur. Ainsi, ce médicament est destiné à traiter des maladies inflammatoires, des cancers, des infections, des troubles osseux, des maladies auto-immunes, etc... Dans un mode de réalisation préféré, le médicament est destiné au traitement d'une pathologie sélectionnée parmi l'asthme, la granulomatose chronique familiale, la fibrose pulmonaire idiopathique, une infection à mycobactérie atypique, le cancer du rein, l'ostéopétrose, une sclérodermie généralisée, une hépatite chronique à virus B ou C, un choc septique, une dermatite allergique, et l'arthrite rhumatoïde. Dans des modes de réalisation alternatifs, le médicament est destiné au traitement d'une

pathologie sélectionnée parmi un prurigo, une névrodermite, le diabète de type I, une sténose vasculaire, un épithélioma basocellulaire, un cancer ou un lymphome tel que un cancer de l'ovaire, un cancer du rein, une leucémie telle qu'un désordre hyperprolifératif des cellules B ou T, la leucémie myéloïde chronique et des syndromes apparentés, un cancer du sein, un cancer des poumons, un mélanome, un cancer du colon, un cancer du cerveau, un cancer de la plèvre, un cancer de l'estomac, un cancer du pancréas, une infection virale, par exemple par le virus de l'hépatite C ou B, la maladie de Crohn, le psoriasis, la sclérose en plaque, et la sclérose amyotrophique latérale.

Le variant thermostable de l'IFN γ selon la présente invention peut être utilisé en combinaison avec un autre principe actif, par exemple un principe actif sélectionné parmi un anticorps, un agent anti-tumoral ou de chimiothérapie, un glucocorticoïde, un agent anti-histaminique, une hormone adrénocorticale, un agent anti-allergique, un vaccin, un broncodilatateur, un stéroïde, un agent bêta-adrénergique, un agent immunomodulateur, une cytokine telle que l'interféron alpha ou bêta, l'interleukine 1 ou 2, le TNF (facteur de nécrose tumorale), l'hydroxyurée, un agent alkylant, un antagoniste de l'acide folique, un antimétabolite du métabolisme des acides nucléiques, un poison fusoral, un antibiotique, un analogue de nucléotides, un rétinoïde, un inhibiteur de lipoxigénase et de cyclo-oxygénase, un acide fumarique et ses sels, un analgésique, un spasmolytique, un antagoniste du calcium et une combinaison de ceux-ci. Le principe actif additionnel peut être administré avant, simultanément ou après l'administration de l'IFN γ selon la présente invention. De plus, il peut être administré par la même voie d'administration ou par deux voies d'administration distinctes. Ainsi, la présente invention concerne un produit comprenant le variant thermostable de l'IFN γ ou une composition pharmaceutique selon la présente invention et un autre principe actif, de préférence sélectionné dans la liste ci-dessus, pour une préparation combinée destinée à une utilisation simultanée, séquentielle ou séparée pour le traitement d'une des pathologies citées ci-dessus.

La combinaison avec un anticorps est utile pour le traitement de cancer. En effet, l'IFN γ est capable d'augmenter l'effet des anticorps par l'ADCC (antibody-dependant cellular cytotoxicity). L'anticorps est de préférence dirigé contre un antigène exposé par les

cellules cancéreuses. L'anticorps peut être un anticorps polyclonal, monoclonal, humanisé, ou chimérique. De préférence, l'anticorps est monoclonal et humanisé. Par exemple, dans le cas d'un désordre hyperprolifératif des cellules B tel que le lymphome non-hodgkinien, l'antigène peut être CD20. Cet anticorps peut être le Rituximab.

La combinaison avec un glucocorticoïde est utile pour le traitement des maladies pulmonaires alvéolaires telles que la fibrose pulmonaire idiopathique. Des exemples de glucocorticoïdes adaptés sont l'hydrocortisone, la cortisone, la dexaméthasone, la bétaméthasone, la prednisolone, la méthyl prednisolone et leurs sels pharmaceutiquement acceptables. Un mode de réalisation préféré de la présente invention concerne l'utilisation d'une combinaison entre l'IFN γ selon la présente invention et la prednisolone.

La combinaison avec un agent anti-histaminique, une hormone adrénocorticale, un agent anti-allergique est utile notamment pour le traitement de maladies de la peau telles que un prurigo ou une névrodermite.

La combinaison avec un agent anti-allergique, un broncodilatateur, un stéroïde, un agent bêta-adrénergique, un agent immunomodulateur, ou une cytokine est utile notamment pour le traitement de l'asthme.

La présente invention concerne en outre une méthode de traitement antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur chez un patient le nécessitant, comprenant l'administration d'une quantité thérapeutique efficace d'un variant thermostable de l'IFN γ ou d'une composition pharmaceutique selon la présente invention au patient. De préférence, la méthode de traitement est destinée au traitement d'une pathologie citée ci-dessus. Facultativement, la méthode peut comprendre en outre l'administration d'un autre principe actif, de préférence sélectionné parmi ceux cités ci-dessus. Une quantité thérapeutique efficace est la quantité nécessaire pour diminuer ou supprimer les symptômes de la maladie ou pour soigner ou ralentir la progression de la maladie. Le patient est de préférence un humain.

La présente invention concerne un acide nucléique codant un variant thermostable de l'IFN γ humain selon la présente invention. La présente invention concerne également une cassette d'expression d'un acide nucléique selon la présente invention. Elle concerne en outre un vecteur comprenant un acide nucléique ou une cassette d'expression selon la présente invention. Le vecteur peut être sélectionné parmi un plasmide et un vecteur viral.

L'acide nucléique peut être de l'ADN (ADNc ou ADNg), de l'ARN, un mélange des deux. Il peut être sous forme simple chaîne ou en duplexe ou un mélange des deux. Il peut comprendre des nucléotides modifiés, comprenant par exemple une liaison modifiée, une base purique ou pyrimidique modifiée, ou un sucre modifié. Il peut être préparé par toutes méthodes connues de l'homme du métier, dont la synthèse chimique, la recombinaison, la mutagenèse, etc...

La cassette d'expression comprend tous les éléments nécessaires à l'expression du variant thermostable de l'IFN γ humain selon la présente invention, notamment les éléments nécessaires à la transcription et à la traduction dans la cellule hôte. La cellule hôte peut être procaryote ou eucaryote. En particulier, la cassette d'expression comprend un promoteur et un terminateur, facultativement un amplificateur. Le promoteur peut être procaryote ou eucaryote. Des exemples de promoteurs procaryotes préférés sont les suivants : LacI, LacZ, pLacT, ptac, pARA, pBAD, les promoteurs d'ARN polymérase de bactériophage T3 or T7, le promoteur de la polyhèdrine, le promoteur PR ou PL du phage lambda. Des exemples de promoteurs eucaryotes préférés sont les suivants : promoteur précoce du CMV, promoteur de la thymidine kinase de HSV, promoteur précoce ou tardif de SV40, le promoteur de la métallothionéine-L de souris, et les régions LTR de certains rétrovirus. De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de Sambrook et al. (1989) ou encore aux techniques décrites par Fuller et al. (1996; Immunology in Current Protocols in Molecular Biology).

La présente invention concerne un vecteur portant un acide nucléique ou une cassette d'expression codant pour un variant thermostable de l'IFN γ humain selon la présente

invention. Le vecteur est de préférence un vecteur d'expression, c'est-à-dire qu'il comprend les éléments nécessaires à l'expression du variant dans la cellule hôte. La cellule hôte peut être un procaryote, par exemple *E. coli*, ou un eucaryote. L'eucaryote peut être un eucaryote inférieur comme une levure (par exemple, *S cerevisiae*) ou un champignon (par exemple du genre *Aspergillus*) ou un eucaryote supérieur comme une cellule d'insecte (Sf9 ou Sf21 par exemple), de mammifère ou de plante. La cellule peut être une cellule mammifère, par exemple COS (lignée cellulaire de singe vert) (par exemple, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651), CHO (US 4,889,803 ; US 5,047,335, CHO-K1 (ATCC CCL-61)), des cellules de souris et des cellules humaines. Dans un mode de réalisation particulier, la cellule est non-humaine et non-embryonnaire. Le vecteur peut être un plasmide, un phage, un phagemide, un cosmide, un virus, un YAC, un BAC, un plasmide pTi d'*Agrobacterium*, etc... Le vecteur peut comprendre de préférence un ou plusieurs éléments sélectionnés parmi une origine de répllication, un site de clonage multiple et un gène de sélection. Dans un mode de réalisation préféré, le vecteur est un plasmide. Des exemples non-exhaustifs de vecteurs procaryotes sont les suivants : pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pBR322, et pRIT5 (Pharmacia), pET (Novagen). Des exemples non-exhaustifs de vecteurs eucaryotes sont les suivants : pWLNEO, pSV2CAT, pPICZ, pcDNA3.1 (+) Hyg (Invitrogen), pOG44, pXT1, pSG (Stratagene); pSVK3, pBPV, pCI-neo (Stratagene), pMSG, pSVL (Pharmacia); et pQE-30 (QLAexpress). Les vecteurs viraux peuvent être de manière non-exhaustive des adénovirus, des AAV, des HSV, des lentivirus, etc... De préférence, le vecteur d'expression est un plasmide ou un vecteur viral.

La séquence codant l'IFN γ selon la présente invention peut comprendre ou ne pas comprendre le peptide signal. Dans le cas où elle ne le comprend pas, une méthionine peut être éventuellement ajoutée à l'extrémité N-terminale. Dans une autre alternative, un peptide signal hétérologue peut être introduit. Ce peptide signal hétérologue peut être dérivé d'un procaryote tel que *E. coli* ou d'un eucaryote, notamment une cellule mammifère, d'insecte ou d'une levure.

La présente invention concerne l'utilisation d'un polynucléotide, d'une cassette d'expression ou d'un vecteur selon la présente invention pour transformer ou transfecter une cellule. La présente invention concerne une cellule hôte comprenant un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur codant un variant thermostable de l'IFN γ humain et son utilisation pour produire un variant thermostable de l'IFN γ humain recombinant selon la présente invention. Le terme « cellule hôte » englobe les cellules filles résultant de la culture ou de la croissance de cette cellule. Dans un mode de réalisation particulier, la cellule est non-humaine et non-embryonnaire. Elle concerne également une méthode de production d'un variant thermostable de l'IFN γ humain recombinant selon la présente invention comprenant la transformation ou transfection d'une cellule par un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur selon la présente invention ; la mise en culture de la cellule transfectée/transformée ; et la récolte du variant thermostable de l'IFN γ humain produit par la cellule. Dans un mode de réalisation alternatif, la méthode de production d'un variant thermostable de l'IFN γ humain recombinant selon la présente invention comprenant la fourniture d'une cellule comprenant un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur selon la présente invention ; la mise en culture de la cellule transfectée/transformée ; et la récolte du variant thermostable de l'IFN γ humain produit par la cellule. En particulier, la cellule peut être transformée/transfectée de manière transitoire ou stable par l'acide nucléique codant le variant. Cet acide nucléique peut être contenu dans la cellule sous forme d'épisome ou sous forme chromosomique. Les méthodes de production de protéines recombinantes sont bien connues par l'homme du métier. Par exemple, on peut citer les modes spécifiques décrits dans US 5,004,689, EP 446 582, Wang et al. (Sci. Sin. B 24:1076-1084, 1994 et Nature 295, page 503) pour une production dans *E. coli*, et JAMES et al. (Protein Science (1996), 5:331-340) pour une production en cellules mammifères.

La présente invention peut également concerner une composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique codant un variant de l'IFN γ thermostable selon la présente invention, une cassette d'expression, un vecteur ou une cellule hôte selon la présente invention, son utilisation pour la préparation d'un médicament, notamment destiné à traiter les maladies citées ci-dessus. Elle concerne en outre une méthode de

traitement d'un patient le nécessitant comprenant l'administration d'une telle composition en une quantité thérapeutiquement efficace.

Toutes les références citées dans cette description sont incorporées par référence dans la présente demande. D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif.

Exemples

Sélection des variants thermostables de l'IFN γ humain

Les inventeurs ont mis en oeuvre une méthode de sélection directe de variants protéiques thermostables appelée THR et décrite dans la demande de brevet français numéro 0505935.

Cette méthode est basée sur la préparation de protéine de fusion entre les variants de l'IFN γ humain et un variant d'une protéine de résistance à la kanamycine, présentant une thermostabilité accrue (Ce double mutant de la kanamycine nucléotidyl transférase est décrit dans Liao, Enzyme Microb. Technol., 1993, 15, 286-92). La banque de variants de l'IFN γ humain a été préparée par la méthode de Massive Mutagenesis® décrite dans FR2813314, et a été transformée à haute température dans la souche HB27 de *Thermus thermophilus*. Les clones transformants de cette banque ont été sélectionnés à des concentrations croissantes en kanamycine pour lesquelles la production de la fusion IFN γ (sauvage)-KNTase ne permet plus aux cellules de pousser. Les clones obtenus dans ces conditions sont théoriquement associés à un gain de stabilité à haute température, comme indiqué dans la demande de brevet FR 05 05935 déposée le 10 juin 2005. Les mutations portées par les clones sélectionnés ont été identifiées et les séquences résultantes sont répertoriées dans le tableau 1. Les différents mutants isolés lors de cette sélection primaire ont été transformés à nouveau individuellement et leur niveau de résistance a été comparé à celui de la construction sauvage. 21 mutants, conférant à la souche une résistance plus ou moins importante mais toujours supérieure au sauvage, ont ainsi été confirmés (tableau 2).

Génération systématique de variants ponctuels de l'IFN γ :

Par ailleurs, à partir du clone d'expression pORF/IFN γ , nous avons généré une importante collection de mutations ponctuelles de l'IFN γ présentant une et une seule différence d'acide aminé avec les positions de l'IFN γ dit sauvage (en prenant comme référence la SEQ N°6).

Analyse fonctionnelle des variants de l'IFN γ

Les variants de l'IFN γ humain sélectionnés par notre méthode de sélection ou générés de façon systématique sur toutes les positions de l'IFN γ ont été exprimés transitoirement en cellules animales COS7. Ces protéines sont sécrétées dans le surnageant de culture. De façon à évaluer la stabilité et la conservation de l'activité de ces variants, les surnageants de culture de cellules COS7 ont été soumis à une dénaturation thermique (10 minutes à 59°C). On a ensuite fait agir ces protéines (dénaturées ou non) sur des cellules HeLa transfectées contenant la luciférase comme gène rapporteur. Après 16 heures de stimulation, pour chaque mutant et pour chaque condition, nous avons mesuré le signal de la *firefly* luciférase correspondant à l'activité de l'IFN γ testé. On a ensuite comparé l'activité induite par la protéine non dénaturée à l'activité induite par cette même protéine dénaturée et on en a déduit l'activité résiduelle après dénaturation thermique pour la protéine étudiée (Activité résiduelle = Activité dénaturée/Activité non dénaturée * 100). L'activité basale du variant non dénaturé a également été comparée à celle de l'IFN γ non muté.

Détails des expériences :

Biologie moléculaire

Constructions plasmidiques

Systeme THR : Le vecteur qui a été utilisé comportait les origines de répllication de *E. coli* et de *T. Thermophilus*, un gène de résistance à l'ampicilline qui permet la sélection de transformants dans *E. coli*, un gène codant la KNTase thermostable sous contrôle d'un promoteur actif à la fois chez *E. coli* et de *T. thermophilus* (le promoteur ps1pA). Voir Figure 1. La séquence nucléotidique de l'IFN γ (codant pour la forme mature de 146 acides aminés SEQ ID N°5) a été clonée entre les sites NcoI et NotI du vecteur en N-terminal de la KNTase. L'IFN γ et la KNTase en fusion sont séparés par une séquence codant un peptide de liaison (« linker ») qui présentait la séquence peptidique

AAAGSSGSI (SEQ ID No 8) et était codée par la séquence nucléique GCG-GCC-GCA-GGA-AGC-TCT-GGT-TCC-ATC (SEQ ID No 7).

Système d'expression eucaryote : Pour l'expression de l'IFN γ en cellules de mammifères, nous avons utilisé le pORF/IFN γ (Invivogen) dans lequel l'IFN γ est clonée dans une cassette d'expression contenant le promoteur hybride (EF-1 α -HLTV) et le signal de polyadénylation fort du SV40.

Génération de mutants références de l'IFN γ

Plusieurs mutants thermostables décrits dans la bibliographie ont été construits et utilisés à titre de contrôles positifs. Ils codent pour :

- la protéine IFN γ E30C/S92C : mutant avec un pont disulfure (gain de stabilité TM +15 °C, Waschutza *et al.*, 1996)

- la protéine IFN γ delta 10 (extrémité C-terminale de la protéine délétée de ces 10 derniers acides aminés activité et stabilité améliorée, TM + 7,5°C et activité antivirale multipliée par 4, Slodowski *et al.*, 1991).

Ces mutants sont générés au niveau des matrices pNCK-IFN γ et PORF-IFN γ par la méthode de Massive Mutagenesis® décrite dans FR2813314.

Génération dans le pORF-IFN γ des mutants de l'IFN γ sélectionnés par la méthode THR

Les mutations simples et multiples correspondants aux mutations identifiées sur les séquences des clones sélectionnés par la méthode THR sont introduites sur le pORF-IFN γ par la méthode de Massive Mutagenesis® décrite dans FR2813314.

Génération systématique des mutations simples de l'IFN γ dans le pORF/IFN γ

La génération de façon systématique de tous les variants simples de l'IFN γ (c'est-à-dire la substitution de l'acide aminé de la protéine mature de type sauvage par les 19 autres acides aminés du code génétique) a été réalisée par la méthode de Massive Mutagenesis® décrite dans FR2813314 sur la matrice pORF/IFN γ .

Sélection de mutants thermostables par la méthode THR

Une banque de variants de l'IFN γ clonée dans le vecteur pNCK a été générée grâce à Massive Mutagenesis®. Une diversité totale a été introduite sur toutes les positions (de 21 à 166). La banque a ensuite été transformée à haute température (70°C) dans la souche HB27 de *Thermus thermophilus* et sélectionnée sur 20 ou 40 μ g/ml de kanamycine (conditions où la fusion IFN γ (sauvage)-KNTase ne permet plus à la cellule de pousser). Les mutations identifiées après séquençage sur des clones poussant sur

milieu sélectif sont répertoriées dans le tableau 1. Les différents mutants issus de cette sélection primaire ont ensuite été retransformés de manière unique et leur niveau de résistance a été comparé à celui de la construction sauvage. 21 mutants, conférant à la souche une résistance plus ou moins importante mais toujours supérieure au sauvage ont ainsi été confirmés (tableau 2).

Validation fonctionnelle de la stabilité et de l'activité des mutants de l'IFN γ

Tous les réactifs de culture cellulaire ont été fournis par Invitrogen. Les cellules HeLa ((human cervix epitheloid carcinoma cells), les cellules COS-7 (African green monkey SV40 transformed kidney cells) et les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ont été cultivées dans des conditions standards de culture (37°C en atmosphère humide contenant de 5% à 8% CO₂) en utilisant respectivement les milieux Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) et Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM). Tous ces milieux de culture sont préparés selon les recommandations du fournisseur et contiennent un analogue de la L-glutamine (le glutamax). Ils sont supplémentés en sérum de veau foetal décomplémenté (SVF) (à raison de 10% final pour les phases de culture et de transfection et en poucentage de SVF réduit dans les phases de production suivant les expériences) et en antibiotiques à raison de 100 units/ml de pénicilline et 0.1 mg/ml de streptomycine pour Hela et COS7 et à raison de 50 units/ml de pénicilline et 0.05 mg/ml de streptomycine pour les CHO. Le vecteur pSV-beta-galTM (Promega), qui exprime la bêta galactosidase sous le contrôle du promoteur précoce SV40, a été utilisé pour normaliser les efficacités de toutes les transfections réalisées.

Expression des mutants de l'IFN γ humain en cellules de mammifères COS7

Afin de réaliser les transfections des cellules COS7 par les constructions pORF/IFN γ natif ou muté, ces cellules ont été trypsinisées lorsqu'elles atteignaient 90% de confluence. Les cellules COS7 ont été ré-ensemencées suivant le ratio $\frac{1}{4}$ (c'est-à-dire de façon à ce qu'elles représentent, une fois adhérentes sur la surface, une confluence de 25% environ). La transfection des cellules COS7 a été réalisée en plaque 24 puits avec un ensemencement de 30 000 à 60 000 cellules par puits lorsque les cellules atteignent 70-80% confluence. La transfection a été réalisée avec environ 50ng d'ADN et du Jet PEI (Polyplus transfection) en utilisant un ratio Jet PEI/ADN de 5 en laissant 30

minutes à température ambiante. Après 24h de transfection, le milieu (500µL IMDM + SVF + antibiotiques) a été changé. Les surnageants contenant l'IFN γ (avec un niveau d'expression de l'ordre de 0,5 à 1µg/ml) ont été récupérés à T=24H post-transfection. Ils ont été aliquotés et conservés à -20°C avant le dosage de l'activité de l'IFN γ .

Expression des mutants de l'IFN γ humain en cellules de mammifères CHO

Afin de réaliser les transfusions des cellules CHO par les constructions pORF/ IFN γ natif ou muté, ces cellules ont été trypsinisées lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence. Les cellules CHO ont été ré-ensemencées suivant le ratio 1/3 (c'est-à-dire de façon à ce qu'elles représentent, une fois adhérentes sur la surface, une confluence de 33% environ). La transfection des cellules CHO a été réalisée lorsque les cellules atteignent 70% de confluence. Dans une flasque (T75) avec un ensemencement initial de 4 Millions de cellules par flasque, la transfection a été réalisée avec environ 8µg d'ADN et du Jet PEI (Polyplus transfection) en utilisant un ratio Jet PEI/ADN de 5 et en laissant 30 minutes à température ambiante. Après 24h de transfection, le milieu (10mls IMDM + SVF 2,5% + antibiotiques) a été échangé, après un bref lavage en PBS 1X, contre du milieu IMDM + antibiotiques en absence de SVF additionnel. Les surnageants contenant l'IFN γ (avec un niveau d'expression de l'ordre de 0,5 à 1µg/ml) ont été récupérés à T=48H post-transfection. Ils ont été aliquotés et conservés à -20°C avant le dosage de l'activité de l'IFN γ .

Quantification de l'IFN γ humain sauvage et variant

Le kit ELISA de référence pour la détermination de la quantité totale d'IFN γ provient de Clinisciences (# 88-7316-86). Nous avons vérifié que les anticorps utilisés dans cet ELISA reconnaissent de la même façon nos variants et la molécule native non mutée en quantifiant ces mêmes protéines par un autre ELISA commercial (Biosource # KHC4021).

Test primaire d'activité

Il a été déjà décrit que l'IFN γ active spécifiquement les récepteurs à l'IFN γ présents sur les cellules HeLa. La stimulation de la voie des Jak/Stat1 des cellules HeLa par l'IFN γ s'effectue en ayant, en particulier, pour conséquence l'activation de la transcription des gènes sous le contrôle de promoteur possédant des séquences GAS

pour « Gamma Activated Site ». Il est alors possible de mesurer et de comparer les activités des variants de l'IFN γ en transfectant dans les cellules HeLa un système de gène rapporteur dans lequel la luciférase (firefly luciferase) est en aval d'un promoteur possédant plusieurs sites GAS (plasmide pGAS/Luciférase de Stratagene).

Transfection transitoire des cellules HeLa par le pGAS/Luciférase

Les cellules HeLa ont été trypsinisées lorsqu'elles atteignaient 90% de confluence et ont été ré-ensemencées avec un ratio de 1/3. Les transfections de cellules HeLa à 50-80 % de confluence ont été réalisées en plaque 96 puits selon le protocole du fournisseur : 20 000 cellules par puits ont été transfectées avec environ 150ng d'ADN pGAS/Luciférase et du jet PEI dans un rapport Jet PEI/ADN de 5. Le tout a été vortexé 30s et laissé à température ambiante 30 min. Puis, 20 μ L du mélange ADN/Jet PEI ont été répartis dans chaque puits de la plaque et les cellules ainsi transfectées sont cultivées pendant 24 heures à 37°C et en 5% CO₂.

Crible primaire des variants thermostables de l'IFN γ humain

Mesure de l'activité totale basale des variants de l'IFN γ (protéine non dénaturée) / (protéine sauvage) :

Les surnageants de cellules COS7 contenant l'IFN γ ont été dilués au 1/100ème. 10 μ L de ces dilutions de surnageants de cellules COS7 contenant l'IFN γ ont été ajoutés sur les cellules HeLa transfectées par du pGAS/Luciférase. Après 16 heures à 37°C 5% CO₂ pendant lesquelles l'expression cytoplasmique de la *firefly* luciférase s'est effectuée, les culots de cellules ont été récupérés et congelés. 50 μ L de Glo lysis buffer TM (Promega), ont été ajoutés pour lyser les cellules. La lyse s'est effectuée pendant 10 min sous agitation à température ambiante de façon à libérer la luciférase produite en réponse à la stimulation spécifique de l'IFN γ . La mesure de l'activité a été initialisée par l'ajout du réactif Bright Glo TM (Promega) et la quantité de luciférase accumulée a ensuite été comptée avec un luminomètre (FLX 800, Bio-Tek Instrument). L'activité brute en IFN γ est exprimée en RLU pour « relative luciferase unit ». Le calcul de l'activité totale (par rapport à la protéine sauvage) de chaque variant (non dénaturé) est une moyenne réalisée sur la base de résultats obtenus sur 5 manipulations différentes (duplicates au minimum) et sur des surnageants de culture provenant, au minimum, de deux transfections indépendantes. Les barres d'erreur présentées sont calculées par la

formule de l'erreur standard sur la moyenne (s.e.m). L'une des façons de présenter les résultats d'activité totale est de rapporter l'activité de base de chaque variant en pourcentage de l'activité de base de l'IFN γ non muté exprimé dans les mêmes conditions pour chaque transfection.

Mesure de l'activité résiduelle des variants après dénaturation thermique par gène rapporteur luciférase :

Comme précédemment décrit par le test primaire d'activité par gène rapporteur, la quantité de luciférase a été mesurée après stimulation des cellules par 10 μ L de surnageants de cellules COS7 dilués au 1/ 100ème contenant l'IFN γ qui, suivant les cas, ont été soumis à un traitement thermique de 10 minutes à 59°C ou bien n'ont pas été traités. L'une des façons de présenter la fraction d'activité de chaque variant conservée après dénaturation thermique est de calculer l'activité résiduelle conservée de chaque variant définie par le pourcentage de l'activité basale du même variant avant dénaturation. Le calcul de l'activité résiduelle par rapport à une activité totale déterminée avant dénaturation est une moyenne réalisée sur la base de résultats obtenus sur 5 manipulations différentes (duplicates au minimum) et sur des surnageants de culture provenant, au minimum, de deux transfactions indépendantes. Les barres d'erreur présentées sont calculées sur la formule de l'erreur standard sur la moyenne (s.e.m).

Mesure d'un indice d'amélioration des variants de l'IFN γ (amélioration de la thermostabilité et/ou de l'activité) :

Une fois que l'on a vérifié qu'un variant de l'IFN γ étudié présente à la fois une amélioration de la thermostabilité et une conservation au moins partielle de l'activité intrinsèque de la protéine, on peut calculer le produit de l'activité résiduelle du mutant étudié après prétraitement, par son activité (sans pré-taitement). Cette indice donne une idée de la résultante du gain de thermostabilité et de perte relative d'activité, et donne donc une idée de l'effet *in vivo* attendu de la protéine. Les valeurs obtenues avec les protéines de référence sont les suivantes : un indice de 37 pour l'IFN γ non muté et d'environ 76 pour le variant delta 10 connu dans la bibliographie.

A l'issue du crible primaire, nous avons identifié une série de variants de l'IFN γ humain présentant une amélioration de thermostabilité et/ou d'activité par rapport à l'IFN γ humain non muté comme décrit sur les figures 2 à 6.

Crible secondaire des variants thermostables de l'IFN γ humain - mesure de la demi-vie *in vitro*

En vue de comparer l'amélioration de la stabilité intrinsèque des variants de l'IFN γ les plus thermostables issus du crible primaire, nous avons suivi, dans un crible secondaire, l'évolution de l'activité des IFN γ variants en fonction du temps lors d'une dénaturation thermique à 59°C. Nous avons ainsi déterminé une demi-vie à 59°C encore appelée ici « demi-vie *in vitro* » qui correspond au temps de dénaturation nécessaire pour faire disparaître 50% de l'activité initiale de l'IFN γ à 59°C. Cette demi-vie a été obtenue en contrôlant particulièrement tous les paramètres suivants: une même concentration initiale d'IFN γ de 1000pg/ml, une concentration en sérum SVF dans l'échantillon final à dénaturer équivalente et ajustée à 0,15% et une température de dénaturation de 59°C pendant 30 minutes avec des prélèvements toutes les 10 minutes.

Les concentrations en IFN γ des surnageants de cellules CHO ont été estimées par ELISA. Ces différents lots d'IFN γ variants ont été ensuite dilués à 1000pg/ml dans un milieu IMDM SVF 0,15%. Ces dilutions ont été ensuite aliquotées de façon à subir un pré-traitement de dénaturation thermique à 59°C pendant 0, 10 20 et 30 minutes. 10 μ L de ces dilutions pré-traitées ont été ajoutés dans 100 μ l de milieu de culture de cellules HeLa transfectées par du pGAS/Luciférase comme décrit précédemment. Après 16 heures à 37°C 5% CO₂, la lyse des culots de cellules et la quantification de la luciférase correspondante a été effectuée comme précédemment.

L'une des façons de présenter les données est de reporter l'activité brute correspondant à la stimulation spécifique de la voie de transduction par l'IFN γ variant, activité brute exprimée alors en RLU pour « relative luciferase unit ». Une autre façon de présenter la fraction d'activité conservée après dénaturation thermique (encore appelée activité résiduelle) de chaque variant est de calculer, et ce pour chaque temps de dénaturation, le pourcentage résiduel d'activité conservée par rapport à l'activité basale du même variant avant dénaturation. Ces calculs se font après soustraction de la part de signal due aux cellules non transfectées.

Les demi-vies de chaque variant ainsi déterminées sont alors comparées à celle de l'IFN γ sauvage. Les demi-vies (T_{1/2}) sont exprimées en minutes et sont calculées à l'aide de la formule suivante :

$$T_{1/2} = \ln(2)/(k \text{ inactivation})$$

Où k inactivation est la constante de vitesse de la phase d'inactivation.

Cette constante est calculée sur la moyenne des taux d'inactivation instantanés de chaque temps par la formule suivante :

$$\ln A(t) = \ln b - t * (k \text{ inactivation})$$

A(t) est l'activité IFN gamma au temps tps t et b est une constante.

Ainsi, pour résumer, les demi-vies « *in vitro* » calculées ici, présentées dans la figure 7 et récapitulées dans le tableau 3, correspondent au temps pour lequel on a conservé la moitié de l'activité maximale de chacun des variant d'IFN γ .

Un autre paramètre décrit dans le tableau 3 est le ratio d'amélioration de la demi-vie de chacun des mutants par rapport à celle de la molécule sauvage non mutée produite dans les mêmes conditions. Plus ce paramètre est élevé plus l'amélioration de la demi-vie « *in vitro* » du variant est importante comparée à celle de l'IFN γ humain non muté.

Ainsi, à l'issue de ce crible secondaire, nous décrivons ici 16 mutants de l'IFN γ présentant une nette amélioration de leur demi-vie *in vitro* et ce d'un facteur 200 à 1,4 fois comme résumés figure 7 et tableau 3.

Mesure de paramètres pharmacocinétiques des variants thermostables de l'IFN γ humain chez la souris

Ces expériences pharmacocinétiques descriptives ont pour but de déterminer dans le cas des variants thermostables de l'IFN γ la demi-vie biologique ou demi-vie terminale d'élimination (encore appelée ici « demi-vie *in vivo* »), ainsi que les aires sous la courbe pour différents modes d'administration (injection par voie intraveineuse (i.v) ou par voie sous-cutanée (s.c)). Ces données seront ensuite comparées à celles obtenues dans le cas de l'IFN γ sauvage produit en cellules de mammifères et dans le cas de l'IFN γ standard recombinant produit chez *E.coli* présentant les caractéristiques de la molécule du marché, c'est à dire un pseudo « Actimmune ».

La mesure de la demi-vie biologique peut être réalisée de multiples façons :

Une méthode décrite par Rutenfranz et al. (J. Interferon Res. 1990, vol. 10, p. 337-341) utilise des injections intraveineuses et intramusculaires sur des souris C57BL/6 de 8 semaines

La demi-vie est alors estimée par un test d'activité anti-virale directement sur les sérums murins (Cellules Hep-2 infectées par un virus (vesicular stomatitis virus ou VVS). L'ELISA est, dans cet exemple, utilisé comme alternative pour détecter les niveaux d'IFN γ dans le sérum murin.

Une autre façon décrite dans Croos and Roberts (J.Pharm., 1993, vol 45, p. 606609) consiste à réaliser des expériences avec de l'IFN γ marqué par un isotope radioactif et de suivre l'absorption de cette molécule marquée dans les tissus et son passage dans le sérum de rats femelle Sprague-Dawley après injection sous-cutanée. Les échantillons de tissus et de sang sont alors analysés pour la quantité d'IFN γ marqué qu'ils contiennent. L'utilisation de méthode ELISA pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques d'IFN a été décrite pour l'IFN alpha par administration sous-cutanée par Rostaing et al. (1998), J. Am. Soc. Nephrol.9 (12): 2344-48 et par administration intramusculaire par Merimsky et al.(1991), Cancer Chemother. Pharmacol. 27 (5).]

L'IFN γ sauvage et les mutants ont été exprimés à partir de cellules COS et CHO. Ces surnageants de culture ont été centrifugés une seconde fois à 4000 RPM, 10 min, et filtrés sur filtre Millipore PES 0,22 μ m. Les volumes des surnageants filtrés sont alors concentrés par centrifugation sur des unités de filtration Vivaspine de seuil de coupure de 5000 daltons (Sartorius). Les concentrations en IFN γ sont alors estimées pour ces échantillons en appliquant les dilutions préalables adaptées.

Les lots d'IFN γ variants et sauvage sont administrés selon deux modes :

- par une injection de 100 μ l de solutions d'IFN γ concentrées à 10 μ g/ml dans les veines caudales de souris C57BL/6J.
- ou bien par une injection de 100 μ l de solution d'IFN γ concentrées à 6,7 μ g/ml en sous-cutané dans le ventre de souris C57BL/6J.

Pour ces expériences, sont utilisées des souris C57BL/6J âgées de 8 semaines d'un poids moyen entre 20 et 30 grammes. Ces animaux sont acclimatés une semaine dans une pièce sous une température constante de 24,1°C, une humidité constante de 55% et avec des cycles repos/sommeil de 12h.

Les échantillons de sang de souris sont collectés aux différents temps suivants après administration de la molécule d'intérêt. Des prélèvements rétro-orbitaux sont réalisés pour les temps 3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h, 192h et des prélèvements cardiaques post-mortem pour le temps final à 216 heures.

Le sérum est préparé en laissant coaguler le sang pendant 20 minutes à température ambiante et en récupérant la fraction correspondant au surnageant d'une centrifugation à 5000 g, 20 min à 20°C. Le sérum est ensuite isolé et stocké à -80°C en attendant que l'activité de l'IFN γ soit mesurée en utilisant le dosage ELISA décrit plus haut.

On évalue ensuite la concentration plasmatique en IFN γ au cours du temps par le suivi de la quantité d'IFN γ détectée par ELISA dans chaque sérum de souris. Pour chaque prélèvement effectué en rétro-orbital, la quantification d'IFN γ obtenue résulte de la moyenne d'au minimum 3 sérums différents issus de 3 souris. Ces différentes expériences de pharmacocinétique ont été reproduites pour chaque variant au minimum deux fois à partir de lots d'IFN γ provenant de transfections différentes. Au final, on reporte la concentration en IFN γ dans le sérum au cours du temps.

Les paramètres $[T_{1/2\ i.v.}, AUC_{i.v.}]$ $[T_{1/2sc}$ et $AUC_{sc}]$, sont calculés à l'aide du logiciel Kinetica (Vs 4.4.1 Thermo Electron inc).en utilisant un modèle d'analyse pharmacocinétique « Intra Veinous bolus non-compartmental » et « extravascular bolus » respectivement.

Un autre paramètre décrit dans les tableaux 4 et 5 sont les ratio d'amélioration de la demi-vie ou de l'aire sous la courbe de chacun des mutants par rapport aux paramètres respectifs de la molécule sauvage non mutée produite dans les mêmes conditions et par rapport aux paramètres respectifs de l'IFN γ humain recombinant bactérien quand les données sont disponibles. Plus ces ratios sont élevés, plus l'amélioration du variant est importante comparée à celle de l'IFN γ humain non muté.

Les résultats de ces expériences et leur analyse sont présentés respectivement figure 8 et tableau 4 dans le cas des injections intraveineuses et figure 9 et tableau 5 dans le cas des injections en sous-cutané.

Nous voyons que les mutations S63C, G41S ainsi que leur combinaison, ont pour conséquence une nette amélioration de la demi-vie *in vivo* de ces variants comparée à celle de l'IFN γ humain recombinant produit en CHO et à celle de l'IFN γ humain recombinant produit en bactérie. Après administration en sous-cutanée, le double mutant présente toujours une nette amélioration de ces paramètres pharmacocinétiques comparés à ceux de l'IFN γ humain recombinant produit en CHO.

Nom	position des mutations (aa)
1	147: GCT→GAA (Ala→Glu) 162: CGA→GAC (Arg→Asp)
2	162: CGA→GAA (Arg→Glu)
4	163: AGA→ACC (Arg→Thr)
5	21: TGT→GGC (Cys→Gly) 159: TTT→TGC (Phe→Cys)
8	100: ATG→AAC (Met→Asn) 119: ACT→TAC (Thr→Tyr)
9	24: CAG→GCG (Gln→Ala)
10	22: TAC→GAC (Tyr→Asp) 122: TCG→CAC (Ser→His)
12	25: GAC→GTC (Asp→Val)
13	76: TAC→GAC (Tyr→Asp) 131: AAA→ATC (Lys→Ile)
14	22: TAC→ACG (Tyr→Thr) 109: AAA→TGC (Lys→Cys) 119: ACT→CCC (Thr→Pro) 147: GCT→TTC (Ala→Phe) 163: AGA→CTC (Arg→Leu)
15	50: ACT→TAC (Thr→Tyr) 121: TAT→ACC (Tyr→Thr) 140: ATG→CCG (Met→Pro)
17	28: GTA→TGC (Val→Cys)
18	22: TAC→CTC (Tyr→Leu) 68: ATG→TTC (Met→Phe) 86: GAC→CAG (Asp→Gln) 100: ATG→TGG (Met→Trp) 119: ACT→AGG (Thr→Arg)
19	21: TGT→GAG (Cys→Glu) 45: GTA→GGT (Val→Gly) 65: AGA→ATC (Arg→Ile) 71: CAA→TGC (Gln→Cys) 89: ATC→TTC (Ile→Phe)
20	68: ATG→CTG (Met→Leu)
21	26: CCA→GAC (Pro→Asp) 122: TCG→CCG (Ser→Pro)
22	165: TCC→GTG (Ser→Val)
23	120: AAT→ATG (Asn→Met)
26	21: TGT→CAG (Cys→Gln) 90: CAA→CAT (Gln→Asn)
28	22: TAC→TCC (Tyr→Ser) 158: CTG→TGG (Leu→Trp) 163: AGA→GGA (Arg→Gly)
31	124: ACT→CGG (Thr→Arg)
32	164: GCA→GAG (Ala→Glu)
34	126: TTG→CAT (Leu→His) 157: ATG→TGG (Met→Trp)
35	22: TAC→TCC (Tyr→Ser) 158: CTG→TGG (Leu→Trp)
36	162: CGA→CAA (Arg→Gln) 164: GCA→GAG (Ala→Glu)
6	21: TGT→TGG (Cys→Trp)
7	21: TGT→GGC (Cys→Gly)
11	25: GAC→CAC (Asp→His)
24	22: TAC→TGG (Tyr→Trp)
25	22: TAC→TTC (Tyr→Phe)
27	21: TGT→GAG (Cys→Glu)
29	21: TGT→GCC (Cys→Ala)
30	59: TGG→TT (Trp→Phe)
33	51: CTT→TTC (Leu→Phe)
37	98: GAA→AAA (Glu→Lys)
38	63: AGT→AGG (Ser→Arg)
39	28: GTA→TGC (Val→Cys)

Tableau 1

No clone	Positions mutées
1	147: GCT→GAA (Ala→Glu) 162: CGA→GAC (Arg→Asp)
2	162: CGA→GAA (Arg→Glu)
4	163: AGA→ACC (Arg→Thr)
5	21: TGT→GGC (Cys→Gly) 159: TTT→TGC (Phe→Cys)
6	21: TGT→TGG (Cys→Trp)
8	100: ATG→AAC (Met→Asn) 119: ACT→TAC (Thr→Tyr)
9	24: CAG→GCG (Gln→Ala)
12	25: GAC→GTC (Asp→Val)
13	76: TAC→GAC (Tyr→Asp) 131: AAA→ATC (Lys→Ile)
15	50: ACT→TAC (Thr→Tyr) 121: TAT→ACC (Tyr→Thr) 140: ATG→CCG (Met→Pro)
21	26: CCA→GAC (Pro→Asp) 122: TCG→CCG (Ser→Pro)
37	98: GAA→AAA (Glu→Lys)
39	28: GTA→TGC (Val→Cys)
22	165: TCC→GTG (Ser→Val)
28	22: TAC→TCC (Tyr→Ser) 158: CTG→TGG (Leu→Trp) 163: AGA→GGA (Arg→Gly)
10	22: TAC→GAC (Tyr→Asp) 122: TCG→CAC (Ser→His)
34	126: TTG→CAT (Leu→His) 157: ATG→TGG (Met→Trp)
36	162: CGA→CAA (Arg→Gln) 164: GCA→GAG (Ala→Glu)
14	22: TAC→ACG (Tyr→Thr) 109: AAA→TGC (Lys→Cys) 119: ACT→CCC (Thr→Pro) 147: GCT→TTC (Ala→Phe) 163: AGA→CTC (Arg→Leu)
30	59: TGG→TT (Trp→Phe)
38	63: AGT→AGG (Ser→Arg)

Tableau 2

	T _{1/2} , min Demi-vie <i>in vitro</i> à 59°C,	Ratio d'amélioration de la demi vie du variant / demi vie WT produit en CHO
IFN gamma non muté (produit CHO)	5	1
G41S_S63C	981	200,6
S63C	50	10,3
E62C	53	10,9
F159C	33	6,7
D99Y	32	6,6
E116C	31	6,4
M157C	31	6,4
L158C	21	4,2
S74G	18	3,6
R162C	17	3,4
S122D	14	3,0
M100N	11	2,2
L126P	9	1,9
N58R	7	1,4
T95V	7	1,4
G41S	7	1,4

TABLEAU 3

	T1/2 i.v, h	Ratios d'amélioration	
		T1/2 i.v mutant / T1/2 i.v « Actimmune »	T1/2 i.v mutant / T1/2 i.v WT CHO
IFN gamma recombinant bactérien	4,5	1	-
IFN gamma WT, CHO	7,4	1,7	1
G41S-S63C	25,3	5,6	3,4
G41S	15	3,3	2
S63C	13,4	3	1,8
L158C	8,7	1,9	1,2
F159C	8,0	1,8	1,1
S122D	7,8	1,7	1,1
E116C	8,3	1,8	1,1
E62C	7,5	1,7	1,0
D99Y	7,3	1,6	1,0
M157C	7,4	1,6	1,0
L126P	7,6	1,7	1,0
T95V	7,7	1,7	1,0
R162C	7,0	1,6	0,9

TABLEAU 4

Dose 670 ng	AUC tot. s.c,	Ratio AUC tot s.c /WT CHO	T1/2. s.c, h	Ratio T1/2 s.c /WT CHO
IFNγ WT CHO	222140	--	12,3	--
G41S-S63C	914660	4,1	30,3	2,5

TABLEAU 5

Revendications

- 1- Composition pharmaceutique comprenant un variant thermostable de l'interféron gamma (IFN γ) humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une première substitution sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, L126P, N58R, et T95V, les positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2, le variant ne portant pas de groupement non-peptidique attaché sur le(s) résidu(s) introduit(s) par la ou les premières substitution(s).
- 2- Composition pharmaceutique selon la revendication 1, dans laquelle le variant diffère d'un polypeptide présentant une séquence sélectionnée parmi les séquences SEQ ID Nos 2, 4 et 6 par au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s), de préférence par 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 résidu(s).
- 3- Composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le variant présente une unique substitution.
- 4- Composition pharmaceutique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le variant comprend en outre au moins une autre substitution sélectionnée parmi le groupe constitué de M157C, G41S et M100N, les positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2.
- 5- Composition pharmaceutique selon la revendication 4, dans laquelle le variant comprend ou présente une combinaison de deux substitutions sélectionnées parmi le groupe consistant en S63C, E62C, F159C, D99Y, E116C, L158C, S74G, R162C, S122D, M100N, L126P, N58R, T95V, M157C et G41S, les positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2.
- 6- Composition pharmaceutique selon la revendication 5, dans laquelle le variant comprend ou présente une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C +

L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S, E62C + F159C, E62C + D99Y, E62C + E116C, E62C + L158C, E62C + S74G, E62C + R162C, E62C + S122D, E62C + M100N, E62C + L126P, E62C + N58R, E62C + T95V, E62C + M157C, E62C + G41S, F159C + D99Y, F159C + E116C, F159C + L158C, F159C + S74G, F159C + R162C, F159C + S122D, F159C + M100N, F159C + L126P, F159C + N58R, F159C + T95V, F159C + M157C, F159C + G41S, D99Y + E116C, D99Y + L158C, D99Y + S74G, D99Y + R162C, D99Y + S122D, D99Y + M100N, D99Y + L126P, D99Y + N58R, D99Y + T95V, D99Y + M157C, D99Y + G41S, E116C + L158C, E116C + S74G, E116C + R162C, E116C + S122D, E116C + M100N, E116C + L126P, E116C + N58R, E116C + T95V, E116C + M157C, E116C + G41S, L158C + S74G, L158C + R162C, L158C + S122D, L158C + M100N, L158C + L126P, L158C + N58R, L158C + T95V, L158C + M157C, L158C + G41S, S74G + R162C, S74G + S122D, S74G + M100N, S74G + L126P, S74G + N58R, S74G + T95V, S74G + M157C, S74G + G41S, R162C + S122D, R162C + M100N, R162C + L126P, R162C + N58R, R162C + T95V, R162C + M157C, R162C + G41S, S122D + L126P, S122D + N58R, S122D + T95V, S122D + M157C, S122D + M100N, S122D + G41S, L126P + N58R, L126P + T95V, L126P + M157C, L126P + M100N, L126P + G41S, N58R + T95V, N58R + M157C, N58R + M100N, N58R + G41S, T95V + M157C, T95V + M100N, T95V + G41S, M157C + M100N et M157C + G41S, les positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2.

7- Composition pharmaceutique selon la revendication 6, dans laquelle le variant comprend ou présente une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en S63C + E62C, S63C + F159C, S63C + D99Y, S63C + E116C, S63C + L158C, S63C + S74G, S63C + R162C, S63C + S122D, S63C + M100N, S63C + L126P, S63C + N58R, S63C + T95V, S63C + M157C, S63C + G41S, les positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2.

8- Composition pharmaceutique selon la revendication 7, dans laquelle le variant comprend ou présente la combinaison S63C + G41S, les positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2.

- 9- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le variant ne présente pas de délétion de 1 à 11 résidus à l'extrémité C-terminale.
- 10- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le variant présente une délétion de 1 à 11 résidus à l'extrémité C-terminale.
- 11- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle le variant ne porte pas de groupement non-peptidique sélectionné parmi le groupe constitué d'une molécule polymère, d'une molécule lipophile, et d'un agent organique de dérivatisation.
- 12- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle le variant porte un groupement non-peptidique sélectionné parmi le groupe constitué d'une molécule polymère, d'une molécule lipophile, et d'un agent organique de dérivatisation.
- 13- Composition pharmaceutique selon la revendication 11 ou 12, dans laquelle le groupement non-peptidique est une molécule polymère, de préférence un polyéthylène glycol.
- 14- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans laquelle le variant est glycosylé.
- 15- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans laquelle le variant n'est pas glycosylé.
- 16- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, comprenant en outre au moins un autre principe actif.
- 17- Composition pharmaceutique selon la revendication 16, dans laquelle l'au moins un autre principe actif est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un agent anti-tumoral ou de chimiothérapie, un glucocorticoïde, un agent anti-histaminique, une

hormone adrénocorticale, un agent anti-allergique, un vaccin, un broncodilatateur, un stéroïde, un agent bêta-adrénergique, un agent immunomodulateur, une cytokine telle que l'interféron alpha ou bêta, l'interleukine 1 ou 2, le TNF (facteur de nécrose tumorale), l'hydroxyurée, un agent alkylant, un antagoniste de l'acide folique, un antimétabolite du métabolisme des acides nucléiques, un poison fusoral, un antibiotique, un analogue de nucléotides, un rétinoïde, un inhibiteur de lipoxigénase et de cyclo-oxygénase, un acide fumarique et ses sels, un analgésique, un spasmolytique, et un antagoniste du calcium.

18- Composition pharmaceutique selon la revendication 17, dans laquelle l'au moins un autre principe est un interféron alpha ou bêta.

19- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 formulée pour une administration orale, parentérale (par exemple sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, ou intradermique), sublinguale, topique, locale, intratrachéale, intranasale, transdermique, rectale, intraoculaire, ou intra-auriculaire.

20- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 19 en tant que médicament.

21- Produit comprenant une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 15 et un autre principe actif pour une préparation combinée destinée à une utilisation simultanée, séquentielle ou séparée en tant que médicament antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur.

22- Produit selon la revendication 21, dans lequel l'autre principe actif est sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un agent anti-tumoral ou de chimiothérapie, un glucocorticoïde, un agent anti-histaminique, une hormone adrénocorticale, un agent anti-allergique, un vaccin, un broncodilatateur, un stéroïde, un agent bêta-adrénergique, un agent immunomodulateur, une cytokine telle que l'interféron alpha ou bêta, l'interleukine 1 ou 2, le TNF (facteur de nécrose tumorale), l'hydroxyurée, un agent alkylant, un antagoniste de l'acide folique, un antimétabolite du métabolisme des acides nucléiques, un poison fusoral, un antibiotique, un analogue de nucléotides, un rétinoïde,

un inhibiteur de lipoxygénase et de cyclo-oxygénase, un acide fumarique et ses sels, un analgésique, un spasmolytique, et un antagoniste du calcium.

23- Produit selon la revendication 22, dans lequel l'autre principe est un interféron alpha ou bêta.

24- Produit selon l'une des revendications 21 à 23, dans lequel les deux principes actifs sont administrés par la même voie d'administration ou par deux voies d'administration distinctes.

25- Produit selon l'une des revendications 21 à 24, dans lequel le médicament est destiné au traitement d'une pathologie sélectionnée parmi l'asthme, la granulomatose chronique familiale, la fibrose pulmonaire idiopathique, une infection à mycobactérie atypique, le cancer du rein, l'ostéopétrose, une sclérodermie généralisée, une hépatite chronique à virus B ou C, un choc septique, une dermatite allergique, et l'arthrite rhumatoïde.

26- Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1-19 pour la préparation d'un médicament antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur.

27- Utilisation selon la revendication 26, dans laquelle le médicament est destiné au traitement d'une pathologie sélectionnée parmi l'asthme, la granulomatose chronique familiale, la fibrose pulmonaire idiopathique, une infection à mycobactérie atypique, le cancer du rein, l'ostéopétrose, une sclérodermie généralisée, une hépatite chronique à virus B ou C, un choc septique, une dermatite allergique, et l'arthrite rhumatoïde.

28- Acide nucléique codant un variant thermostable de l'IFN γ tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 1-15.

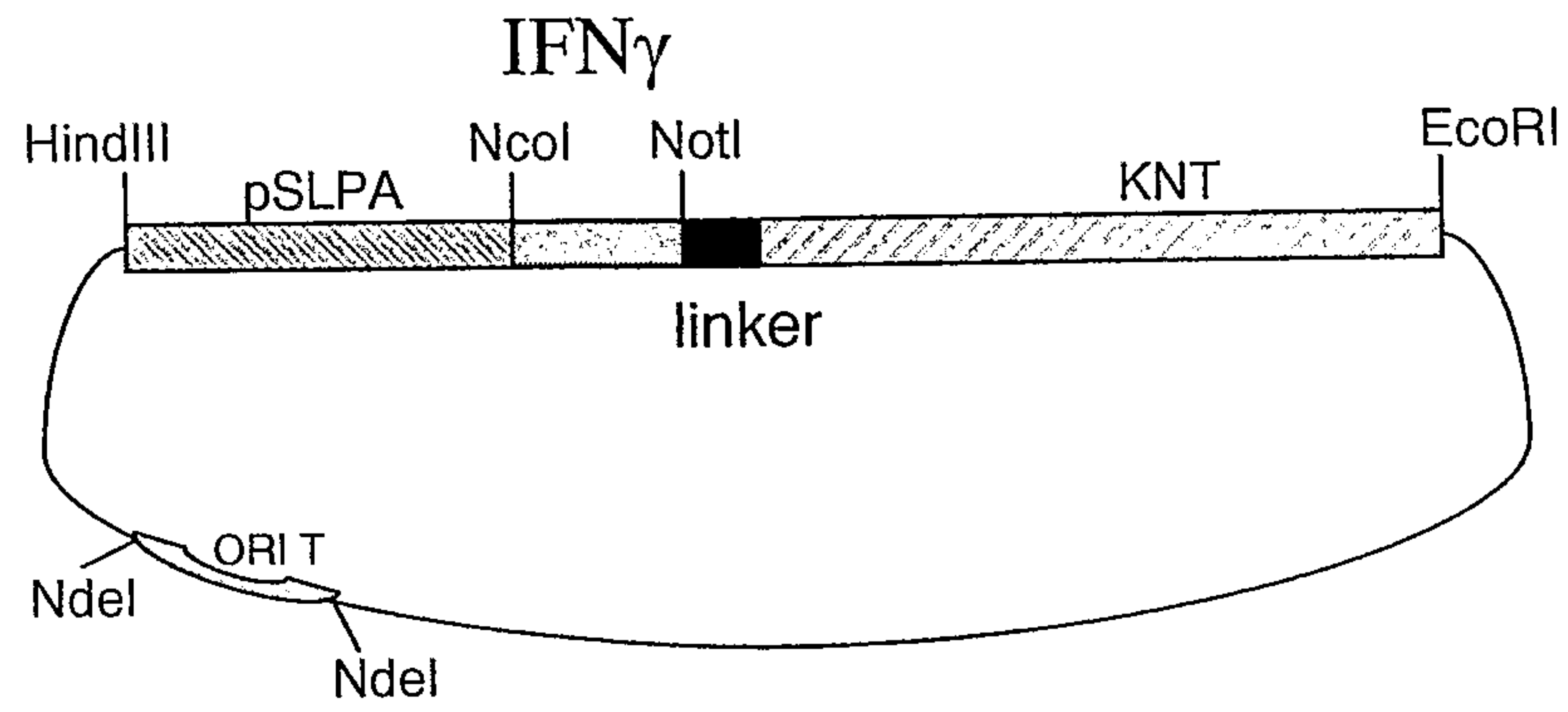
29- Cassette d'expression d'un acide nucléique selon la revendication 28.

30- Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 28 ou une cassette d'expression selon la revendication 29.

31- Cellule hôte comprenant un acide nucléique selon la revendication 28, une cassette d'expression selon la revendication 29 ou un vecteur selon la revendication 30.

32- Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 28, une cassette d'expression selon la revendication 29, un vecteur selon la revendication 30 ou d'une cellule selon la revendication 31 pour produire un variant thermostable de l'IFN γ décrit dans l'une quelconque des revendications 1-15.

1/14



pNCK - IFN γ

Figure 1

Fig. 2A

2/14

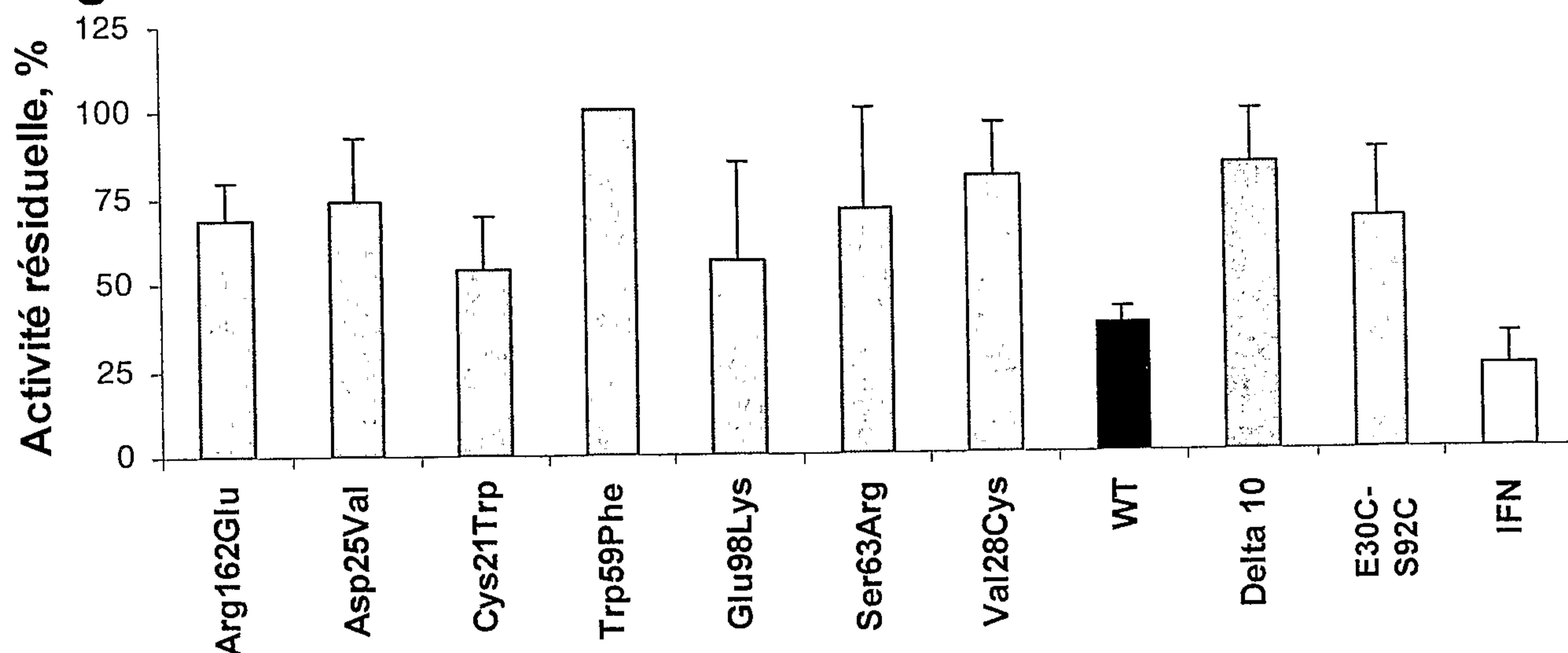


Fig. 2B

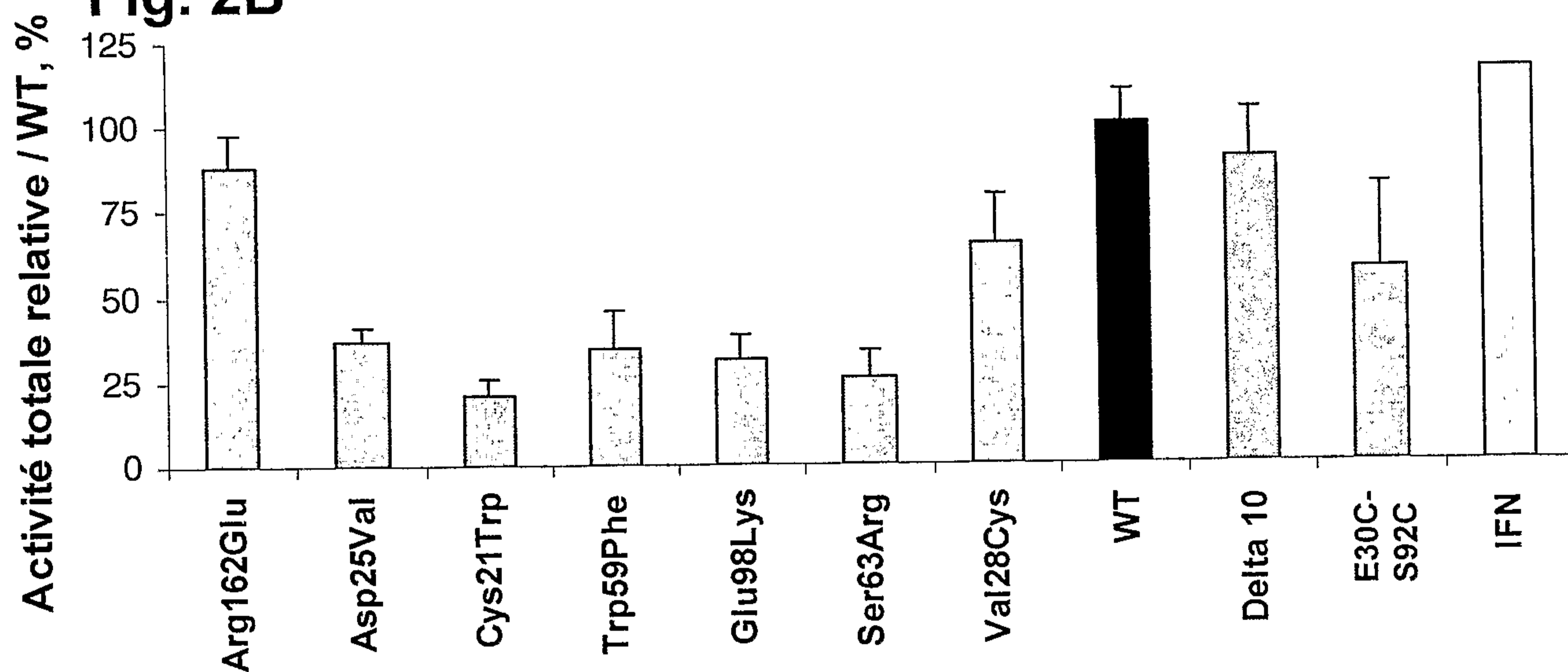


Fig. 2C

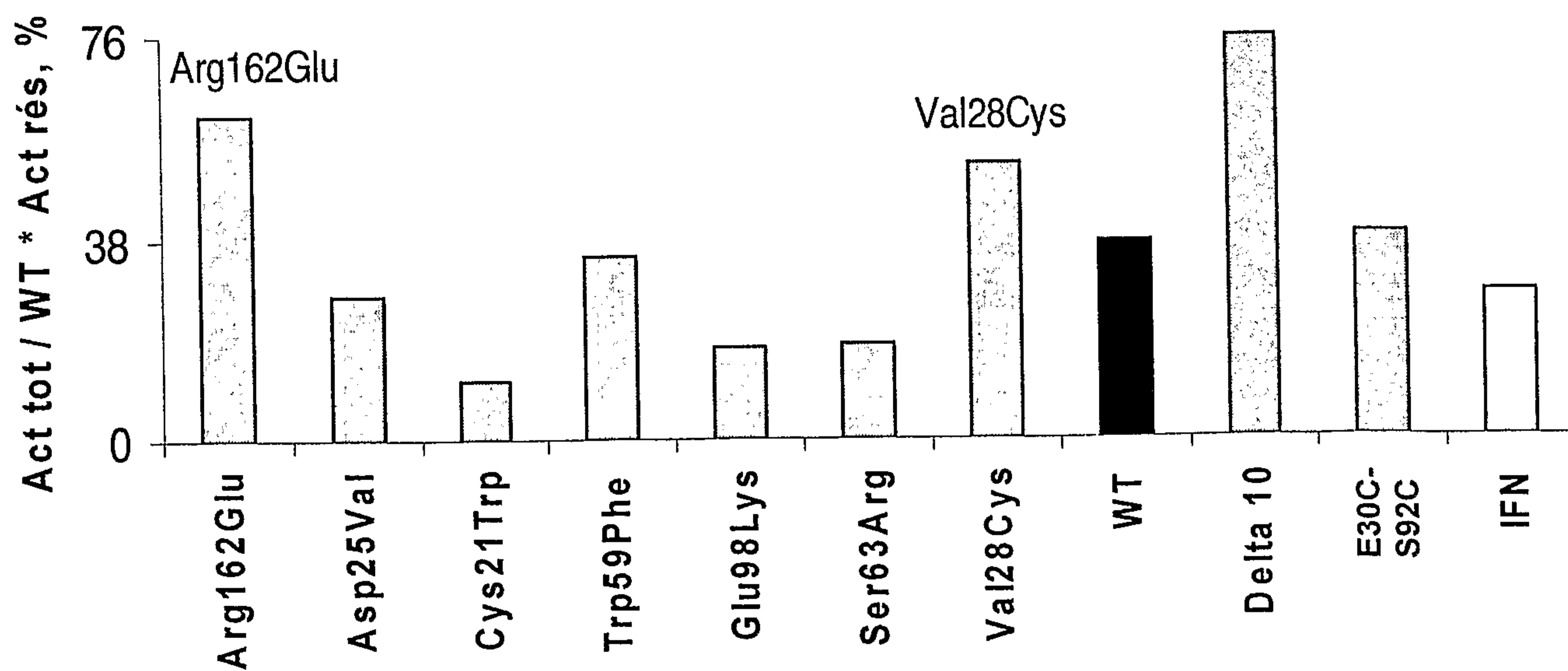


Fig. 3A

3/14

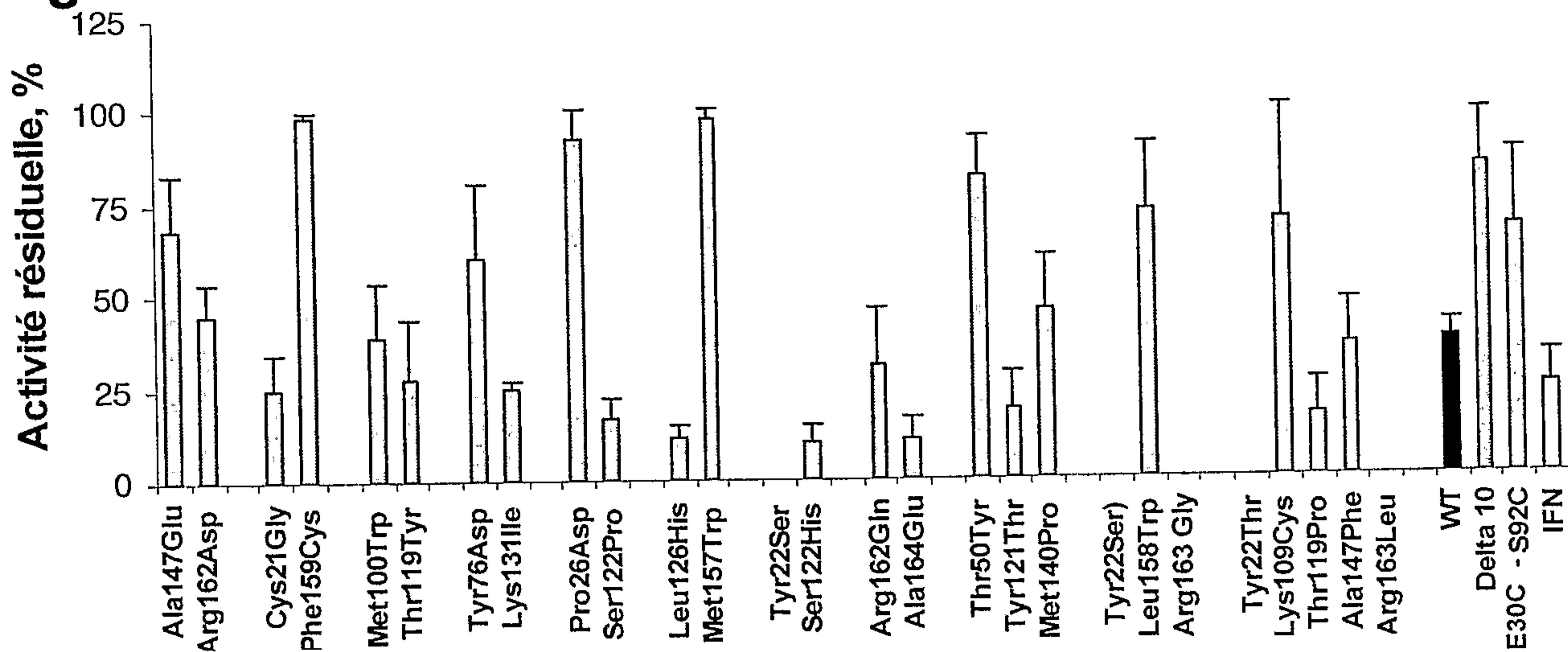


Fig. 3B

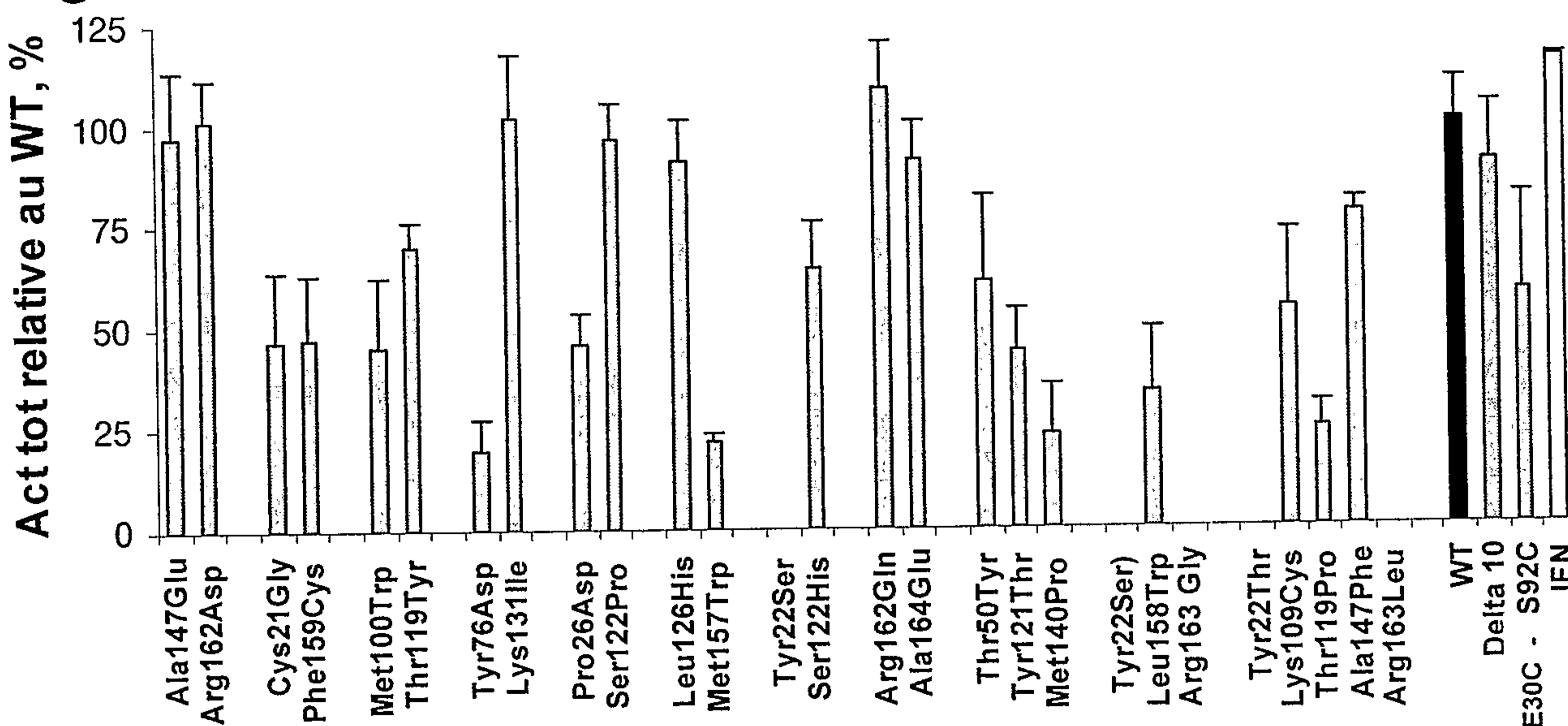


Fig. 3C

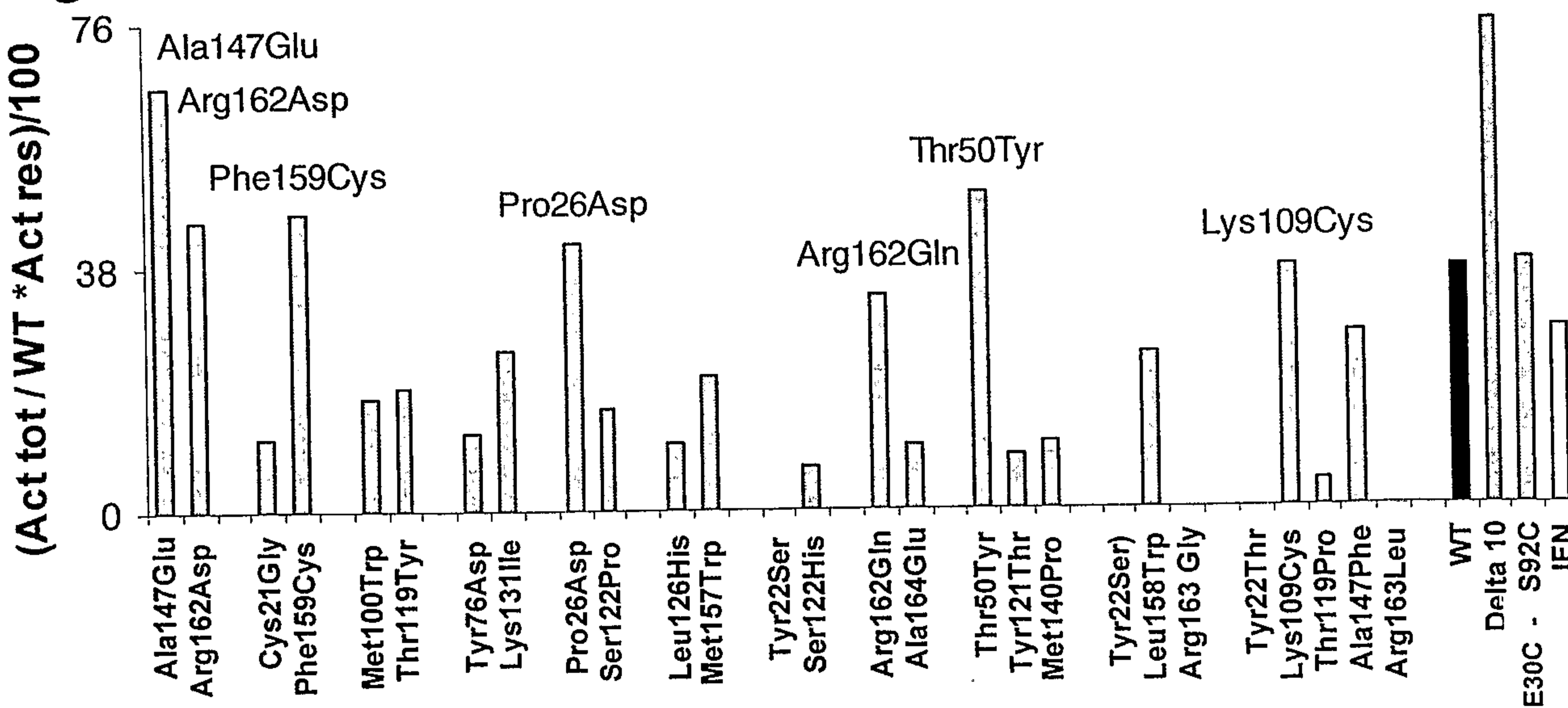


Fig. 4A

4/14

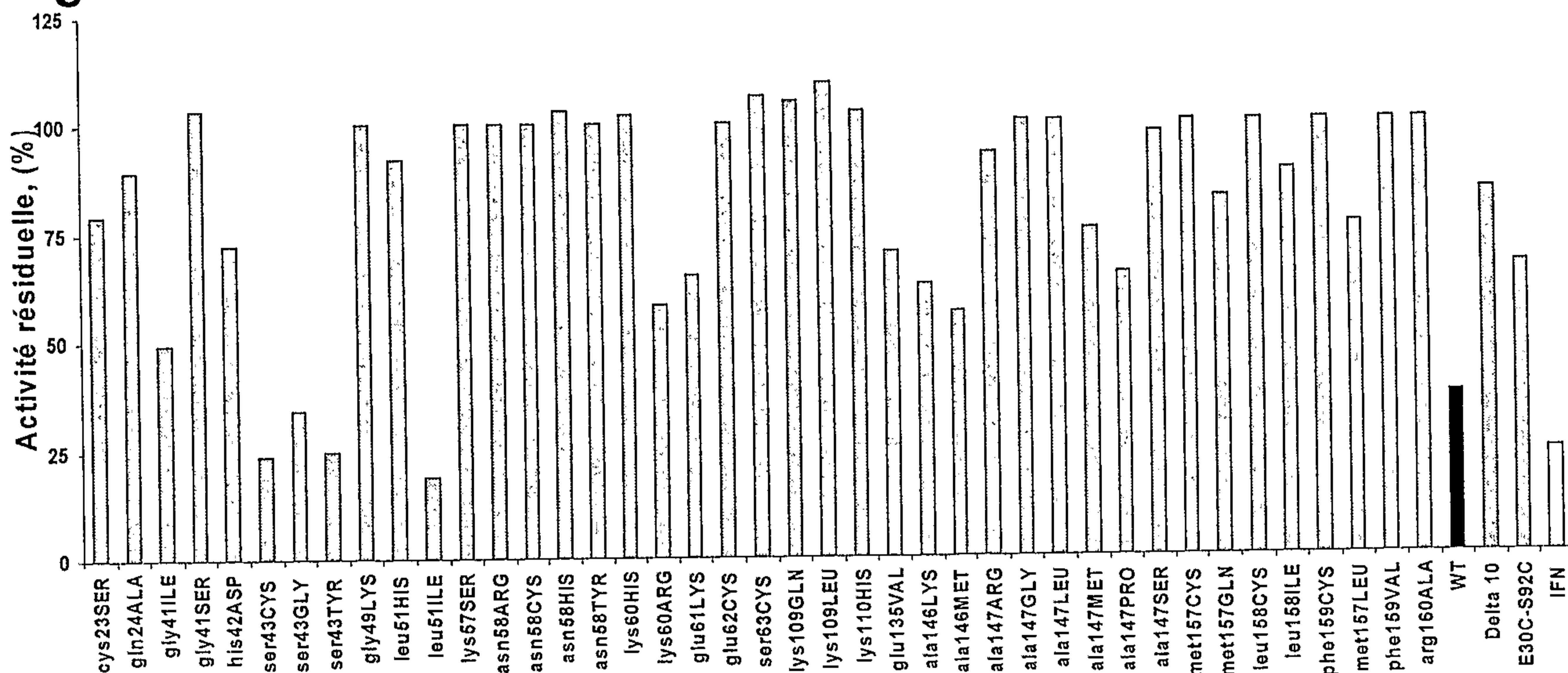


Fig. 4B

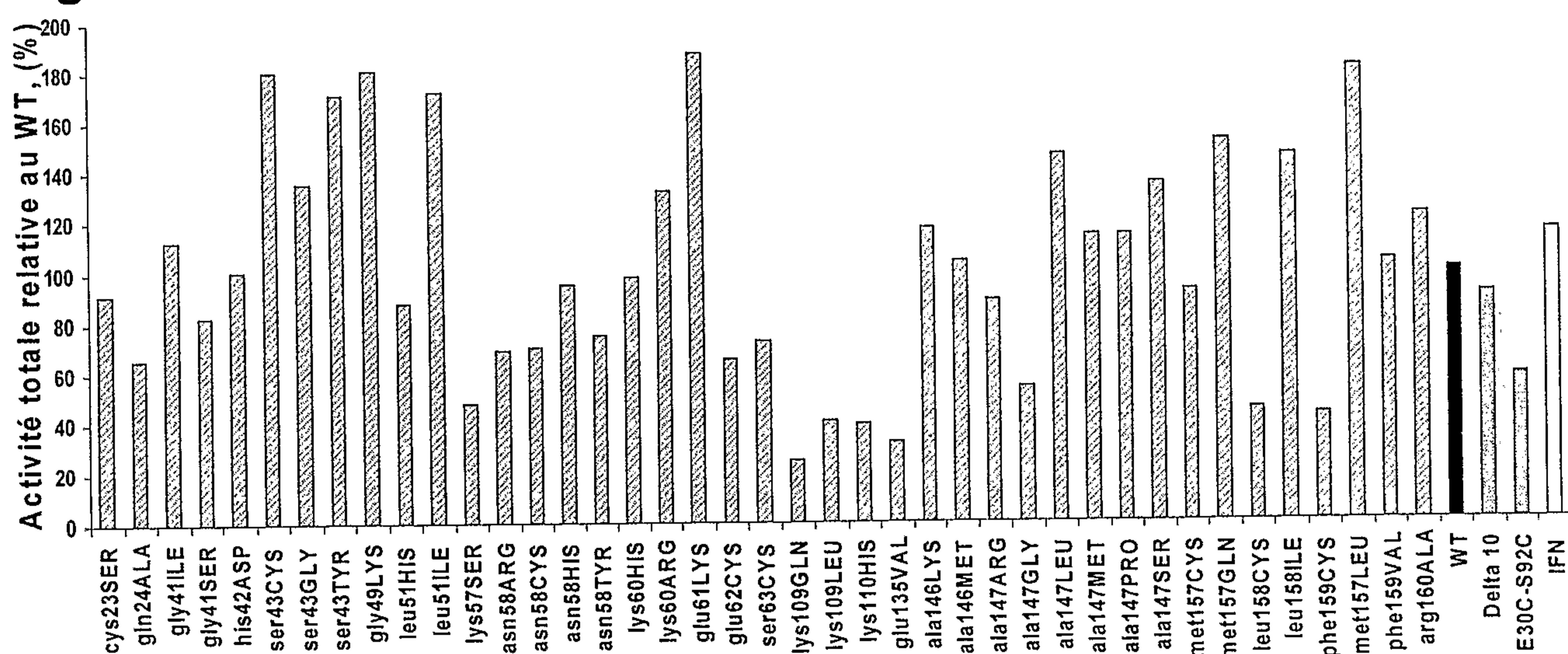


Fig. 4C

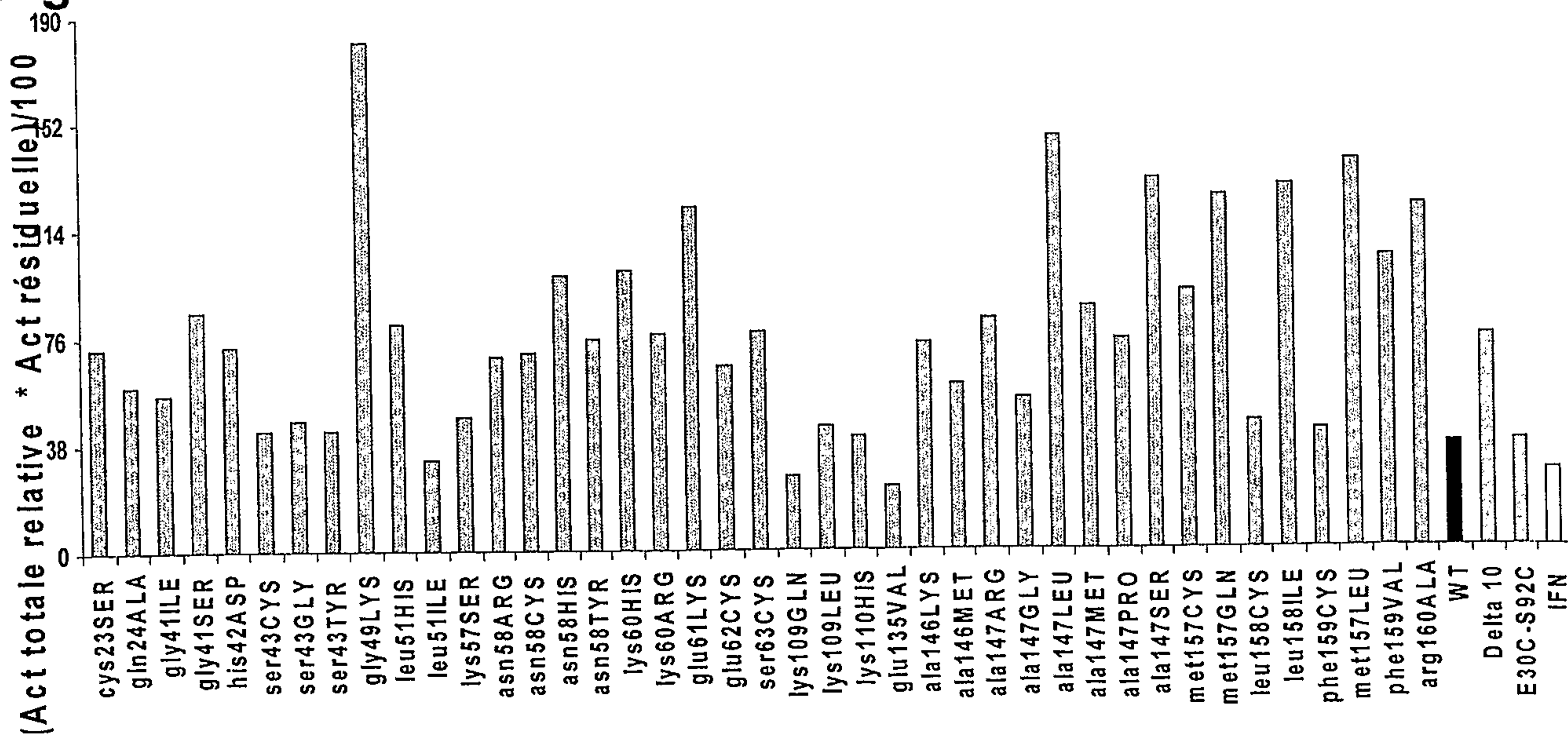


Figure 5A

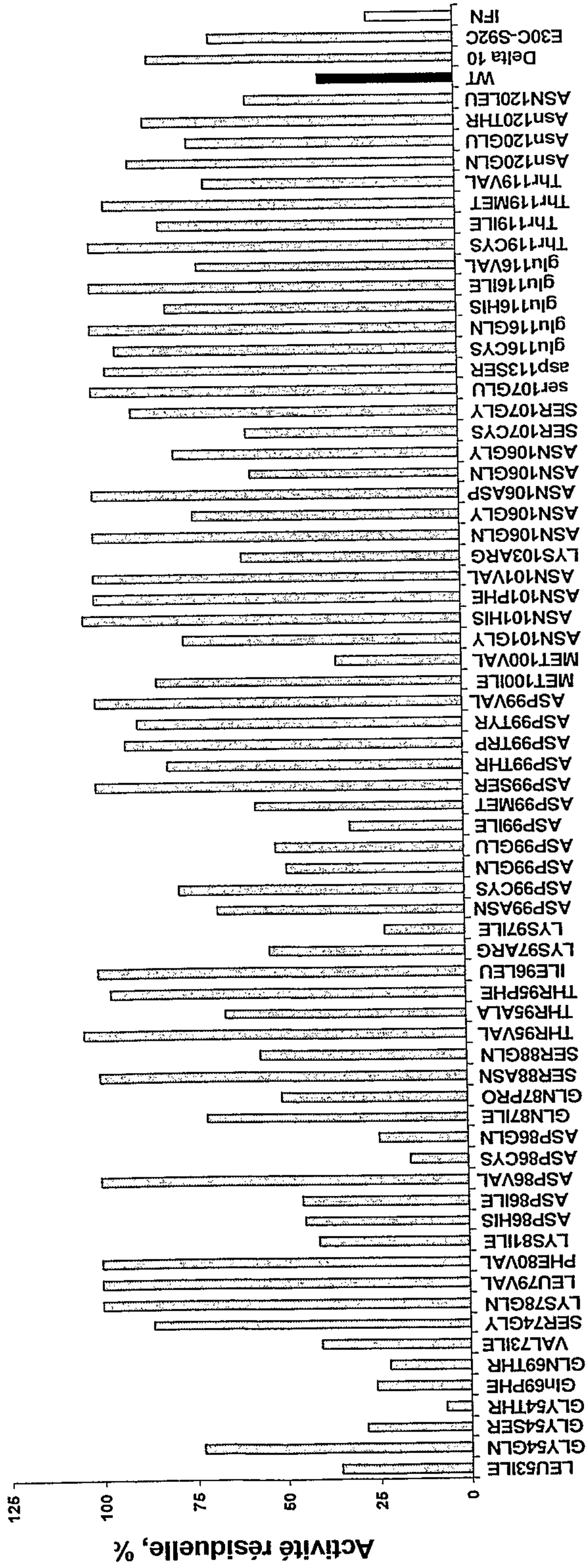
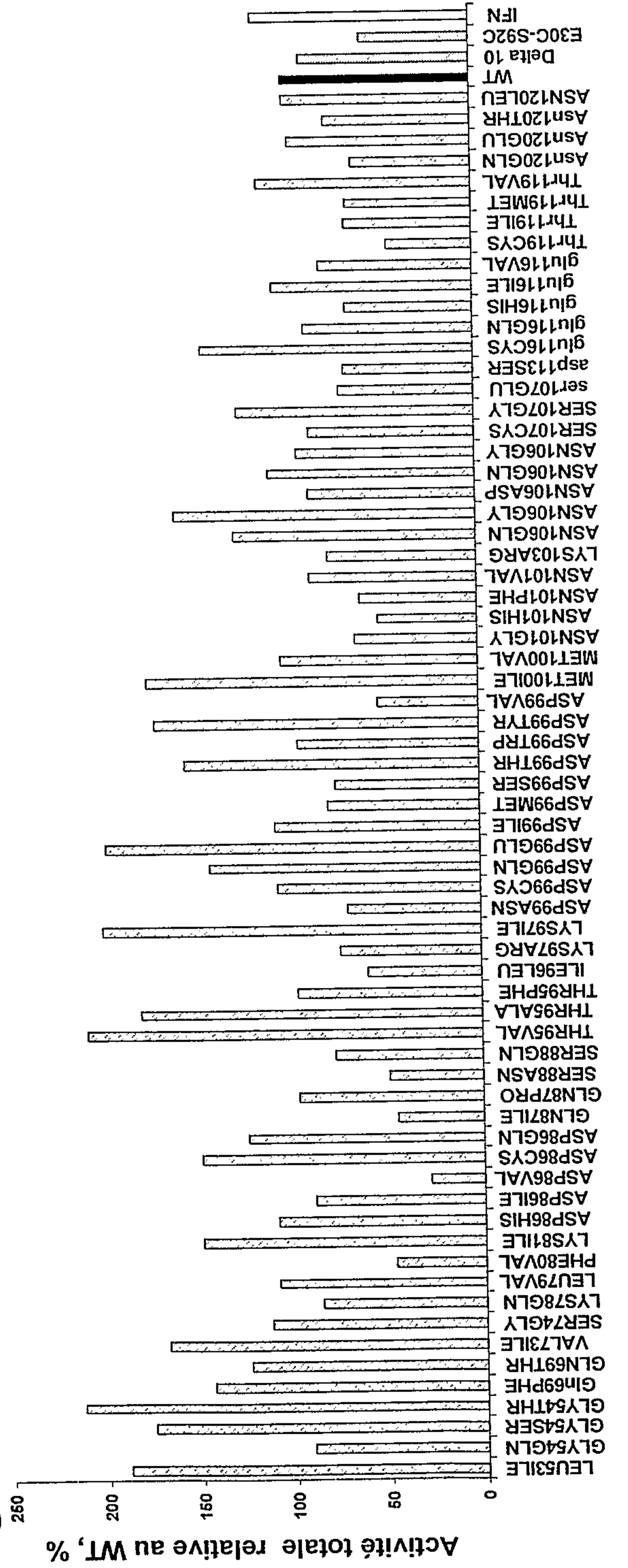


Figure 5B



6/14

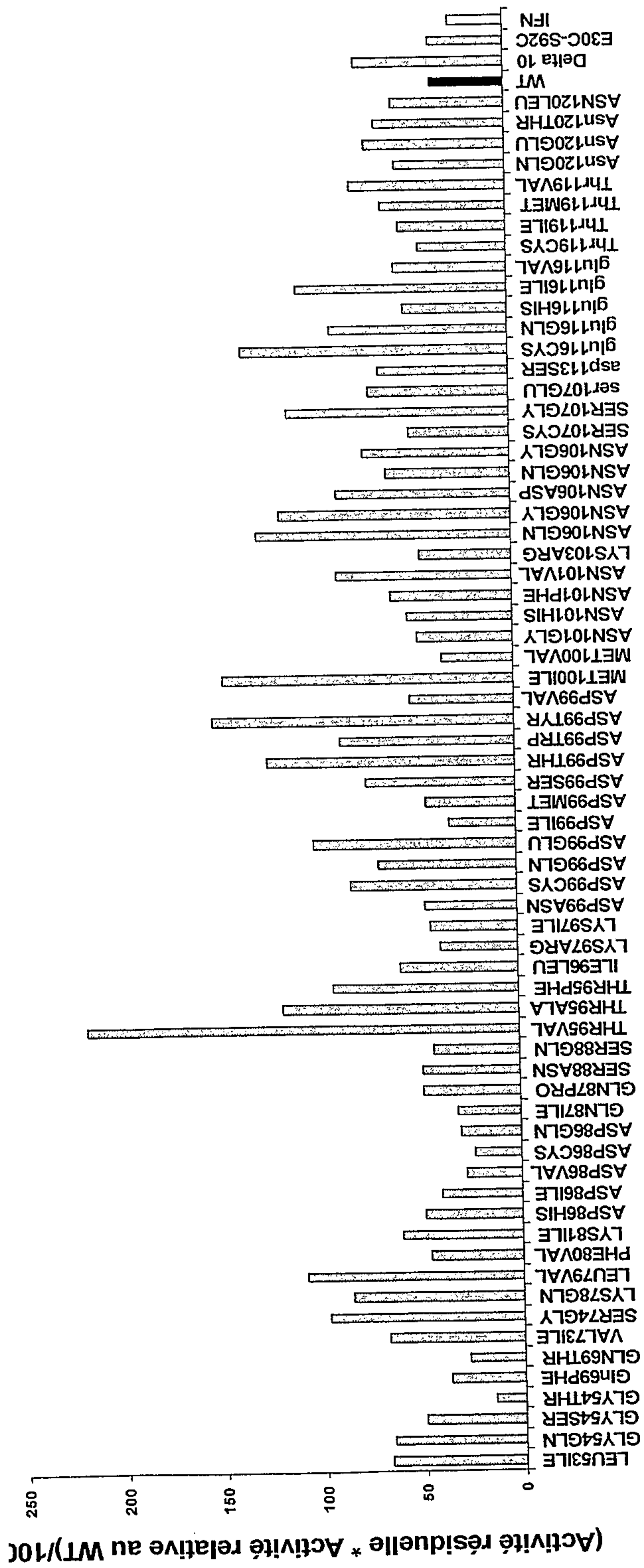


Figure 5C

7/14

Figure 6A

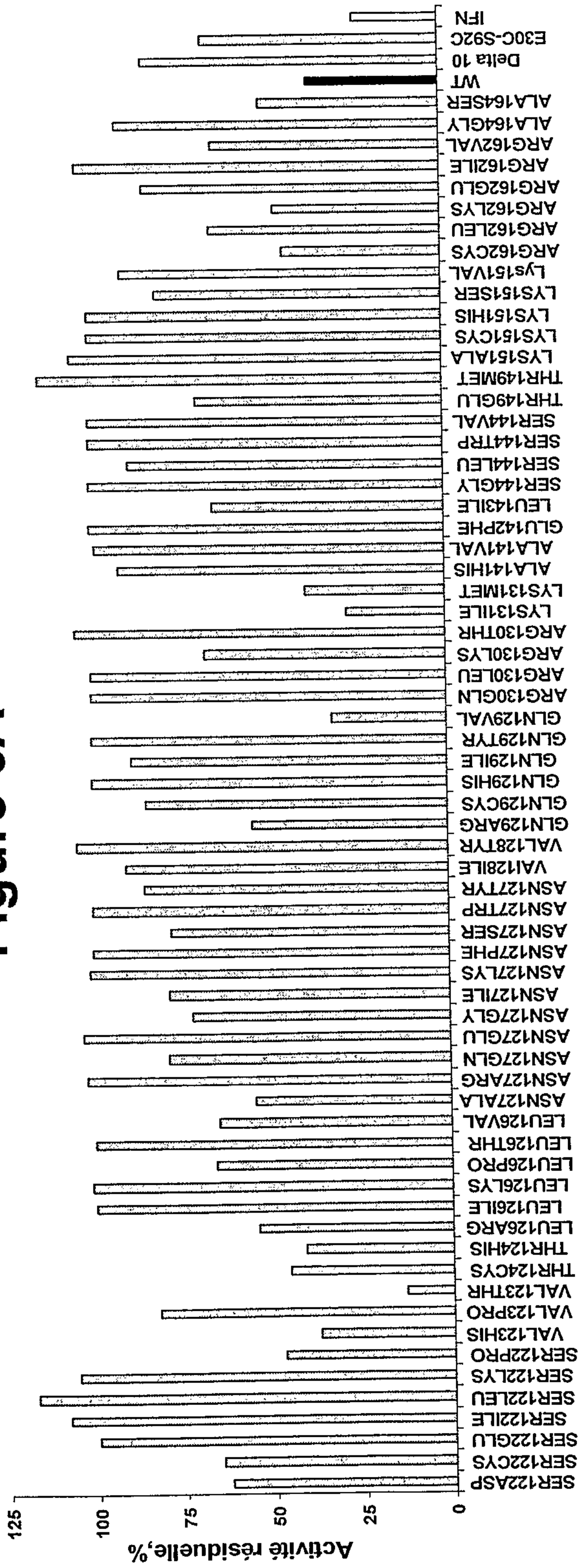
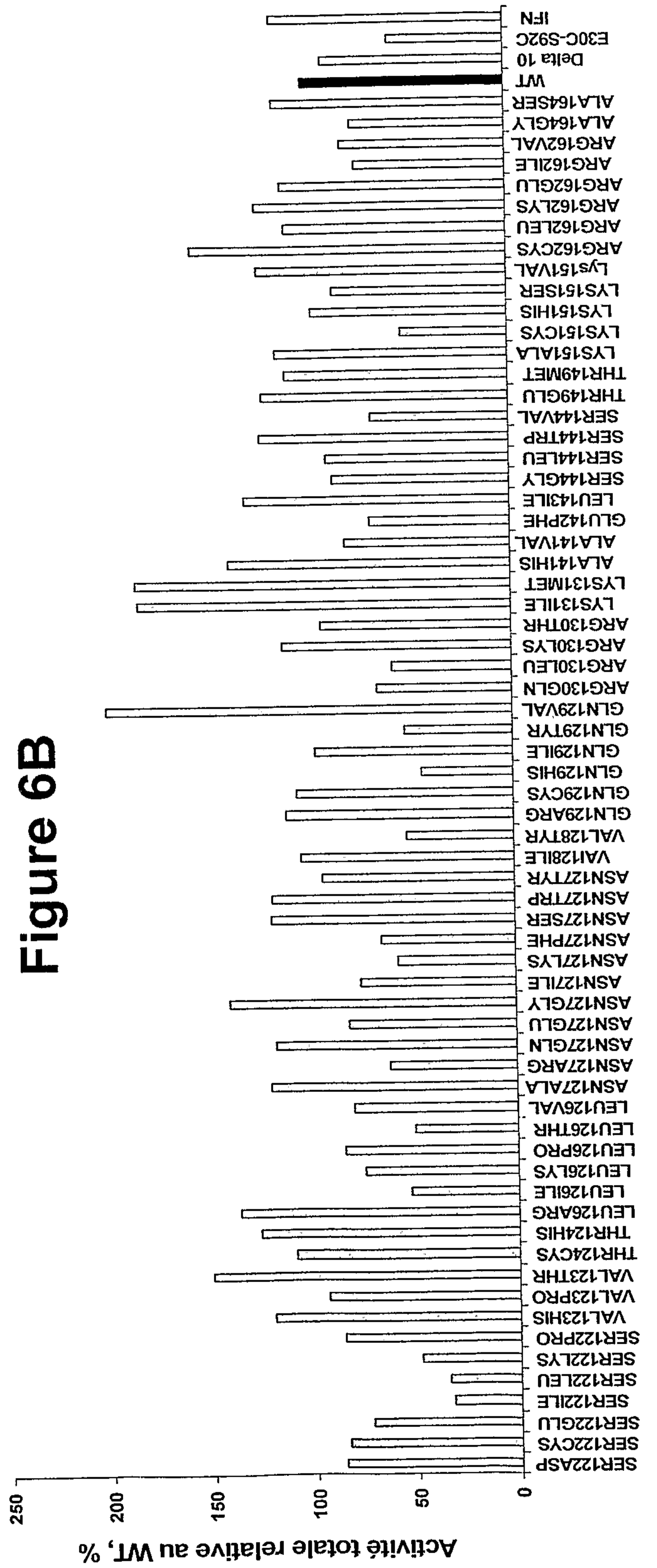


Figure 6B



8/14

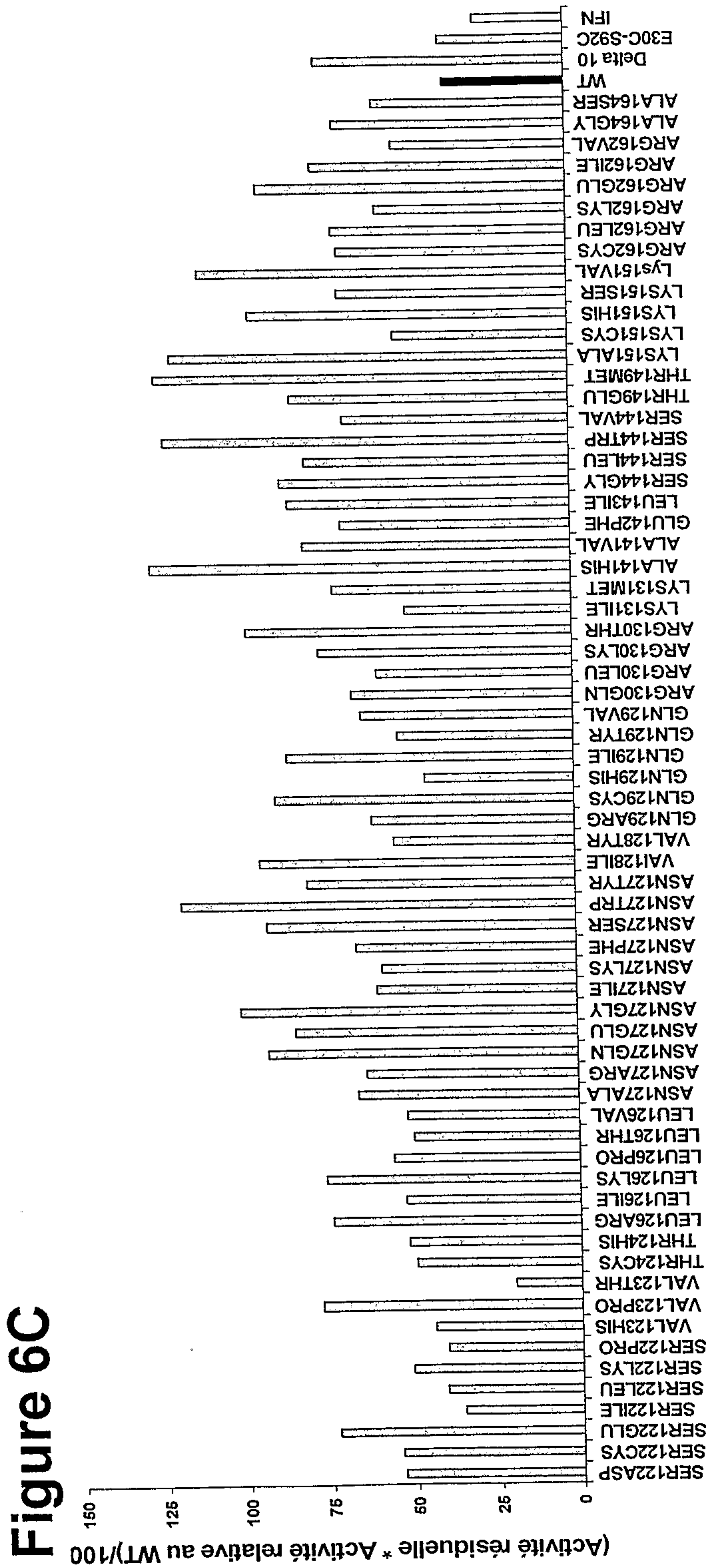


Figure 6C

9/14

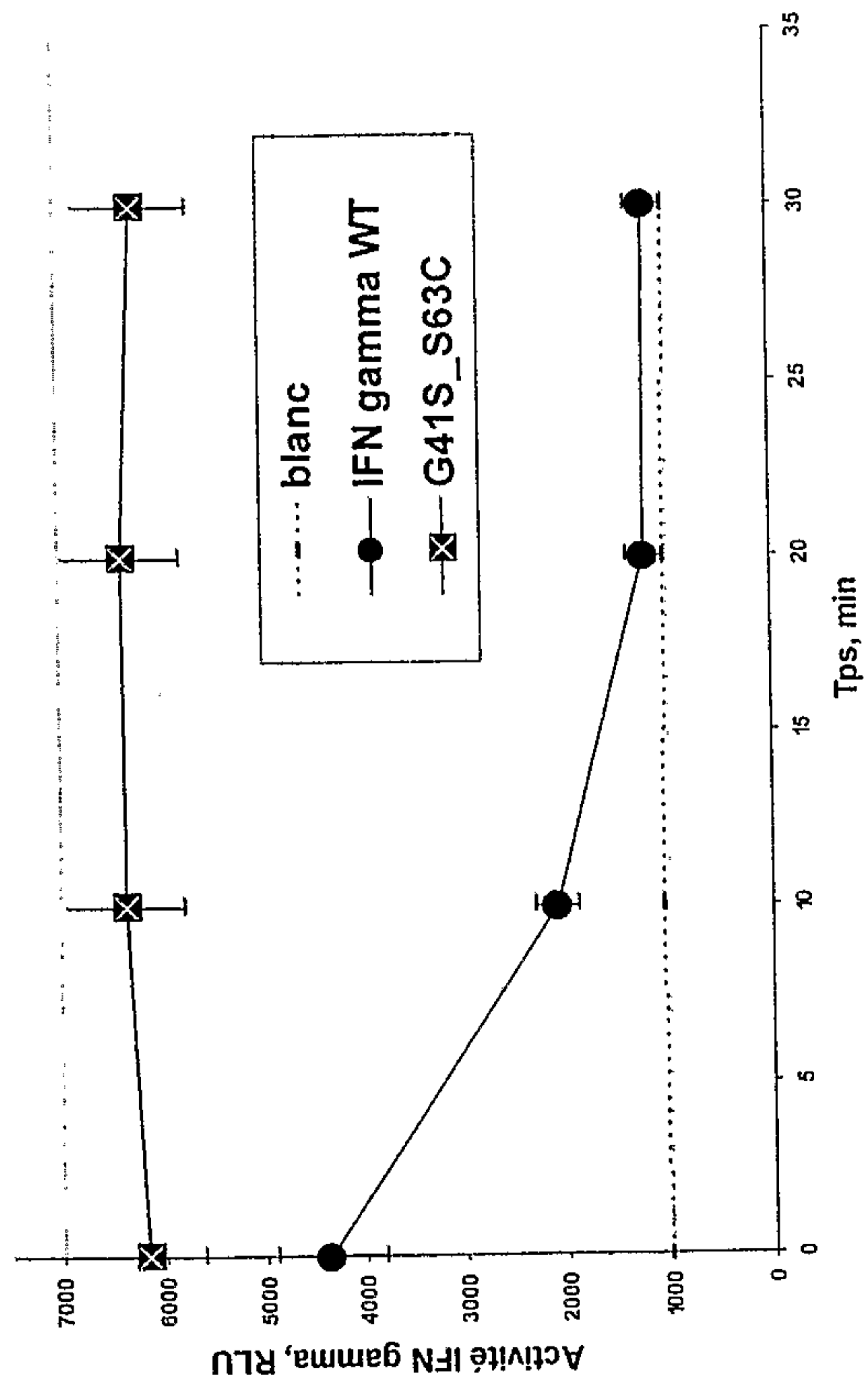
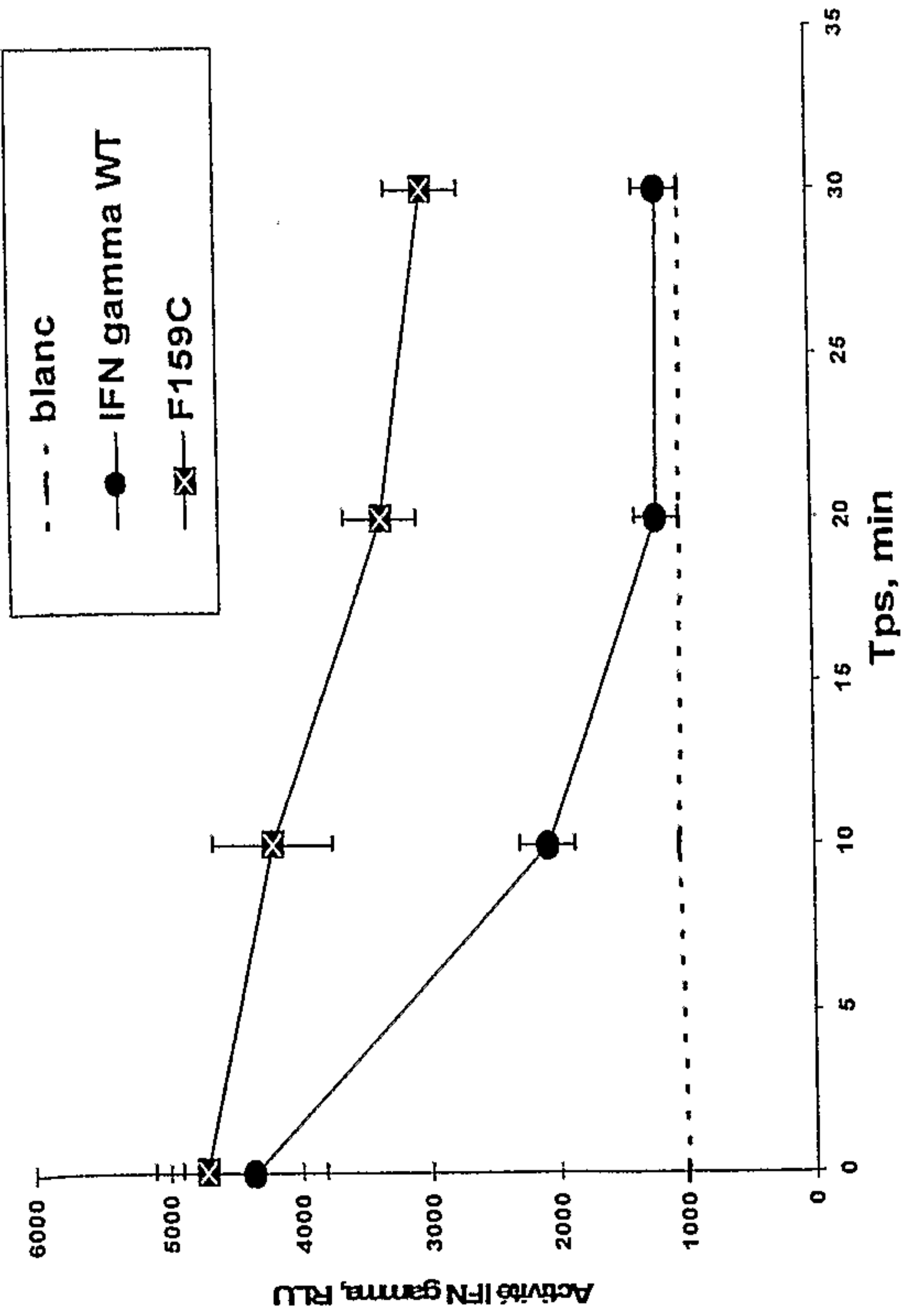
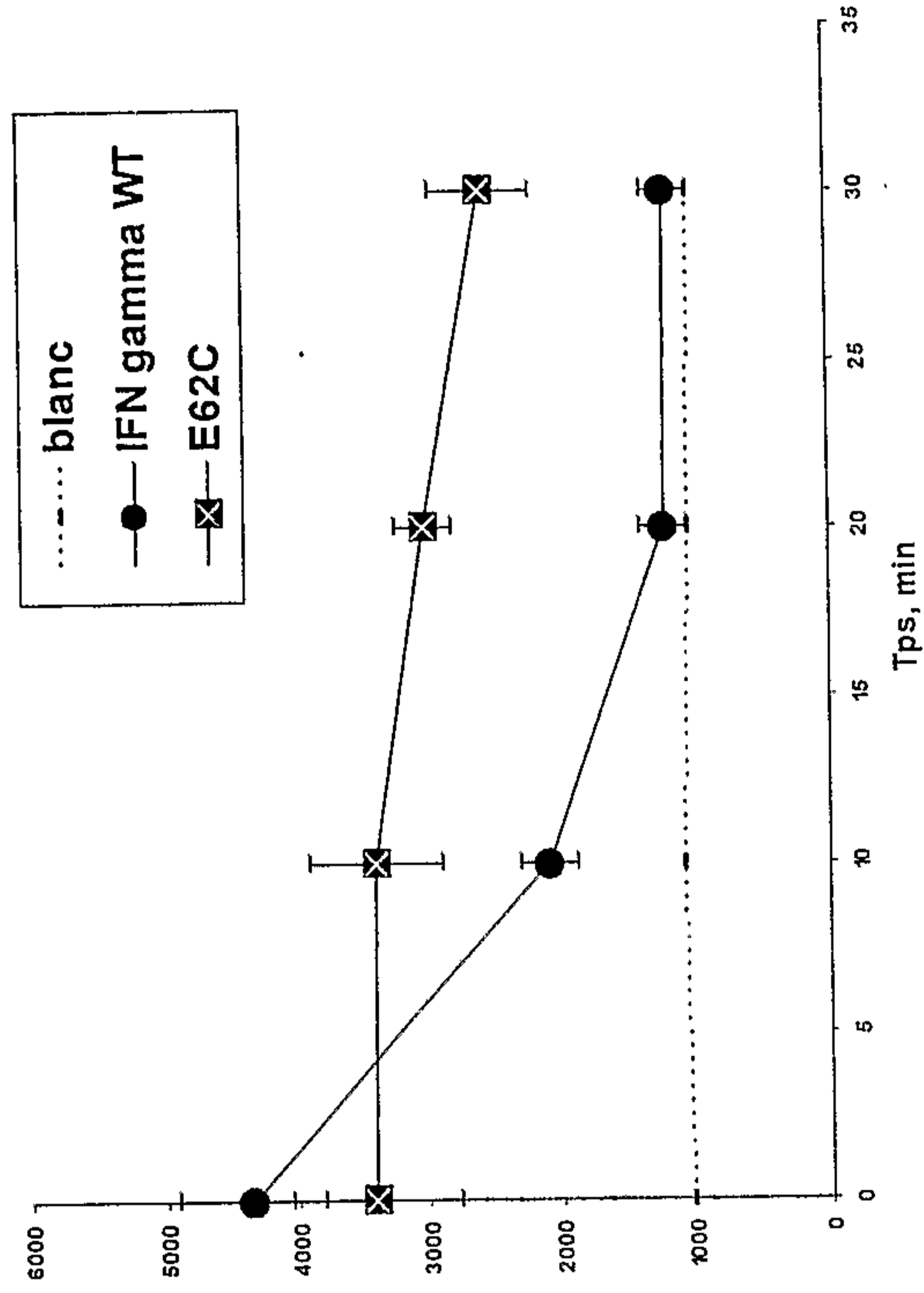
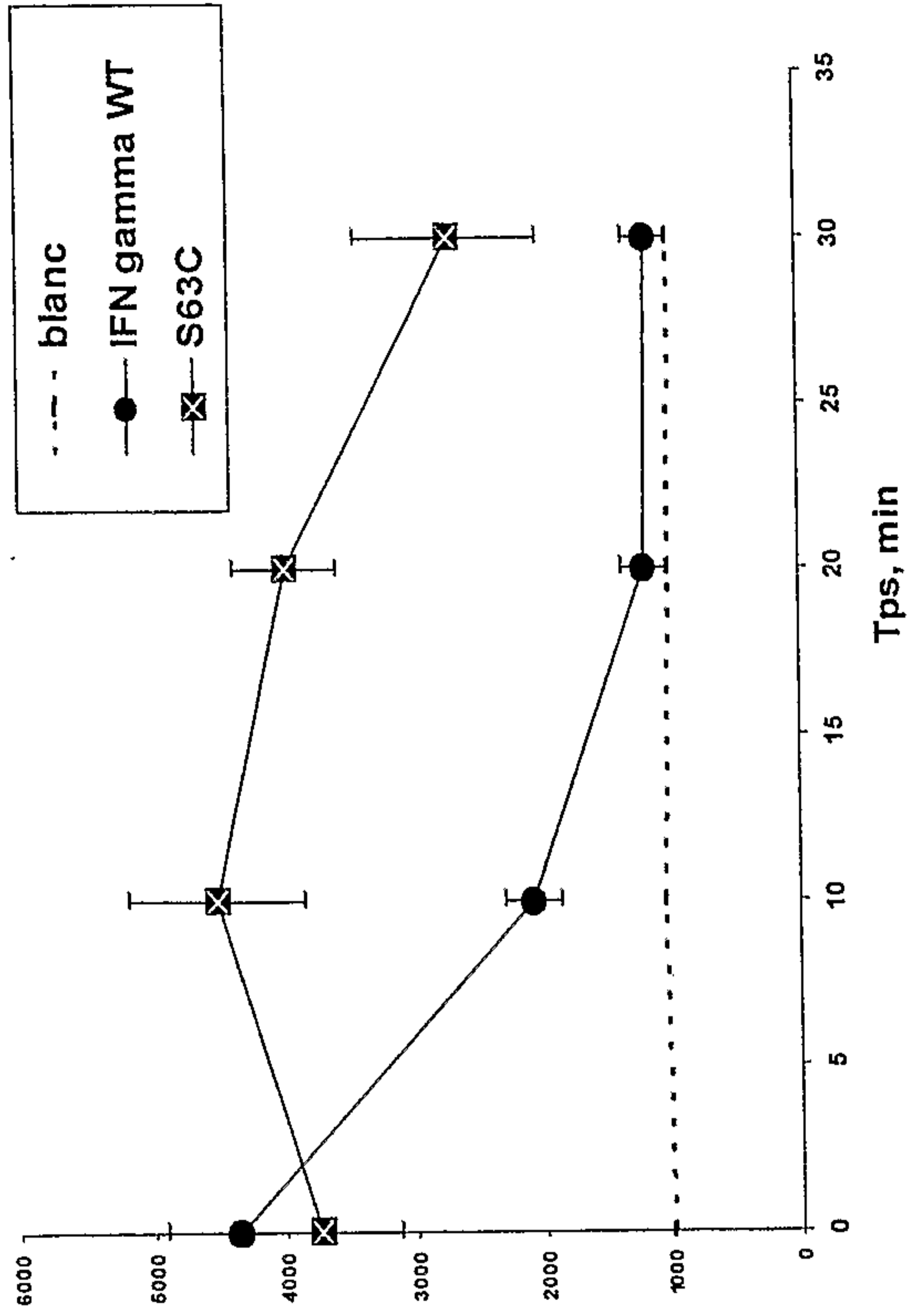


Figure 7

10/14

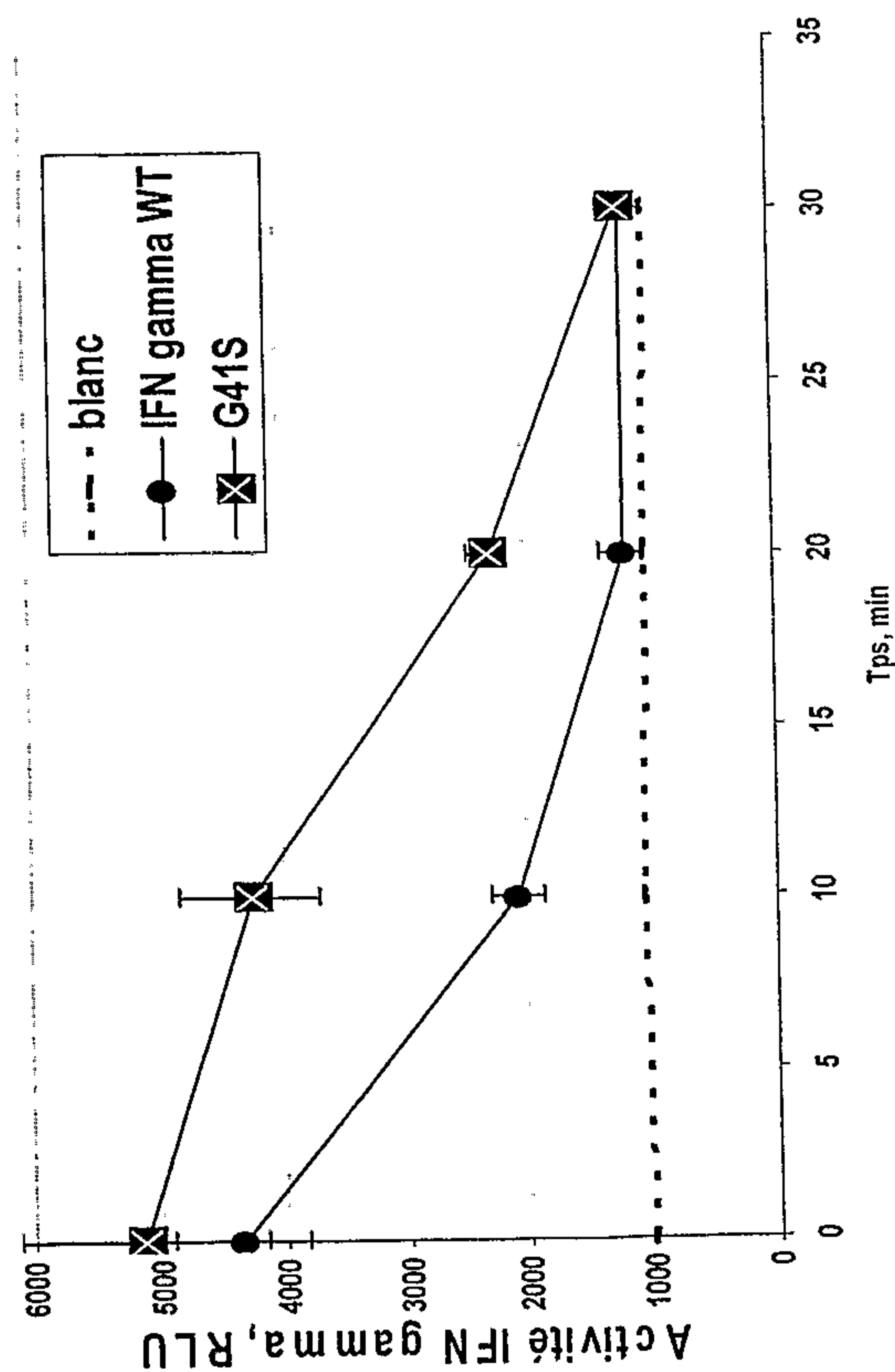
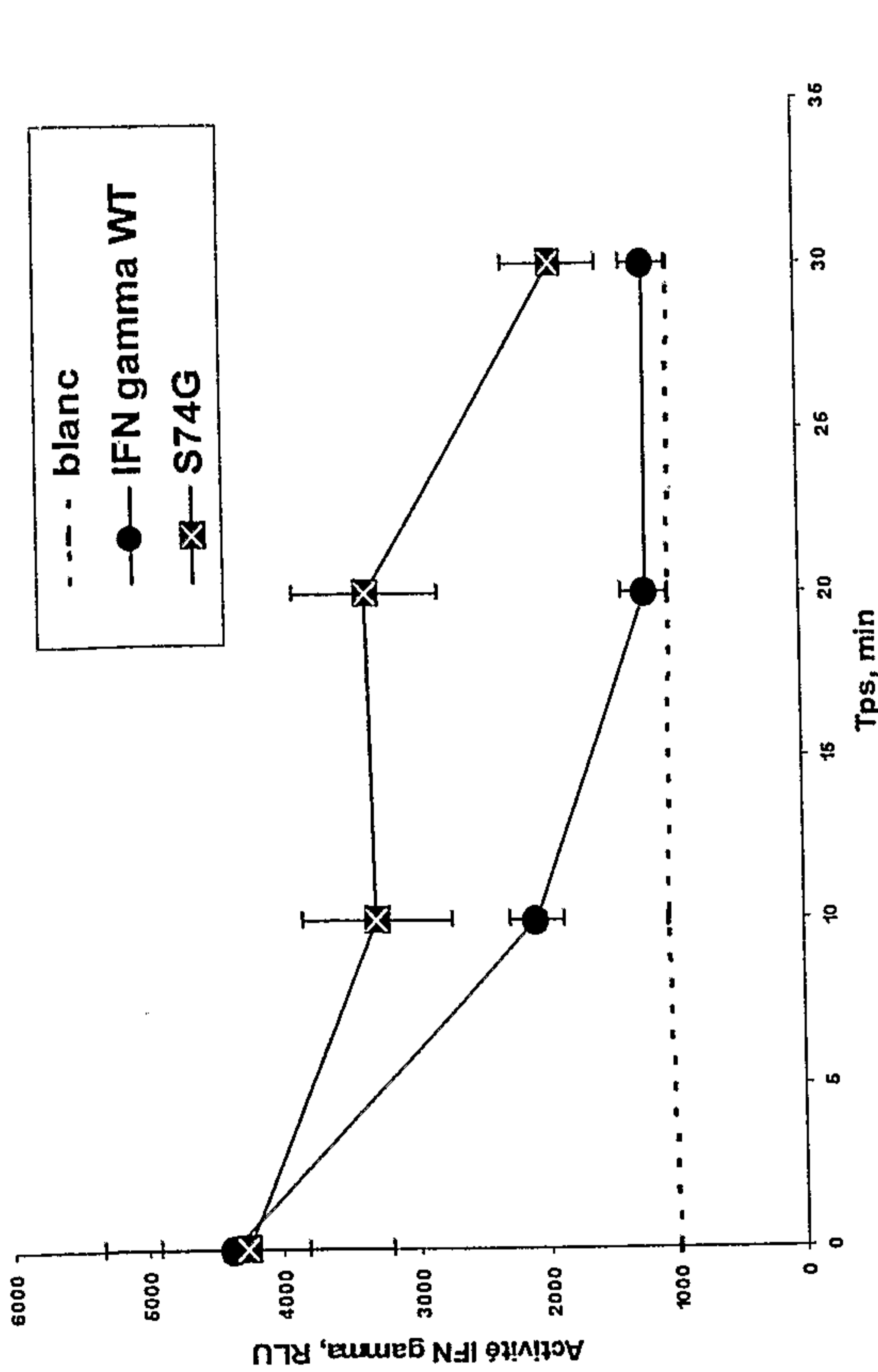
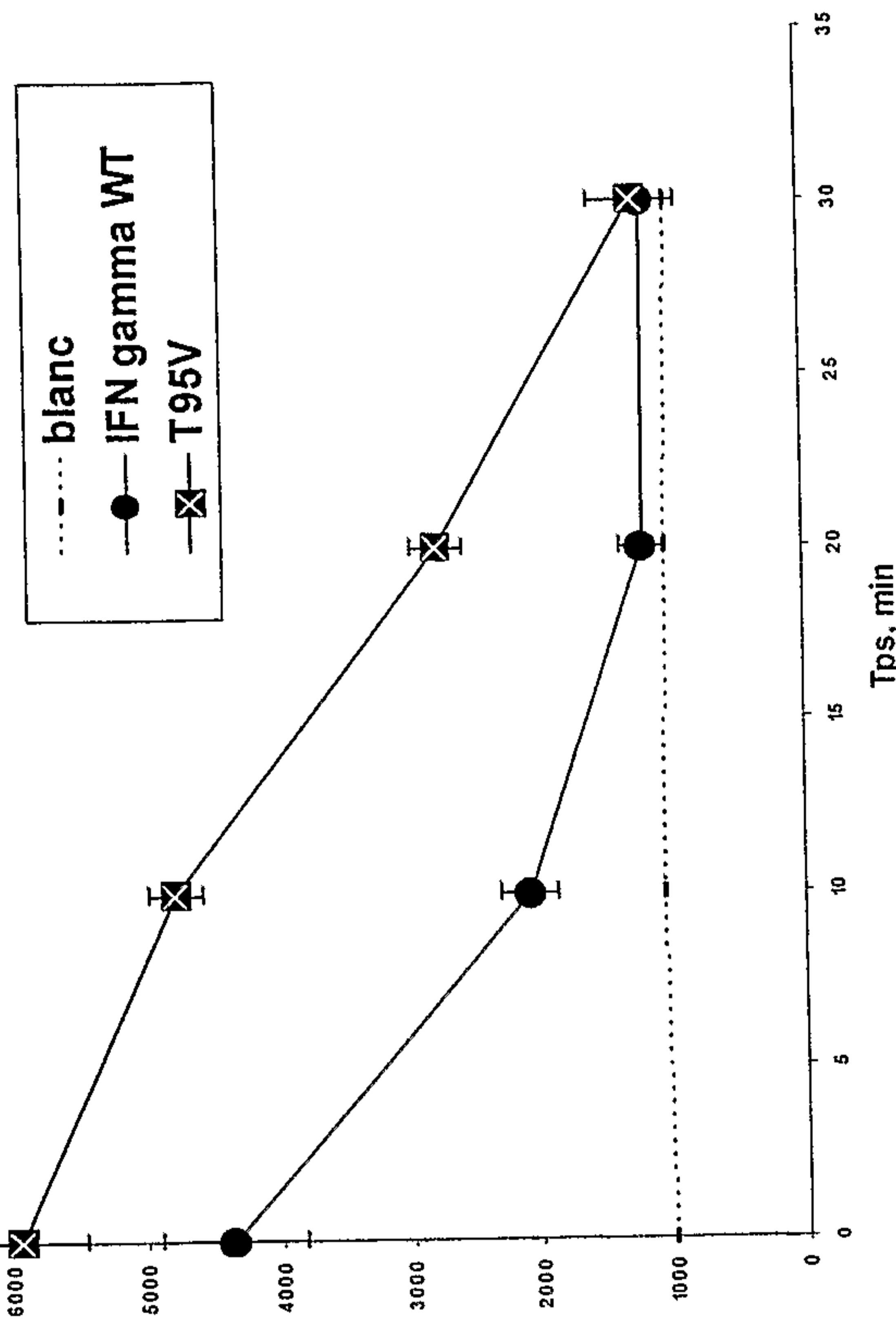
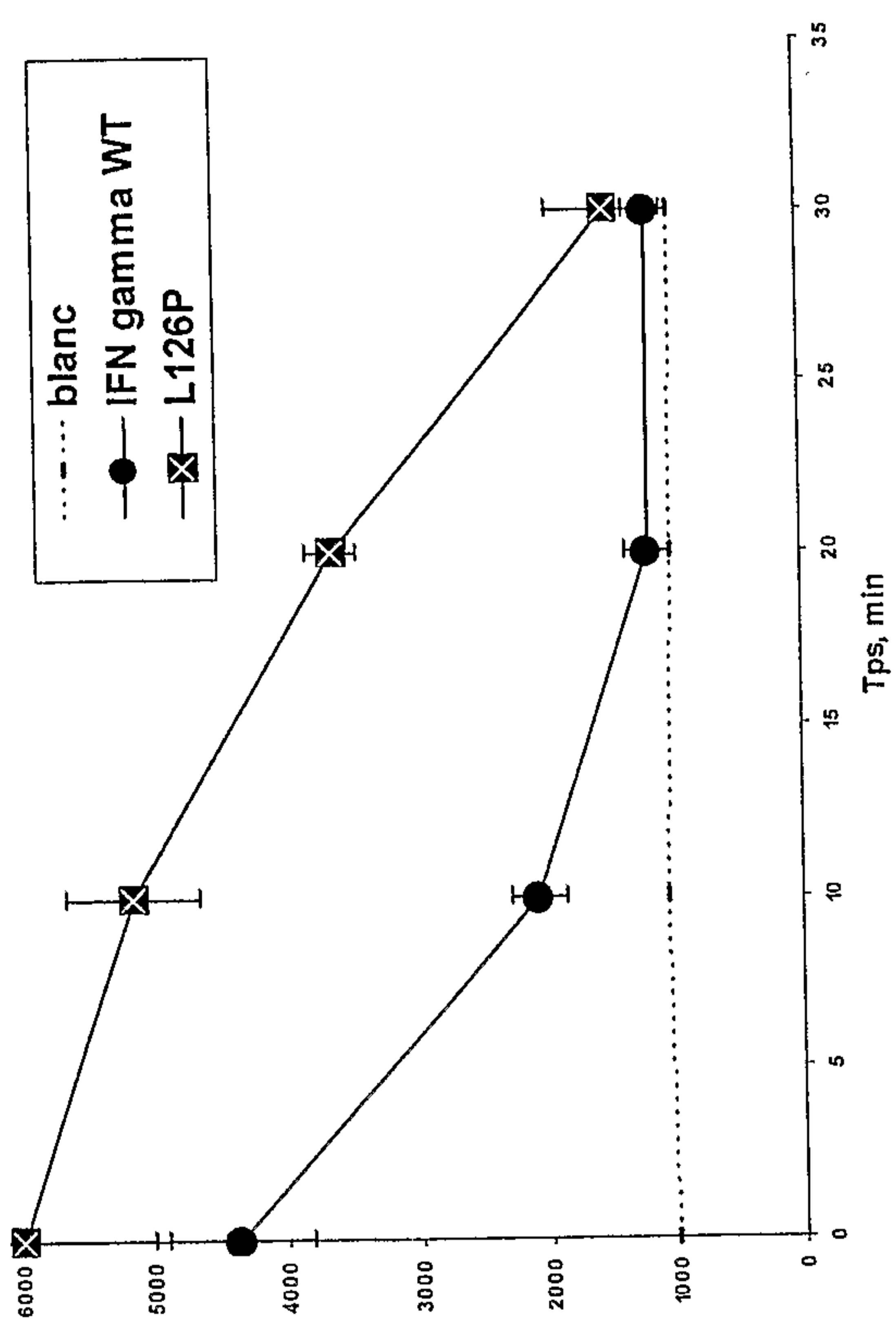


Figure 7 (suite)

11/14

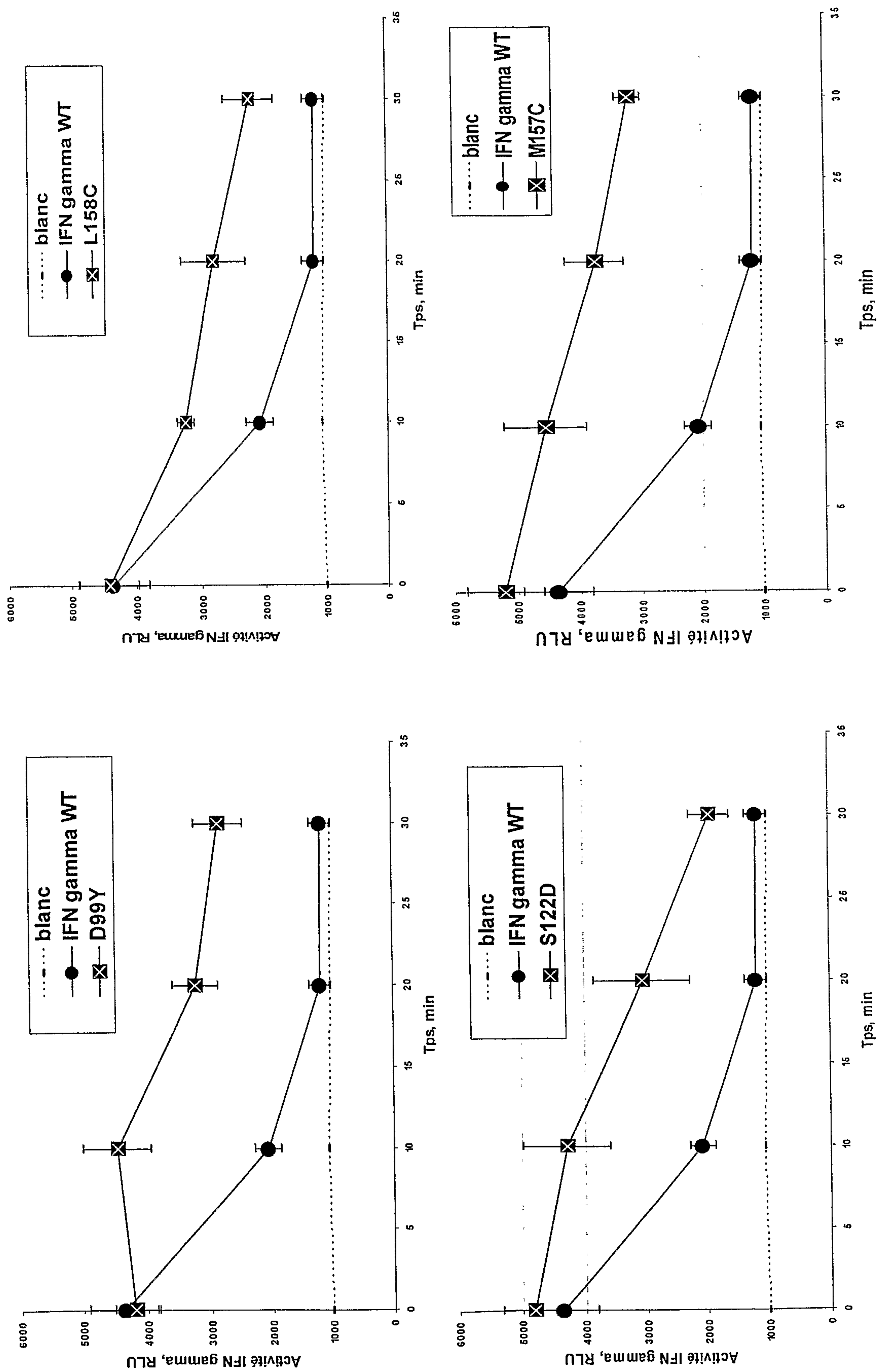


Figure 7 (suite)

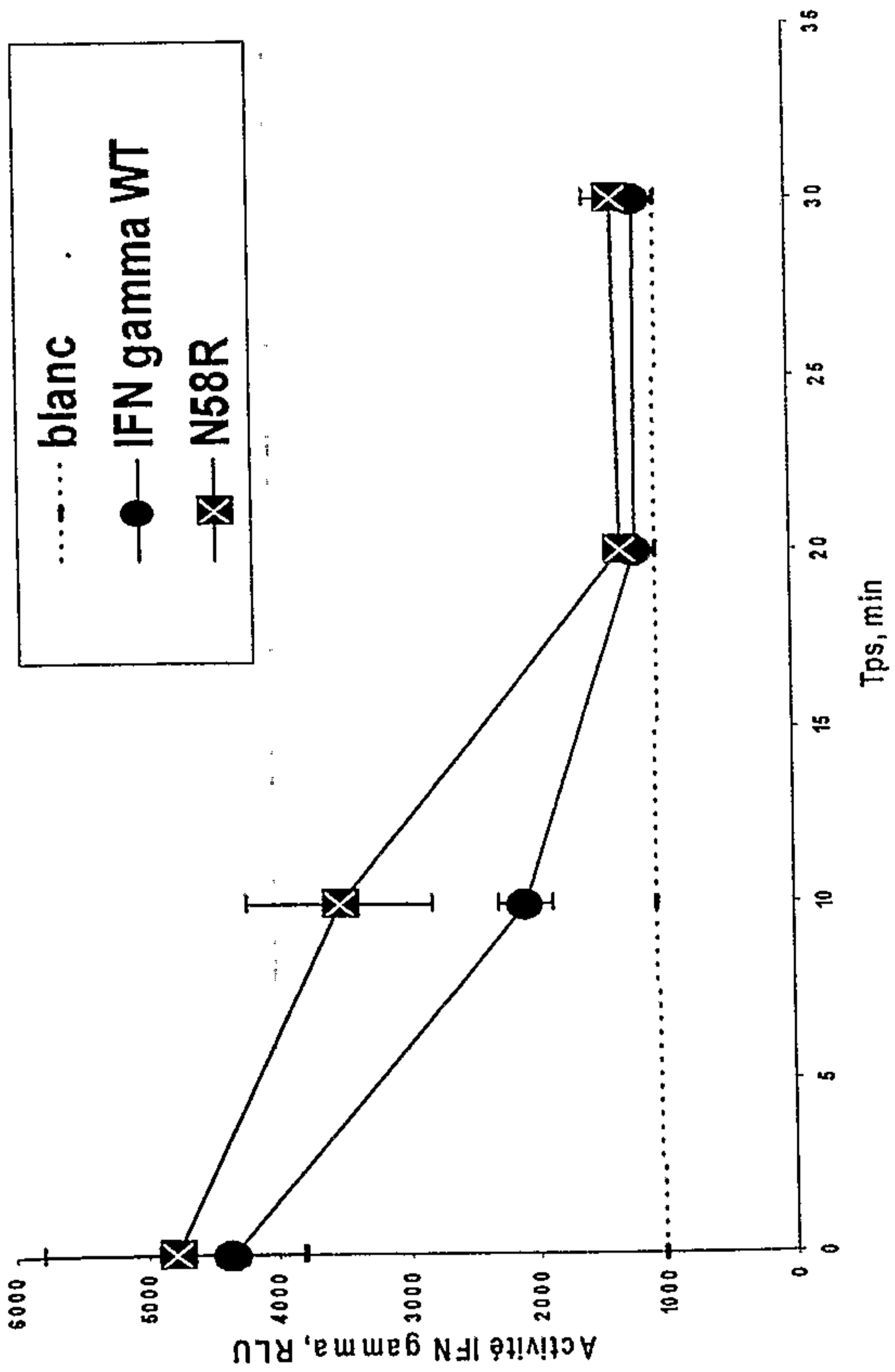
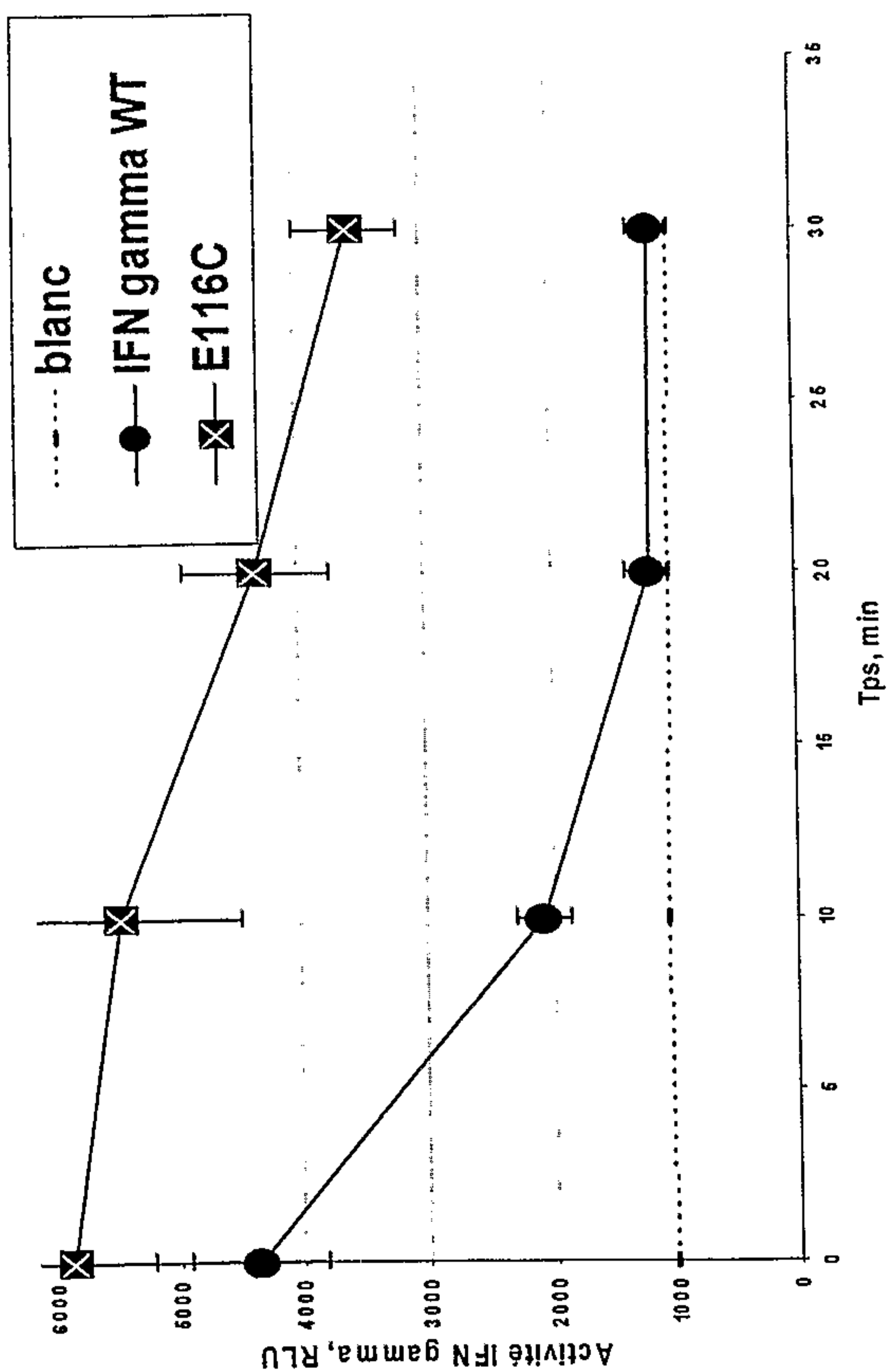
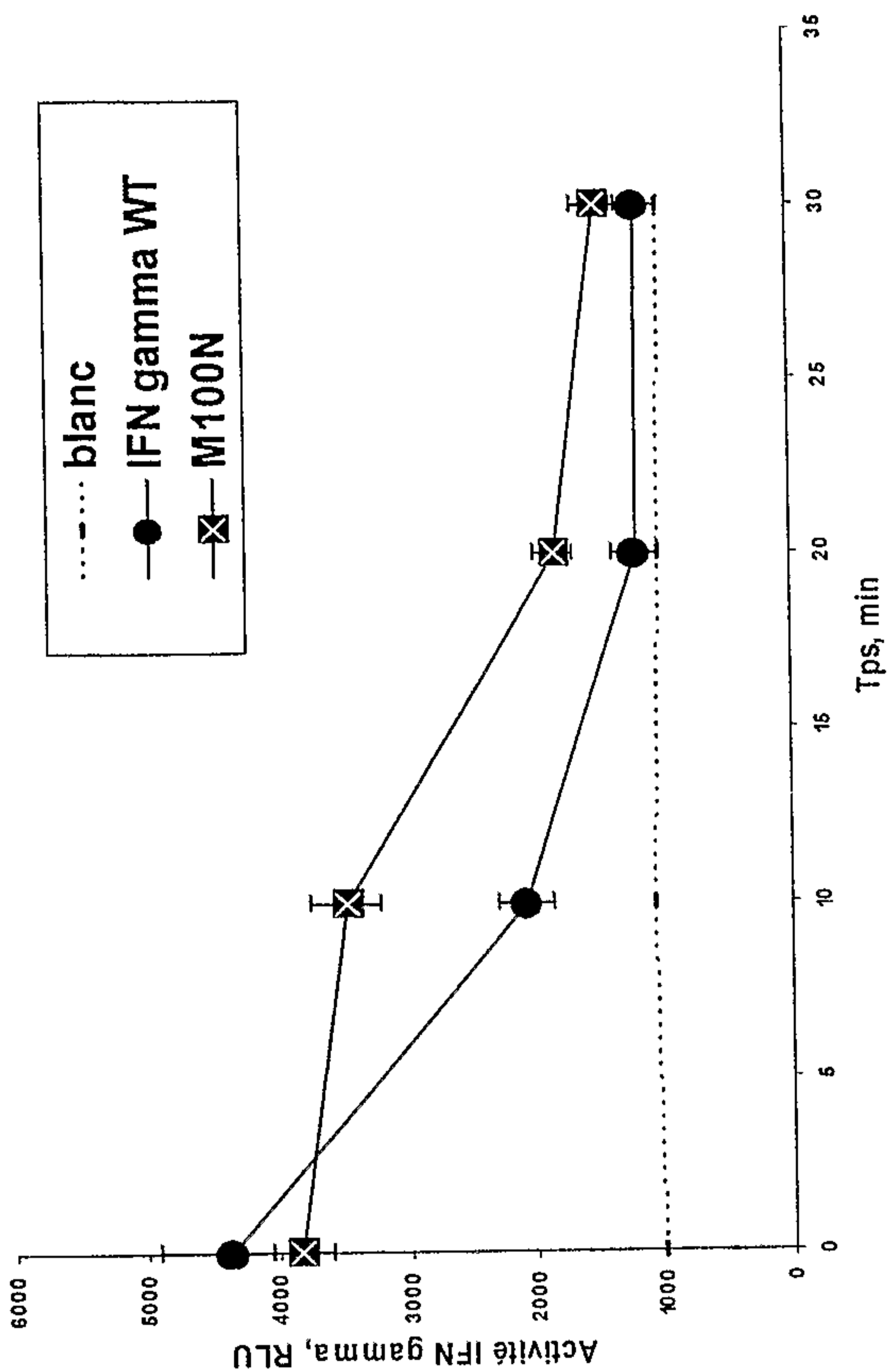
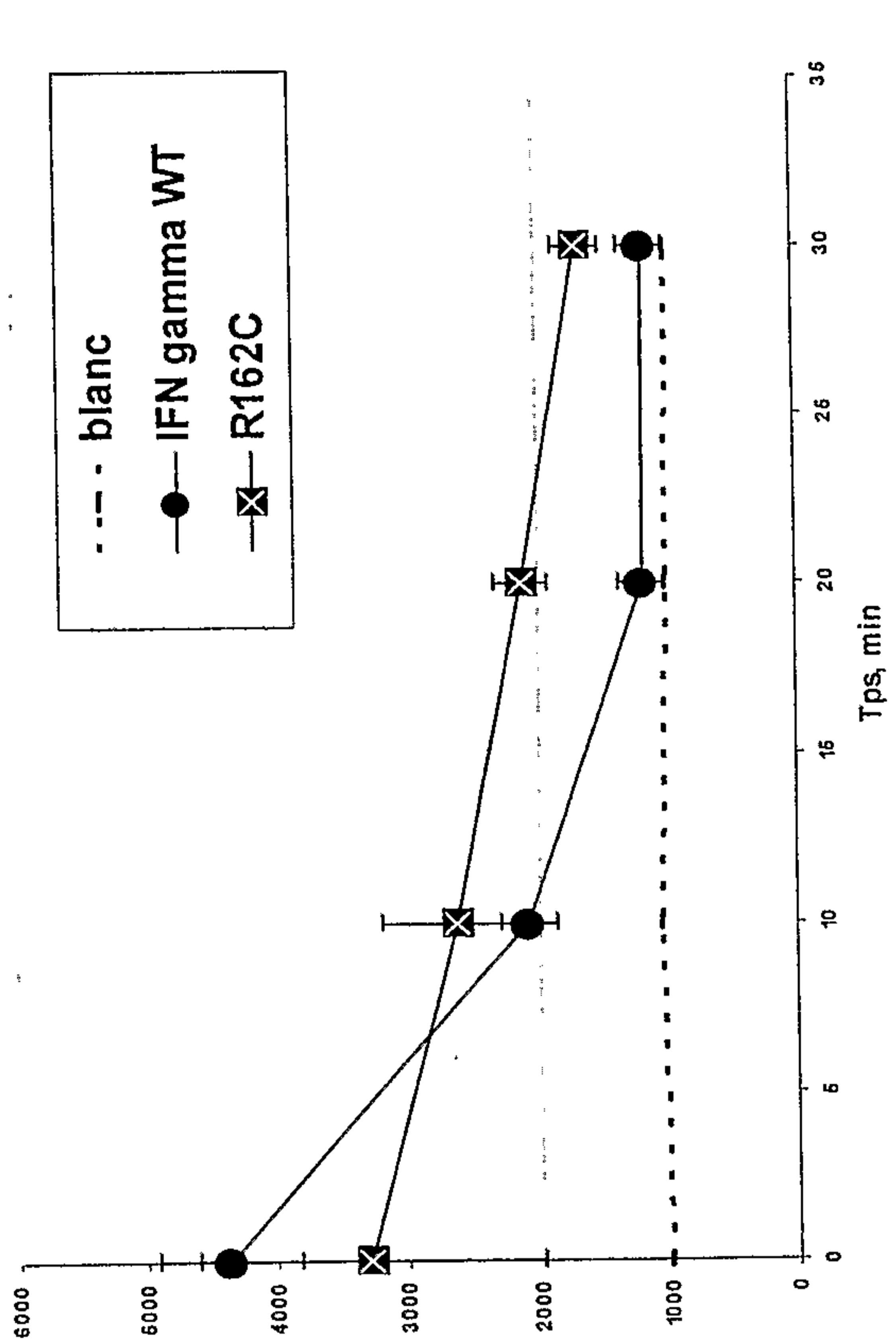


Figure 7 (suite)

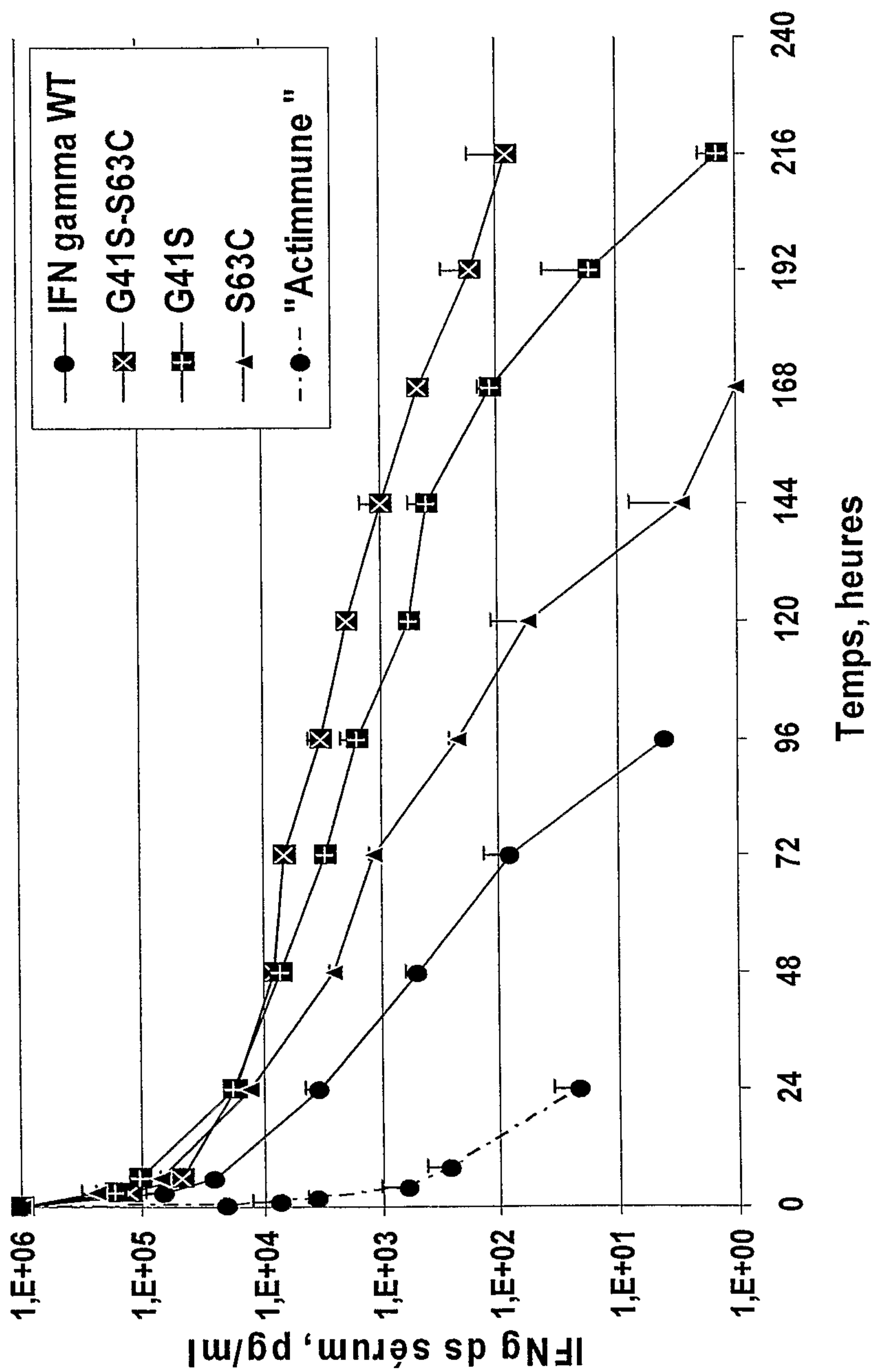


Figure 8

14/14

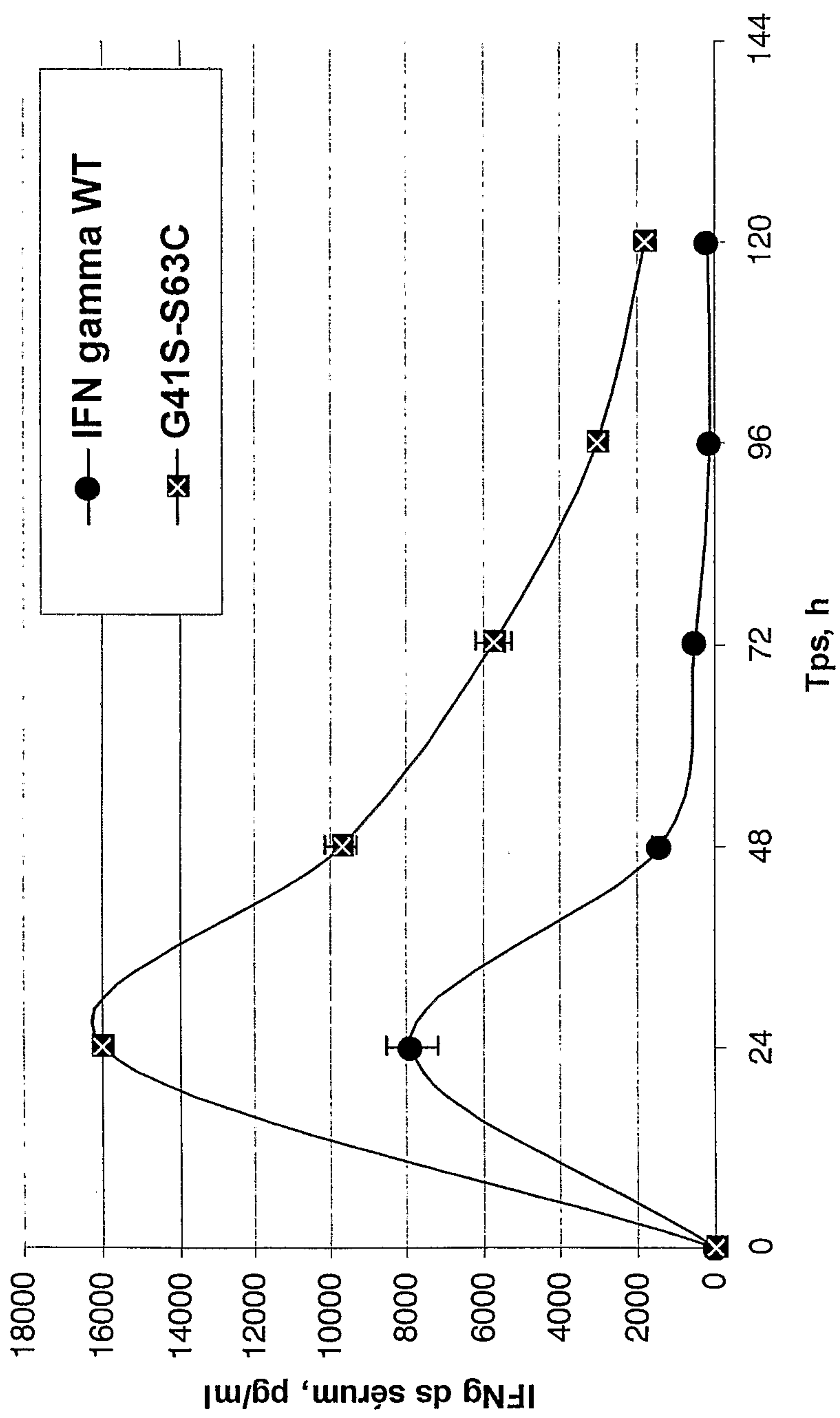


Figure 9