

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 898 359**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **06 02064**

⑤① Int Cl⁸ : C 07 K 14/715 (2006.01), C 12 N 15/23, 15/63, 5/10,
A 61 K 38/21, A 61 P 35/00, 37/02, 31/12

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 08.03.06.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.09.07 Bulletin 07/37.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *BIOMETHODES Société anonyme —
FR.*

⑦② Inventeur(s) : BERENGUER JOSE, DELCOURT
MARC, CHAUTARD HELENE et MENGUY THIERRY.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

⑤④ VARIANTS AMELIORES DE L'INTERFERON-GAMMA HUMAIN (IFN GAMMA).

⑤⑦ La présente invention concerne des variants de l'inter-
féron gamma humain présentant une thermostabilité amé-
liorée, 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.

FR 2 898 359 - A1



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

Introduction

La présente invention relève du domaine de l'amélioration des protéines. Elle porte sur
5 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
10 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
15 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 possèdent six hélices alpha avec une partie compacte constituée des 4 premières hélices alpha les plus N-terminales (hélices alpha A, B, C, et
20 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.
25

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,
30 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

5 - 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
5 cette raison, un traitement efficace avec l'IFN γ implique des injections fréquentes. Dès
1990, et l'utilisation du 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
10 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 :
15 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
20 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 :

25

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
30 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.

5

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
10 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.

15 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-
20 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
25 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
30 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
5	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.).

20

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 .

25

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 que une demi-vie améliorée et/ou une bio-disponibilité améliorée.

30

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 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 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. De préférence, le variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprend 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. Dans un mode de réalisation encore plus préféré, le variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprend au moins une substitution sélectionnée 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.

La présente invention concerne également un variant thermostable de l'IFN γ humain ou
5 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 et S165V. Par le terme « présentant » est entendu que le variant ou le
10 fragment de celui-ci ne comporte que les substitutions indiquées.
15

Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention concerne en particulier 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 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. De préférence, le variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci présente une unique substitution 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, M157L, M157C, L158C, L158I, L158W, F159C, F159V, R160A, R162D, R162Q et R162E.
20
25
30

Dans un mode de réalisation encore plus préféré, le variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci présente une unique substitution 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, M157L, M157C, L158I, F159C, F159V, R160A, R162E, R162Q et R162D.

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 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.

15

La présente invention concerne un acide nucléique codant un variant thermostable de l'IFN γ humain selon la présente invention, 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. Le vecteur peut être sélectionné de préférence parmi un plasmide et un vecteur viral.

20

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. Elle concerne en outre une cellule hôte comprenant un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur codant un variant thermostable de l'IFN γ humain selon la présente invention. Elle concerne l'utilisation d'une telle cellule pour produire un variant thermostable de l'IFN γ humain selon la présente invention. Elle concerne également une méthode de production d'un variant thermostable de l'IFN γ humain 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. La cellule peut être procaryote ou eucaryote.

30

La présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un variant thermostable de l'IFN γ selon la présente invention ou un acide nucléique codant pour celle-ci. Ainsi, elle concerne en outre l'utilisation d'un variant thermostable de l'IFN γ selon la présente invention ou de cette composition pharmaceutique comme médicament. Notamment, la présente invention concerne l'utilisation d'un variant thermostable de l'IFN γ selon la présente invention ou de cette composition pharmaceutique pour la préparation d'un médicament antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur. En particulier, le médicament selon la présente invention 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'ostéoporose, une sclérodémie généralisée, une hépatite chronique à virus B ou C, un choc septique, une dermatite allergique, et l'arthrite rhumatoïde.

15

Brève description des figures

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 : 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

30

produit (activité résiduelle par activité totale relative vis-à-vis de la protéine sauvage /100) (panneau C)

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.

Description détaillée de l'invention

10 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

15 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.

20 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-

25 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.

30

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 4.

- 5 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 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, M157W, M157L, L158W, L158C, L158I, F159C, F159V, R160A, R162D, R162E, R162Q, R163T, R163L, R163G, A164E et S165V ou une combinaison de ceux-ci. La combinaison peut consister en 2, 3
- 10 ou 4 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. De préférence, la présente invention concerne un variant thermostable de l'IFN γ humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une
- 20 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,
- 25 F159V, R160A, R162D, R162Q et R162E ou une combinaison de ceux-ci. 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 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.
- 30

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 et S165V.

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 le groupe consistant en 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. De préférence, 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. De manière encore plus préférée, la substitution est 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.

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 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.

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. Il peut correspondre à la protéine précurseur de 166 acides aminés (SEQ ID Nos 1-2), ou à la protéine mature avec ou sans le tripeptide CYC (SEQ ID Nos 3-6).

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 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. Le fragment peut comprendre 100, 110, 120, 130 ou 140 acides aminés consécutifs de l'IFN γ humain.

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 produit dans les 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

préférés, 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
5 multiplié par le pourcentage d'activité résiduelle.

Le variant de l'IFN γ humain selon la présente invention peut être glycosylé, de préférence aux positions 48 et 120. Par ailleurs, il peut être modifié par ajout de polymères (Kita et al., Drug Des. Deliv. 6:157-167, 1990 ; EP 236987 et US 5,109,120)
10 ou par pégylation (WO99/03887 ; Voir WO2004005341 « Conjugation of a polymer molecule »).

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
15 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,
20 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
30 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 : Lacl, LacZ, pLacT, ptac, pARA, pBAD, les promoteurs

d'ARN polymérase de bactériophage T3 or T7, le promoteur de la polyhédrine, 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
5 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).

10

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
15 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, de mammifère ou de plante. La cellule peut être une cellule mammifère, par exemple COS, CHO (US 4,889,803 ; US 5,047,335). Dans un mode de
20 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
25 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,
30 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.

5 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.

10

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. 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.

5 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*.

10

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 ;
15 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
20 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
25 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 .

30 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.

5 La présente invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant un variant de l'IFN γ thermostable selon la présente invention. 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. La composition pharmaceutique peut comprendre en outre un support ou un excipient
10 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
15 Press[2000]).

La présente invention concerne également l'utilisation d'un variant de l'IFN γ thermostable selon la présente invention comme médicament.

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

25 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,
30 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
5 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
10 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 µg/m² si la surface corporelle est supérieure à 0,5 m² et entre
0,01 et 10 µg/kg de poids corporel si la surface corporelle est inférieure ou égale à 0,5
m².

15

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.

20

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) ;

25

- 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 ;

30

- 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.

5 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.

10 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
15 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
20 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
25 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
30 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

5 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'ostéoporose, une sclérodémie 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

10 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

15 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.

20 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

25 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 rétonoïde, un inhibiteur de lipoxigénase et de cyclo-oxygénase, un acide fumarique et ses sels, un

30 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 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.

5

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.

10

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.

15

20

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.

25

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.

30

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 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.

5 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.

10

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®
15 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
20 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 déposé 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
25 niveau de résistance a été comparé à celui de la construction sauvage. 20 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
30 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

- 20 Système 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 25 146 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).
- 30 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 :

5 - 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).

10 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.

15 *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 .

20 **Sélection de mutants thermostables par la méthode THR**

Une banque de variants de l'IFN γ cloné 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
25 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 isolés par le moyen 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. 20 mutants,
30 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) et les cellules COS-7 (African green monkey SV40 transformed kidney cells) ont été cultivées dans des conditions standards de culture (37°C en atmosphère humide contenant 5% CO₂) en utilisant respectivement
5 les milieux Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) et Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM). Tous ces milieux de culture contiennent un analogue de la L-glutamine (le glutamax) et sont supplémentés en sérum de veau fœtal décomplémenté (10% final) et en antibiotiques à raison de 100 units/ml de pénicilline et
10 0.1 mg/ml de streptomycine. Le vecteur pSV-betaGalTM (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 uniques 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
15 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 adhérees 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
20 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 (500 μ L IMDM + SVF + antibiotiques) a été changé. Les surnageants contenant l'IFN γ (avec un niveau d'expression de l'ordre de 0,5 à 1 μ g/ml) ont été récupérés à T=24H post-transfection.
25 Ils ont été aliquotés et conservés à -20°C avant le dosage de l'activité de l'IFN γ .

Test primaire 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
30 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
5 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, 20µL du mélange ADN/Jet PEI ont
10 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.

*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. 10µL
15 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. 50µL de Glo lysis buffer
TM (Promega), ont été ajoutés pour lyser les cellules. La lyse s'est effectuée pendant
20 10 min sous agitation à température ambiante de façon à libérer la luciférase produite en
réponse à la stimulation spécifique de l'IFN γ . Le test de l'activité luciférase à
proprement dit a été initialisé 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). Le calcul de l'activité totale (par rapport à la protéine sauvage) de
25 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
30 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/ 100^{ème} 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 transfections 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 prétraitement). 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 de près de 76 pour le variant delta 10 connu dans la bibliographie.

Revendications

- 1- Variant thermostable de l'interféron gamma (IFN γ) humain ou un fragment
 5 fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution sélectionnée parmi le
 groupe consistant en F159C, R162E, A147E, 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,
 10 Y121T, S122H, S122P, K131I, E135V, M140P, A146K, A146M, A147R, A147G,
 A147F, A147L, A147M, A147P, A147S, M157Q, M157W, M157L, L158W, L158C,
 L158I, F159V, R160A, R162D, R162Q, R163T, R163L, R163G, A164E et S165V, les
 positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2.
- 15 2- Variant thermostable de l'IFN γ selon la revendication 1, dans lequel le variant
 présente une unique substitution.
- 3- Variant thermostable de l'IFN γ selon la revendication 1, dans lequel le variant
 présente une combinaison de substitutions sélectionnée parmi le groupe consistant en
 20 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, les positions indiquées
 correspondant à celles de la SEQ ID No 2.
- 25 4- Variant thermostable de l'interféron gamma (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,
 30 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 et S165V, les positions indiquées correspondant à celles de la SEQ ID No 2.

5 5- Acide nucléique codant un variant thermostable de l'IFN γ selon l'une quelconque des revendications 1-4.

6- Cassette d'expression d'un acide nucléique selon la revendication 5.

10 7- Vecteur comprenant un acide nucléique selon la revendication 5 ou une cassette d'expression selon la revendication 6.

8- Cellule hôte comprenant un acide nucléique selon la revendication 5, une cassette d'expression selon la revendication 6 ou un vecteur selon la revendication 7.

15 9- Composition pharmaceutique comprenant un variant thermostable de l'IFN γ selon l'une quelconque des revendications 1-4.

20 10- Composition pharmaceutique selon la revendication 9, comprenant en outre au moins un composant sélectionné parmi le groupe constitué par un anticorps, un agent de chimiothérapie, un glucocorticoïde, un agent anti-histaminique, une hormone adrénocorticale, un agent anti-allergique, une cytokine, un vaccin,

25 11- Variant thermostable de l'IFN γ selon l'une quelconque des revendications 1-4 ou composition pharmaceutique selon la revendication 9 en tant que médicament.

12- Utilisation d'un variant thermostable de l'IFN γ selon l'une quelconque des revendications 1-4 ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 9 pour la préparation d'un médicament antiviral, antiprolifératif ou immunomodulateur.

30 13- Utilisation selon la revendication 12, 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'ostéoporose, une sclérodermie généralisée, une hépatite chronique à virus B ou C, un choc septique, une dermatite allergique, et l'arthrite rhumatoïde.

14- Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 5, une cassette d'expression
5 selon la revendication 6, un vecteur selon la revendication 7 ou d'une cellule selon la revendication 8 pour produire un variant thermostable de l'IFN γ selon l'une quelconque des revendications 1-4.

1/5

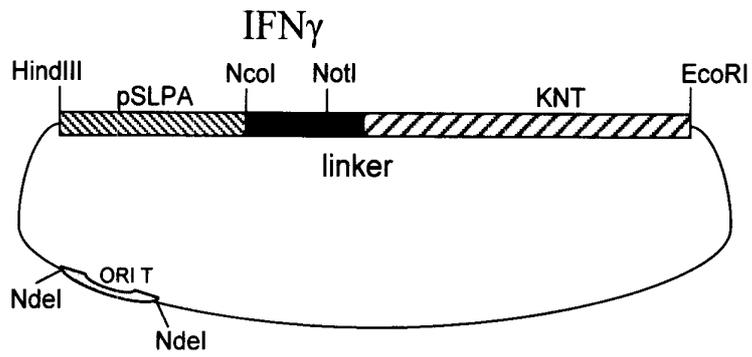
Nom	position des mutations (aa)
1	147: GCT→GAA (Ala→Glu) 162: CGA→GAC (Arg→Asp)
2	162: CGA→GAA (Arg→Glu)
4	163: AGA→ACC (Arg→Thr)
5	21: TGT→GGC (Cys→Gly) 159: TTT→TGC (Phe→Cys)
8	100: ATG→AAC (Met→Asn) 119: ACT→TAC (Thr→Tyr)
9	24: CAG→GCG (Gln→Ala)
10	22: TAC→GAC (Tyr→Asp) 122: TCG→CAC (Ser→His)
12	25: 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→CAG) 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

2/5

pNCK - IFN γ **Figure 1**

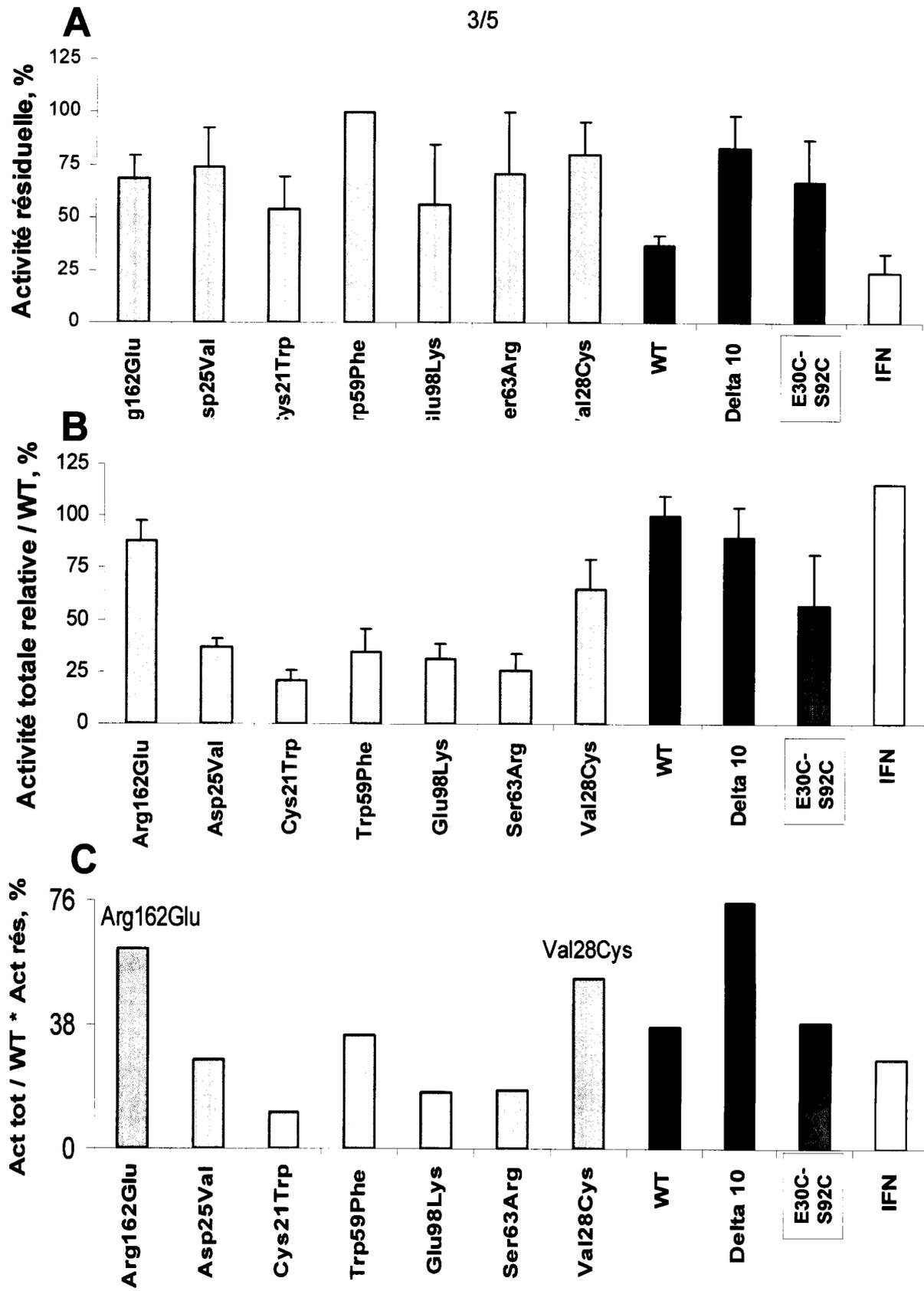


Figure 2

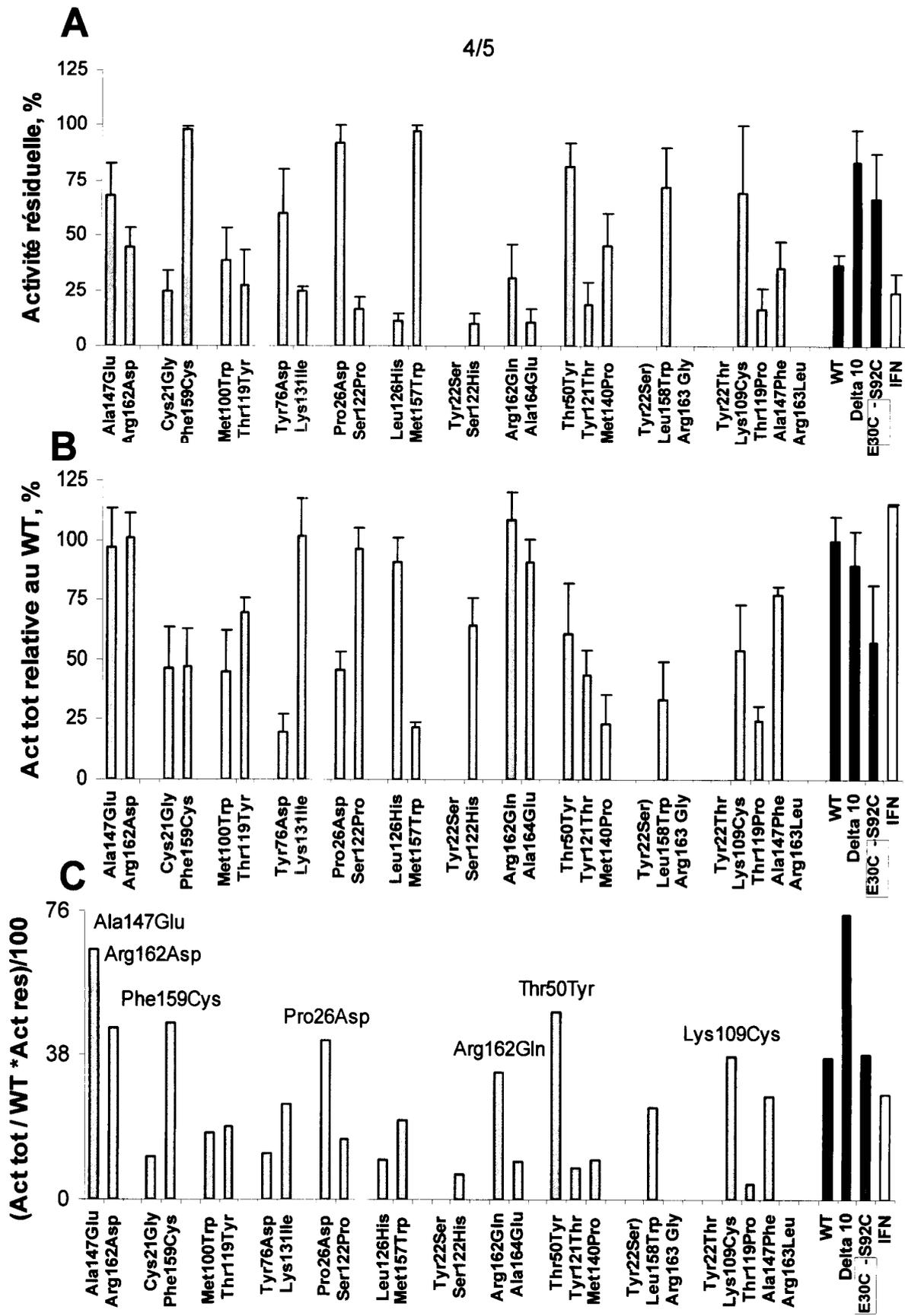


Figure 3

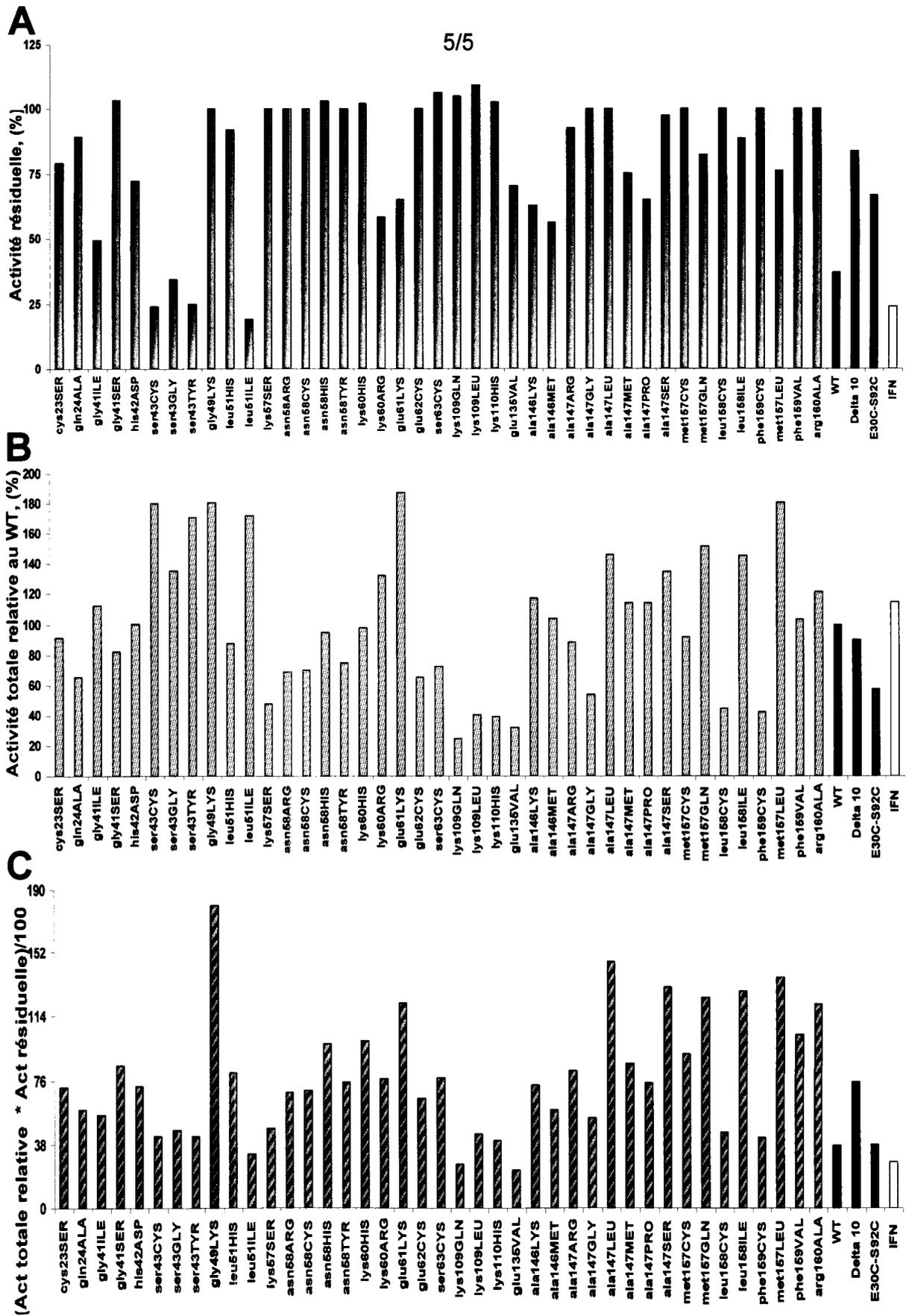


Figure 4

SEQUENCE LISTING

<110> BIOMETHODES

<120> VARIANTS AMELIORES DE L'INTERFERON- GAMMA HUMAIN (IFNg)

<130> B0453FR

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 501

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(501)

<223>

<400> 1

atg	aaa	tat	aca	agt	tat	atc	ttg	gct	ttt	cag	ctc	tgc	atc	gtt	ttg	48
Met	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ile	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Cys	Ile	Val	Leu	
1				5					10					15		

ggt	tct	ctt	ggc	tgt	tac	tgc	cag	gac	cca	tat	gta	aaa	gaa	gca	gaa	96
Gly	Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr	Cys	Gln	Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Glu	Ala	Glu	
			20					25					30			

aac	ctt	aag	aaa	tat	ttt	aat	gca	ggt	cat	tca	gat	gta	gcg	gat	aat	144
Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asn	Ala	Gly	His	Ser	Asp	Val	Ala	Asp	Asn	
		35					40					45				

gga	act	ctt	ttc	tta	ggc	att	ttg	aag	aat	tgg	aaa	gag	gag	agt	gac	192
Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	
	50					55					60					

aga	aaa	ata	atg	cag	agc	caa	att	gtc	tcc	ttt	tac	ttc	aaa	ctt	ttt	240
Arg	Lys	Ile	Met	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe	
65					70					75					80	

aaa	aac	ttt	aaa	gat	gac	cag	agc	atc	caa	aag	agt	gtg	gag	acc	atc	288
Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln	Ser	Ile	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile	
				85					90					95		

aag	gaa	gac	atg	aat	gtc	aag	ttt	ttc	aat	agc	aac	aaa	aag	aaa	cga	336
Lys	Glu	Asp	Met	Asn	Val	Lys	Phe	Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg	
			100					105						110		

gat	gac	ttc	gaa	aag	ctg	act	aat	tat	tcg	gta	act	gac	ttg	aat	gtc	384
Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	Asn	Tyr	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Asn	Val	
		115					120					125				

caa	cgc	aaa	gca	ata	cat	gaa	ctc	atc	caa	gtg	atg	gct	gaa	ctg	tcg	432
Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	His	Glu	Leu	Ile	Gln	Val	Met	Ala	Glu	Leu	Ser	
	130					135				140						

cca	gca	gct	aaa	aca	ggg	aag	cga	aaa	agg	agt	cag	atg	ctg	ttt	cga	480
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
 145 150 155 160

ggt cga aga gca tcc cag taa
 Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 165

501

<210> 2
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
 20 25 30

Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 40 45

Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
 50 55 60

Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
 65 70 75 80

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
 85 90 95

Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
 100 105 110

Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
 115 120 125

Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
 130 135 140

Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
 145 150 155 160

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 165

<210> 3
 <211> 429

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(429)
<223>

<400> 3
cag gac cca tat gta aaa gaa gca gaa aac ctt aag aaa tat ttt aat 48
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1 5 10 15
gca ggt cat tca gat gta gcg gat aat gga act ctt ttc tta ggc att 96
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
20 25 30
ttg aag aat tgg aaa gag gag agt gac aga aaa ata atg cag agc caa 144
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
35 40 45
att gtc tcc ttt tac ttc aaa ctt ttt aaa aac ttt aaa gat gac cag 192
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
50 55 60
agc atc caa aag agt gtg gag acc atc aag gaa gac atg aat gtc aag 240
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
65 70 75 80
ttt ttc aat agc aac aaa aag aaa cga gat gac ttc gaa aag ctg act 288
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
85 90 95
aat tat tcg gta act gac ttg aat gtc caa cgc aaa gca ata cat gaa 336
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
100 105 110
ctc atc caa gtg atg gct gaa ctg tcg cca gca gct aaa aca ggg aag 384
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
115 120 125
cga aaa agg agt cag atg ctg ttt cga ggt cga aga gca tcc cag 429
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
130 135 140

<210> 4
<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1 5 10 15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
20 25 30

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125

Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

<210> 5
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(438)
 <223>

<400> 5
 tgt tac tgc cag gac cca tat gta aaa gaa gca gaa aac ctt aag aaa 48
 Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys
 1 5 10 15

tat ttt aat gca ggt cat tca gat gta gcg gat aat gga act ctt ttc 96
 Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe
 20 25 30

tta ggc att ttg aag aat tgg aaa gag gag agt gac aga aaa ata atg 144
 Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met
 35 40 45

cag agc caa att gtc tcc ttt tac ttc aaa ctt ttt aaa aac ttt aaa 192
 Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys
 50 55 60

gat gac cag agc atc caa aag agt gtg gag acc atc aag gaa gac atg 240
 Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met
 65 70 75 80

aat gtc aag ttt ttc aat agc aac aaa aag aaa cga gat gac ttc gaa 288
Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu
85 90 95

aag ctg act aat tat tcg gta act gac ttg aat gtc caa cgc aaa gca 336
Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala
100 105 110

ata cat gaa ctc atc caa gtg atg gct gaa ctg tcg cca gca gct aaa 384
Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys
115 120 125

aca ggg aag cga aaa agg agt cag atg ctg ttt cga ggt cga aga gca 432
Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala
130 135 140

tcc cag 438
Ser Gln
145

<210> 6
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe
20 25 30

Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met
35 40 45

Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys
50 55 60

Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met
65 70 75 80

Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu
85 90 95

Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala
100 105 110

Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys
115 120 125

Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala

130

135

140

Ser Gln
145

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> linker

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)
<223>

<400> 7
gcg gcc gca gga agc tct ggt tcc atc
Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ile
1 5

27

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> linker

<400> 8

Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ile
1 5



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 677823
FR 0602064

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>WASCHUETZA G ET AL: "ENGINEERED DISULFIDE BONDS IN RECOMBINANT HUMAN INTERFERON-GAMMA: THE IMPACT OF THE N-TERMINAL HELIX A AND THE AB-LOOP ON PROTEIN STABILITY" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 9, no. 10, octobre 1996 (1996-10), pages 905-912, XP002027562 ISSN: 0269-2139</p> <p>-----</p>		<p>C07K14/715 C12N15/23 C12N15/63 C12N5/10 A61K38/21 A61P35/00 A61P37/02 A61P31/12</p>
D,A	<p>WO 97/11179 A (FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER ANGEWAND; WASCHUETZA, GERO;) 27 mars 1997 (1997-03-27)</p> <p>-----</p>		
A	<p>EP 0 170 917 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 12 février 1986 (1986-02-12)</p> <p>-----</p>		
A	<p>EALICK S E ET AL: "THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF RECOMBINANT HUMAN INTERFERON-GAMMA" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 252, 3 mai 1991 (1991-05-03), pages 698-702, XP002027561 ISSN: 0036-8075</p> <p>-----</p>		
			<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p> <p>C07K</p>
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		26 septembre 2006	Espen, Josée
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>..... & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0602064 FA 677823**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26-09-2006

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9711179 A	27-03-1997	AT 246247 T	15-08-2003
		AU 7617796 A	09-04-1997
		CA 2232264 A1	27-03-1997
		DE 19535853 A1	20-03-1997
		DK 851926 T3	18-08-2003
		EP 0851926 A2	08-07-1998
		ES 2203723 T3	16-04-2004
		PT 851926 T	31-12-2003
		US 6046034 A	04-04-2000

EP 0170917 A	12-02-1986	AU 586822 B2	27-07-1989
		AU 4474985 A	16-01-1986
		CA 1303529 C	16-06-1992
		DE 3582973 D1	04-07-1991
		DE 170917 T1	04-09-1986
		DK 314485 A	12-01-1986
		ES 8609484 A1	16-12-1986
		IL 75738 A	29-06-1995
		JP 61024599 A	03-02-1986
		NO 852776 A	13-01-1986
		US 4898931 A	06-02-1990

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: en partie 1-3,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en F159; acide nucléique codant ce variante; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variante thermostable; utilisations du variante thermostable

2. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en R162; acide nucléique codant ce variante; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variante thermostable; utilisations du variante thermostable

3. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en A147; acide nucléique codant ce variante; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variante thermostable; utilisations du variante thermostable

4. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en C21; acide nucléique codant ce variante; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variante thermostable; utilisations du variante thermostable

5. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en Y22; acide nucléique codant ce variante; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variante thermostable; utilisations du variante thermostable

6. revendications: en partie: 1,2,5-14

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en Q24; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

7. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en D25; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

8. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en P26; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

9. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en V28; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

10. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en G41; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

11. revendications: en partie: 1,2,5-14

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en H42; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

12. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en S43; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

13. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en G49; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

14. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en T50; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

15. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en L51; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

16. revendications: en partie: 1,2,5-15

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en K57; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

17. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en N58; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

18. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en W59; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

19. revendications: 1,2,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en K60; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

20. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variante thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en E61; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

21. revendications: en partie: 1,2,5-14

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en E62; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

22. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en S63; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

23. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en Y76; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

24. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en E98; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

25. revendications: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en M100; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

26. revendications: en partie: 1-3,5-14

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en K109; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

27. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en K110; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

28. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en T119; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

29. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en Y121; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

30. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en S122; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

31. revendications: en partie: 1-3,5-14

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en K131; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

32. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en E135; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

33. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en M140; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

34. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en A146; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

35. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en M157; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

36. revendications: en partie: 1-3,5-14

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en L158; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

37. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en R160; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

38. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en R163; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

39. revendications: en partie: 1-3,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en A164; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

40. revendications: en partie: 1,2,5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant au moins une substitution en S165; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

41. revendications: 4; en partie 5-14

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 677823
FR 0602064

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant la substitution C23S; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

42. revendications: 4; en partie 5-14

Variant thermostable de l'interféron gamma ou un fragment fonctionnel de celui-ci comprenant la substitution M157C; acide nucléique codant ce variant; cassette d'expression, vecteur ou cellule hôte comprenant cet acide nucléique; composition pharmaceutique comprenant le variant thermostable; utilisations du variant thermostable

La première invention a été recherchée.

La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de l'article L.612-4 du CPI car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général. Le concept commun inventif général reliant les variants thermostables de l'interféron gamma humain ou un fragment fonctionnel de celui-ci revendiqués dans les revendications 1 ou 4 consiste dans une substitution d'au moins un acide aminé.

Ce concept commun n'est cependant pas nouveau pour les raisons suivantes: Waschütza et al. (Protein Engineering, vol. 9, pp. 905-912, 1996) divulgue un variant fonctionnel et thermostable de l'interféron gamma humain (E7C/S69C) correspondant aux positions (E30C/S92C) dans le SEQ ID No 2 de la présente demande.

Au vu de Waschütza et al., le problème et les solutions correspondantes peuvent être résumées comme suit:

Problème:

Enrichir l'art avec des variants thermostables de l'interféron gamma humain

Solutions 1-43:

Variants de l'interféron gamma humain comprenant au moins une substitution d'un acide aminé