

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-530420

(P2004-530420A)

(43) 公表日 平成16年10月7日(2004.10.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 9
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-563192 (P2002-563192)	(71) 出願人	502210552
(86) (22) 出願日	平成13年6月29日 (2001. 6. 29)		ファーマ パシフィック プロプライエタリー リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月27日 (2002. 12. 27)		オーストラリア国、ビクトリア、レイバートン ノース、パイプ ロード 103-105
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/002942	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開番号	W02002/062840		弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開日	平成14年8月15日 (2002. 8. 15)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	0016028.3		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成12年6月29日 (2000. 6. 29)	(74) 代理人	100088926
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 長沼 暉夫
(31) 優先権主張番号	0027089.2	(74) 代理人	100102897
(32) 優先日	平成12年11月6日 (2000. 11. 6)		弁理士 池田 幸弘
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターフェロン- $\alpha$ 誘導性遺伝子

## (57) 【要約】

本発明は、配列番号1のcDNA配列に対応する、インターフェロン- $\alpha$ 投与によりアップレギュレートされる遺伝子の同定に関する。この遺伝子の発現産物の測定は、インターフェロン- $\alpha$ 、および1型インターフェロン受容体で作用する他のインターフェロンを用いる治療に対する応答性を予測するのに有用であると言われている。同じ遺伝子によりコードされるタンパク質の治療的使用も企図される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

( i ) 配列番号 2 のアミノ酸配列；

( i i ) 免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性から選択された実質的に類似の機能を有する、その変種；または

( i i i ) 免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性から選択された実質的に類似の機能を保持する、( i ) または ( i i ) の断片、を含む単離されたポリペプチド。

## 【請求項 2】

配列番号のアミノ酸配列により定義されるポリペプチドおよび/またはその天然に存在する変種に対する特異的抗体を作成するのに適した、該ポリペプチドの変種または断片。 10

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

c D N A である、請求項 3 のポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

請求項 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって：

( a ) 配列番号 1 の核酸配列、またはそのコード配列および/またはそれに相補的な配列；

( b ) ( a ) で定義した配列にハイブリダイズする配列； 20

( c ) 遺伝コードの結果として、( a ) または ( b ) で定義した配列と縮重した配列；または

( d ) ( a )、( b ) または ( c ) で定義した配列と、少なくとも 60% の同一性を有する配列

を含む上記ポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

請求項 1 または 2 のポリペプチドを発現することができる、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクター。

## 【請求項 7】

請求項 6 の発現ベクターを含有する宿主細胞。 30

## 【請求項 8】

請求項 1 または請求項 2 のポリペプチドに特異的な抗体。

## 【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドのインビボの発現を指令する、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 10】

ヒトまたは非ヒト動物の治療的処置で使用するための、請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 9 のポリヌクレオチド。

## 【請求項 11】

請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 9 のポリヌクレオチドと、薬剤学的に許容される担体もしくは希釈剤とを含む医薬組成物。 40

## 【請求項 12】

抗ウイルス剤、抗腫瘍剤または免疫調節剤として治療に使用するための薬剤の製造における、請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 9 のポリヌクレオチドの使用。

## 【請求項 13】

1 型インターフェロンで治療可能な疾患を有する患者の治療法であって、請求項 1 のポリペプチドまたは請求項 9 のポリヌクレオチドの有効量を該患者に投与することを含む方法。

## 【請求項 14】

請求項 1 または 2 のポリペプチドの産生方法であって、ポリペプチドの発現を得るのに適した条件下で請求項 7 の宿主細胞を培養し、該ポリペプチドを単離することを含む、上記 50

方法。

【請求項 15】

免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物の同定方法であって、配列番号2のポリペプチドまたはその天然に存在する変種を発現することができる細胞を提供し、該細胞を試験化合物とともにインキュベートし、該ポリペプチドまたはその変種をコードする遺伝子のアップレギュレーションを追跡することを含む、上記方法。

【請求項 16】

ヒトまたは非ヒト動物の治療的処置で使用するための、配列番号2で定義されるアミノ酸配列のコード配列または該コード配列の天然に存在する変種に対するアンチセンス配列を、インビボで発現することができるポリヌクレオチド。

10

【請求項 17】

治療的処置で使用するための請求項8の抗体。

【請求項 18】

請求項4のcDNA内の配列を標的とする、核酸増幅のためのプライマーセット。

【請求項 19】

請求項3~5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドから得られる核酸プローブ。

【請求項 20】

固体支持体に結合された、請求項19のプローブ。

【請求項 21】

患者からの細胞試料中の、配列番号2のアミノ酸配列により定義されるタンパク質またはその天然に存在する変種、または対応するmRNAのレベルを測定することを含む、1型インターフェロンを用いる治療に対する患者の応答性を予測する方法であって、該試料は、1型インターフェロンの投与後に該患者から得られるか、または該測定の前に、1型インターフェロンでインビトロで処理される、上記方法。

20

【請求項 22】

試料を得る前に投与されるか、またはインビトロで試料を処理するために使用されるインターフェロンは、該患者の治療で使用する予定のインターフェロンである、請求項21の方法。

【請求項 23】

患者の血液試料から単離された末梢血単核細胞を含む試料は、1型インターフェロンでインビトロで処理される、請求項21または請求項22の方法。

30

【請求項 24】

測定は、配列番号2の配列により定義されるタンパク質または該タンパク質の天然に存在する変種をコードするmRNAのレベルを測定することを含む、請求項21~23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 25】

請求項1のポリペプチドを発現することができる非ヒトトランスジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

(発明の分野)

本発明は、そのコード配列が従来は未知であると考えられる、インターフェロン-(IFN-)投与によりアップレギュレートされるヒト遺伝子の同定に関する。この遺伝子の発現産物の検出は、IFN-、および1型インターフェロン受容体で作用する他のインターフェロンに対する応答性を予測するのに有用であり得る。同じ遺伝子によりコードされる単離された新規タンパク質の治療的使用も企図される。

【0002】

(発明の背景)

IFN-は、多くの疾患の治療で広く使用されている。IFN-を使用して治療される疾患には、新生物疾患(例えば、白血病、リンパ腫、および固形腫瘍)、AIDS関連

50

カポジ肉腫、およびウイルス感染症（例えば、慢性肝炎）がある。IFN- はまた、自己免疫疾患、マイコバクテリウム疾患、神経変性疾患、寄生体疾患、およびウイルス疾患の治療のために、口粘膜経路による投与が提唱されている。特にIFN- は、例えば、多発性硬化症、らい病、結核、脳炎、マラリア、子宮頸癌、陰部ヘルペス、B型肝炎とC型肝炎、HIV、HPVおよびHSV-1と2の治療について提唱されている。これはまた、関節炎、ループスおよび糖尿病の治療についても示唆されている。新生物疾患、例えば、多発性骨髄腫、ヘアリーセル白血病、慢性骨髄性白血病、低グレードリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、カルチノイド腫瘍、子宮頸癌、肉腫（例えばカポジ肉腫）、腎腫瘍、癌（腎細胞癌、肝細胞癌、上咽頭癌、血液癌、結腸直腸癌、神経膠芽細胞腫、喉頭パピローマ、肺癌、結腸癌、悪性黒色腫、および脳腫瘍を含む）もまた、口粘着経路（すなわち、経口および鼻内経路）によるIFN- の投与により治療可能であることが示唆されている。

10

## 【0003】

IFN- は、1型インターフェロンファミリーのメンバーであり、1型インターフェロン受容体との相互作用を介してその特徴的な生物活性を示す。他の1型インターフェロンには、IFN- 、IFN- 、およびIFN- がある。

## 【0004】

残念ながら、インターフェロン- のような1型インターフェロンによる治療の必ずしもすべての候補患者（例えば、慢性ウイルス肝炎、新生物疾患、および再発性弛緩性多発性硬化症の患者）が、1型インターフェロン療法に良好にตอบสนองすることはなく、またตอบสนอง者のうちほんの一部のみが長期的効果を示す。医師が1型インターフェロンの治療の結果を自信を持って予測できないことは、そのような治療のコスト-利益比に関して、治療の膨大な生物薬学的時間と失われた時間の無駄と、患者が受ける重大な副作用の点から、重大な問題を提起している。さらに、IFN- の異常産生は、多くの自己免疫疾患を引き起こすことが証明されている。これらの理由のために、1型インターフェロンは、多くの遺伝子の発現を調節して治療作用を示すため、1型インターフェロン応答性遺伝子の同定に大きな関心が寄せられている。実際、患者が治療にうまくตอบสนองするかいなかを決定するのは、1型インターフェロン治療により誘導される遺伝子発現の特異的パターンである。

20

## 【0005】

（発明の要約）

ヒト遺伝子cDNAは現在、口粘膜経路または腹腔内経路によるIFN- の投与によりアップレギュレートされるマウス遺伝子に対応するとして同定されている。従って対応するヒト遺伝子は、IFN- アップレギュレート遺伝子と呼ばれる。

30

## 【0006】

同じ遺伝子によりコードされるタンパク質を、以後HuIFRG15.4タンパク質と呼ぶ。このタンパク質およびその機能性変種は現在、特に抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、または免疫調節剤として使用するための治療薬として企図される。例えばこれらは、自己免疫疾患、マイコバクテリウム疾患、神経変性疾患、寄生体疾患、またはウイルス疾患、関節炎、糖尿病、ループス、多発性硬化症、らい病、結核、脳炎、マラリア、子宮頸癌、陰部ヘルペス、B型肝炎またはC型肝炎、HIV、HPV、HSV-1または2、または新生物疾患、例えば、多発性骨髄腫、ヘアリーセル白血病、慢性骨髄性白血病、低グレードリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、カルチノイド腫瘍、子宮頸癌、肉腫（例えばカポジ肉腫）、腎腫瘍、癌（腎細胞癌、肝細胞癌、上咽頭癌、血液癌、結腸直腸癌、神経膠芽細胞腫、喉頭パピローマ、肺癌、結腸癌、悪性黒色腫、および脳腫瘍を含む）の治療で使用してもよい。すなわち、そのようなタンパク質は、1型インターフェロンで治療可能な疾患を治療するのに有用であり得る。

40

## 【0007】

1型インターフェロン治療患者（例えば、IFN- を用いて、例えば口粘膜経路または非経口経路により治療される患者）の細胞試料中の、HuIFRG15.4タンパク質そ

50

の天然に存在する変種、または対応する mRNA の測定もまた、そのような治療に対する応答性を予測するのに使用される。あるいは、かつさらに好ましくは、そのような応答性は、例えばヒト末梢血単核細胞の試料を 1 型インターフェロンでインビトロで処理し、HuIFRG15.4 遺伝子に対応する発現産物（好ましくは mRNA）のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを調べることにより、判定される。

【0008】

本発明の第 1 の面において：

- (i) 配列番号 2 のアミノ酸配列；
  - (ii) 実質的に類似の機能、例えば免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性を有する、その変種；または
  - (iii) 実質的に類似の機能、例えば免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性を保持する (i) または (ii) の断片、
- を含む単離されたポリペプチドが提供される。

10

【0009】

本発明はまた、ヒトまたは非ヒト動物の治療で使用するための、さらに詳しくは抗ウイルス剤、抗腫瘍剤または免疫調節剤として使用するための、そのようなタンパク質を提供する。上記したように、そのような使用は、任意の 1 型インターフェロンで治療可能な疾患を包含してもよい。

【0010】

本発明の別の面において、上記の本発明のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドまたはその相補体が提供される。そのようなポリヌクレオチドは典型的には、以下を含む配列を含む：

20

- (a) 配列番号 1 の核酸、またはそのコード配列および/またはそれに相補的な配列；
- (b) 例えば厳密性（ストリンジェント）条件下で、(a) で定義した配列に相補的な配列にハイブリダイズする配列；
- (c) 遺伝コードの結果として、(a) または (b) で定義した配列と縮重した配列；
- (d) (a)、(b) または (c) で定義した配列と、少なくとも 60% の同一性を有する配列。

【0011】

本発明はまた、以下を提供する：

30

- 本発明のポリヌクレオチドを含み、本発明のポリペプチドを発現することができる発現ベクター；
- 本発明の発現ベクターを含有する宿主細胞；
- 本発明のポリペプチドに特異的な抗体；
- 1 型インターフェロンで治療可能な疾患を有する被験体の治療法であって、該患者に、有効量の HuIFRG15.4 タンパク質またはその機能性変種を投与することを含む方法；
- 抗ウイルス剤または抗腫瘍剤または免疫調節剤として治療に使用するための、さらに詳しくは 1 型インターフェロンで治療可能な疾患の治療に使用するための、薬剤の製造におけるそのようなポリペプチドの使用；
- 本発明のポリペプチドと薬剤学的に許容される担体もしくは希釈剤を含む医薬組成物；
- 本発明のポリペプチドの産生方法であって、本発明の宿主細胞を、ポリペプチドの発現を得るのに適した条件下で維持し、該ポリペプチドを単離することを含む方法；
- ヒトまたは非ヒト動物の治療的処置で使用するための、さらに詳しくは抗ウイルス剤、抗腫瘍剤または免疫調節剤として使用するための、上記で定義したポリペプチドのインビボ発現を指令する、例えば発現ベクターの形の本発明のポリヌクレオチド；
- そのようなポリヌクレオチドと薬剤学的に許容される担体もしくは希釈剤を含む医薬組成物；
- 1 型インターフェロンで治療可能な疾患を有する被験体の治療法であって、有効量の

40

50

そのようなポリヌクレオチドを該患者に投与することを含む方法；

- 抗ウイルス剤、は抗腫瘍剤または免疫調節剤として治療に使用するための、さらに詳しくは1型インターフェロンで治療可能な疾患の治療に使用するための、薬剤、例えばベクター調製物の製造におけるそのようなポリヌクレオチドの使用；

- 免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物の同定方法であって、HuIFRG15.4タンパク質またはその天然に存在する変種を発現することができる細胞を提供し、該細胞を試験化合物とともにインキュベートし、HuIFRG15.4遺伝子発現のアップレギュレーションを追跡することを含む方法。

#### 【0012】

さらに別の面において本発明は、患者からの細胞試料（例えば血液試料）中の、HuIFRG15.4タンパク質またはその天然に存在する変種（例えばアレレ変種）、または対応するmRNAのレベルを測定することを含んでなる、1型インターフェロンを用いる治療、例えばIFN-治療（例えば、口粘膜経路または非経口経路、例えば静脈内、皮下、または筋肉内経路によるIFN-治療）に対する患者の応答性を予測する方法であって、該試料は、1型インターフェロン（例えばIFN-）の投与（例えば、口粘膜経路または静脈内経路）後に該患者から得られるか、または該測定の前に、1型インターフェロン（例えば、IFN-）でインビトロで処理される、上記方法が提供される。本発明はまた、そのような試験を実施するためのキットを包含する。

#### 【0013】

（配列の簡単な説明）

配列番号1は、ヒトタンパク質HuIFRG15.4のアミノ酸配列とそのコードするcDNAである。

配列番号2は、HuIFRG15.4タンパク質のアミノ酸配列のみである。

#### 【0014】

（発明の詳細な説明）

上記したようにヒトタンパク質HuIFRG15.4とその機能性変種は現在、治療的に有用な物質として、さらに詳しくは抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、または免疫調節剤としての使用が企図される。

#### 【0015】

この目的のためにHuIFRG15.4タンパク質の変種は、HuIFRG15.4タンパク質と実質的に同じ機能活性を有し、IFN-の投与にตอบสนองしてアップレギュレートされる、天然に存在する変種（アレレ変種または種変種）でもよい。あるいは治療用途のHuIFRG15.4タンパク質の変種は、配列番号2とは異なるが非天然の変異体である配列を含んでよい。

#### 【0016】

「機能性変種」という用語は、HuIFRG15.4タンパク質の基本的機能と基本的に同じ性質を有するポリペプチドを含む。HuIFRG15.4タンパク質の基本的性質は、免疫調節ペプチドであると見なされる。機能性変種ポリペプチドは、追加的にまたは代替的に、抗ウイルス活性（例えば、アポトーシス）および/または抗腫瘍活性を示す。

#### 【0017】

所望の抗ウイルス活性は、例えば以下のように試験される。試験すべき変種をコードする配列は、ウイルスパッケージングシグナル および薬剤耐性マーカーを含有する、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV) から得られるレトロウイルスベクターのようなレトロウイルスベクター中にクローン化される。ウイルス gag および pol 遺伝子を含有する向汎性パッケージング細胞株は、次に組換えレトロウイルスベクターおよびプラスミド pVSV-G (水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質を含有する) と同時トランスフェクションされて、高力価の感染性複製不能ウイルスが産生される (バーンズ (Burns) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5232-5236)。次に感染性組換えウイルスを使用して、インターフェロン感受性繊維芽細胞またはリンパ芽球細胞をトランスフェクションし、次に変種タンパク質を安定に発現

10

20

30

40

50

する細胞株を選択し、標準的インターフェロンバイオアッセイでウイルス感染に対する耐性について試験する(トベイ(Tovey)ら、Nature, 271, 622-625, 1978)。標準的増殖測定法(モスマン(Mosmann, T.)、J. Immunol. Methods, 65, 55-63, 1983)を使用する増殖阻害と、標準的方法を使用するMHCクラスIおよびクラスIIの発現も調べてもよい。

【0018】

HuIFRG15.4の所望の機能性変種は、基本的に配列番号2の配列からなる。配列番号2の機能性変種は、少なくとも20、好ましくは少なくとも30、例えば少なくとも100の連続アミノ酸の領域にわたって、または配列番号2の完全長にわたって、配列番号2のアミノ酸配列と、少なくとも60%~70%の同一性、好ましくは少なくとも80%または少なくとも90%および特に好ましくは少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドでもよい。タンパク質の同一性を測定する方法は、当該分野で公知である。

10

【0019】

例えば1、2、または3から10、20または30置換のアミノ酸置換を作成してもよい。例えば、以下の表に従って保存的置換を作成してもよい。2列目の同じブロック中、および好ましくは3列目の同じ行のアミノ酸は、互いに置換できる。

【0020】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
	極性-荷電	DE
		KR
芳香族		HFVY

20

【0021】

本発明の治療で使用される変種ポリペプチド配列は、より短いポリペプチド配列、例えば長さが少なくとも20アミノ酸のペプチドでもよく、または50、60、70、80、100、150または200アミノ酸までの長さも、HuIFRG15.4タンパク質の適切な生物活性を保持する限り、本発明の範囲内にあると考えられる。特に(しかし、排他的ではない)本発明のこの面は、変種が、完全な天然に存在するタンパク質配列のフラグメントである時を包含する。

30

【0022】

また、抗HuIFRG15.4タンパク質抗体を作成するのに使用することができるHuIFRG15.4タンパク質の修飾型およびその断片も、本発明に包含される。そのような変種は、HuIFRG15.4タンパク質のエピトープを含むであろう。

【0023】

本発明のポリペプチドは、化学的に修飾(例えば、翻訳的に修飾)してもよい。例えばこれらは、グリコシル化されるかおよび/または修飾アミノ酸残基を含有してもよい。これらはまた、N末端および/またはC末端で配列の付加により、例えばその精製を助けるためにヒスチジン残基またはT7標識の提供により、または細胞膜への挿入を促進するためにシグナル配列の付加により、修飾してもよい。そのような修飾ポリペプチドは、本発明の「ポリペプチド」という用語の範囲に含まれる。

40

【0024】

本発明のポリペプチドは、露出性の標識物で標識してもよい。露出性の標識物は、ポリペプチドが検出されることを可能にする任意の適切な標識物である。適切な標識物には、ラジオアイソトープ(例えば、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S)、または酵素、抗体、ポリヌクレオチド

50

、およびリンカー（例えば、ビオチン）がある。本発明の標識ポリペプチドは、アッセイで使用してもよい。そのようなアッセイにおいて、固体支持体に結合したポリペプチドを提供することが好ましい。本発明はまた、容器中のキットの形でパッケージングされたそのような標識したおよび/または固定化したポリペプチドに関する。キットは場合により、他の適切な試薬、対照、または説明書などを含有してもよい。

#### 【0025】

本発明のポリペプチドは、合成法または組換え法により作成してもよい。本発明のそのようなポリペプチドは、天然に存在しないアミノ酸（例えばDアミノ酸）を含むように修飾してもよい。本発明の変種ポリペプチドは、インビトロおよび/またはインビボでの安定性を上昇させるための修飾を有してもよい。ポリペプチドが合成法により産生される時、そのような修飾は、産生中に導入される。ポリペプチドはまた、合成または組換え産生後に、修飾してもよい。

10

#### 【0026】

タンパク質修飾分野では、多くの側鎖修飾が公知であり、本発明のポリペプチド中に存在してもよい。そのような修飾には、例えばアルデヒドと反応し次に $\text{NaBH}_4$ と反応させる還元的アルキル化によるアミノ酸の修飾、メチルアセトイミデートによるアミジノ化、または無水酢酸によるアシル化がある。

#### 【0027】

本発明のポリペプチドは、実質的に単離した型である。ポリペプチドは、ポリペプチドの目的を妨害しない担体または希釈剤と混合してもよく、それでも実質的に単離されていると見なされる。本発明のポリペプチドはまた、実質的に精製された型で、一般に調製物中90重量%より多い、例えば95、98または99重量%より多いポリペプチドが本発明のポリペプチドである調製物中でポリペプチドを含む。

20

#### 【0028】

ポリヌクレオチド

本発明はまた、HuIFRG15.4タンパク質またはその変種をコードする単離されたヌクレオチド配列、ならびにこれに相補的な単離されたヌクレオチド配列を含む。ヌクレオチド配列は、DNAまたはRNA、1本鎖または2本鎖（ゲノムDNA、合成DNA、cDNAを含む）でもよい。好ましくはヌクレオチド配列は、DNA配列であり、最も好ましくはcDNA配列である。

30

#### 【0029】

前記したように、そのようなポリヌクレオチドは典型的には：

- (a) 配列番号1の核酸、またはそのコード配列、および/またはそれに相補的な配列；
  - (b) 例えば厳密性条件下で、(a)で定義した配列に相補的な配列にハイブリダイズする配列；
  - (c) 遺伝コードの結果として(a)または(b)で定義した配列と縮重した配列；
  - (d) (a)、(b)、または(c)で定義した配列と少なくとも60%の同一性を有する配列、
- を含むであろう。

#### 【0030】

適切なコード配列を含むポリヌクレオチドは、ヒト細胞から単離されるか、または例えばサムブルーク(Sambrook)ら(1989)モレキュラークローニング、実験室マニュアル、第2版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス(Cold Spring Harbor Laboratory)に記載のような、当該分野で公知の方法に従って合成される。

40

#### 【0031】

本発明のポリヌクレオチドは、その中に合成または修飾ヌクレオチドを含有してもよい。ポリヌクレオチドへの多くの異なる型の修飾が当該分野で公知である。それらには、メチルホスフォネートおよびホスホチオエート骨格、分子の3'末端および/または5'末端のアクリジンまたはポリリジン鎖の付加がある。そのような修飾は、本発明のポリヌクレ

50



オチドのインピボ活性の上昇または寿命の延長のために行われる。

【0032】

典型的には本発明のポリヌクレオチドは、ヌクレオチド配列を含有し、これは好ましくはヌクレオチドの連続的配列であり、選択的条件下で配列番号1のコード配列またはコード配列の相補体にハイブリダイズすることができる。そのようなハイブリダイゼーションは、バックグランドより有意に高いレベルで起きるであろう。バックグランドハイブリダイゼーションは、例えばcDNAライブラリー中に存在する他のcDNAにより起きるかも知れない。本発明のポリヌクレオチドと配列番号1のコード配列またはコード配列の相補体との間の相互作用により生成するシグナルレベルは、他のポリヌクレオチドと配列番号1のコード配列との間の相互作用より、典型的には少なくとも10倍、好ましくは少なくとも100倍強い。相互作用の強度は、例えばプローブを例えば<sup>32</sup>Pで放射能標識して測定される。選択的ハイブリダイゼーションは、典型的には低い厳密性(約40の0.3M塩化ナトリウムと0.03Mクエン酸ナトリウム)、中程度の厳密性(例えば、約50の0.3M塩化ナトリウムと0.03Mクエン酸ナトリウム)、または高い厳密性(例えば、約60の0.03M塩化ナトリウムと0.03Mクエン酸ナトリウム)の条件下で行われる。

10

【0033】

配列番号1のコード配列は、ヌクレオチド置換(例えば1、2または3から10、25、50または100の置換)により修飾してもよい。縮重置換が行われるかおよび/または、修飾配列が例えば上記表に示すように翻訳された時、保存的アミノ酸置換が起きるような置換が行われてもよい。配列番号1のコード配列は、代替的にまたは追加的に、1つ以上の挿入および/または欠失および/または一端または両端での伸長により修飾されてよい。

20

【0034】

配列番号1から選択されたDNA配列、そのコード配列、およびそれに相補的なDNA配列に選択的にハイブリダイズすることができる本発明のポリヌクレオチドは、標的配列に一般的に少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%または90%およびさらに好ましくは少なくとも95%または97%相同的である。この相同性は、典型的には少なくとも20、好ましくは少なくとも30、例えば少なくとも40、60または100またはそれ以上の連続的ヌクレオチドの領域にわたる。

30

【0035】

上記の相同性の程度と最小のサイズの任意の組合せは本発明のポリヌクレオチドを定義するのに使用され、より厳密な組合せ(すなわち、より長い長さにわたってより高い相同性)が好ましい。すなわち例えば25、好ましくは30ヌクレオチド以上にわたって少なくとも80%の相同性のポリヌクレオチドが適当であり、40ヌクレオチドにわたって少なくとも90%の相同性のポリヌクレオチドが同様に好ましい。

【0036】

本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはタンパク質配列の同族体は、相同性計算の公知の手段によって決定され、例えばタンパク質相同性は、アミノ酸同一性(時に「ハード(hard)相同性」と呼ばれる)に基づき計算される。例えばUWGCパッケージは、相同性を計算するのに使用できるBESTFITプログラムを提供する(例えば、そのデフォルト設定に基づき使用される)(デベロー(Devereux)ら、(1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395)。例えばアルツチュル・エス・エフ(Altschul S.F.)(1993) J. Mol. Evol. 36, 290-300;アルツチュル・エス・エフ(Altschul S.F.)(1993) J. Mol. Biol. 215, 403-10に記載のように、相同性またはラインアップ配列を計算するのにまたは同等のまたは対応する配列を同定するのに、PILEUPおよびBLASTアルゴリズムを、そのデフォルト設定に基づき使用することができる。

40

【0037】

50

B L A S T解析を行うためのソフトウェアは、ナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーション(National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)から公に入手できる。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さの単語と並べた時、ある正の閾値スコアTに一致するかまたは満足する問題の配列中の長さWの短い単語を同定することにより、まず高スコア配列対(HSPs)を同定する。Tは、近隣単語スコア閾値と呼ばれる(アルツチュル(Altschul)ら、前述)。これらの近隣単語ヒットは、それらを含むHSPsを見つけるための検索を開始するための元になる。単語ヒットは、累積整列スコアが増加する限り、各配列に沿って両方向に伸長される。各方向の単語ヒットの延長は、以下の時停止する：累積整列スコアが、その最大達成値から量Xだけ低下した時；1つ以上の負のスコアの残基整列の蓄積により、累積スコアがゼロまたはそれ以下になった時；またはいずれかの配列の末端に到達した時。B L A S TアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、整列の感度と速度を決定する。B L A S Tプログラムは、デフォルト値として、単語長さ(W)が11、B L O S U M 6 2スコアリングマトリックス(ヘニコフ(Henikoff)とヘニコフ(Henikoff) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919) 整列(B)が50、予測(E)が10、M=5、N=4を使用し、および両方の鎖の比較を使用する。

10

**【0038】**

B L A S Tアルゴリズムは、2つの配列の間の類似性の統計解析を行う；例えば、カーリン(Karlin)とアルツチュル(Altschul) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照。B L A S Tアルゴリズムにより提供される類似性の1つの尺度は、最も小さい和確率(P(N))であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の一致が偶然起きる確率を示す。例えば第1の配列と第2の配列との比較における最も小さい和確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、さらに好ましくは約0.01未満、および最も好ましくは約0.001未満なら、その配列は別の配列と同様であると見なされる。

20

**【0039】**

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質の産生において有用であり、これは、インビトロ、インビボ、またはエクスピボで起きる。そのようなポリヌクレオチドにおいて、本発明の所望のタンパク質のコード配列は、選択された宿主細胞中の所望のタンパク質の発現を指令することができるプロモーター配列に機能できる形で結合しているであろう。そのようなポリヌクレオチドは一般的に、発現ベクターの形にある。免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性を有する本発明のポリペプチドのインビボの発現を指令する本発明のポリヌクレオチド(例えば発現ベクターの形)は、治療薬としても使用される。

30

**【0040】**

そのような目的の発現ベクターは、組換えDNA技術の分野で一般的な方法に従って構築される。これらは、例えばプラスミドDNAの使用を含む。これらは、複製開始点とともに提供される。そのようなベクターは、1つ以上の選択マーカー遺伝子、例えば細菌プラスミドの場合はアンピシリン耐性遺伝子を含有してもよい。本発明のベクターの他の特徴は、適切なイニシエーター、エンハンサーおよび他の要素(例えば、好ましくかつ正しい配向で位置しているポリアデニル化シグナル)を含有して、タンパク質発現を可能にする。他の適当な非プラスミドベクターは、当業者に公知である。この点でさらに例として、サムブルーク(Sambrook)ら1989(前述)を再度参照されたい。そのようなベクターは、例えばウイルスベクターを追加的に含有してもよい。適当なウイルスベクターの例には、単純ヘルペスウイルスベクター、複製欠損レトロウイルス(レンチウイルスを含む)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、HPVウイルス(例えば、HPV-16とHPV-18)および弱毒化インフルエンザウイルスベクターがある。

40

**【0041】**

50

プロモーターおよび他の発現制御シグナルは、発現が計画される宿主細胞に適合性があるように選択される。例えば酵母プロモーターには、エス・セレビスシェ (*S. cerevisiae*) GAL4 や ADH プロモーター、エス・ポンベ (*S. pombe*) nmt1 および adh プロモーターがある。哺乳動物プロモーターには、重金属 (例えば、カドミウム) に応答して誘導されるメタロチオネインプロモーターおよび - アクチンプロモーターがある。SV40 ラージ T 抗原プロモーター、またはアデノウイルスプロモーターのようなウイルスプロモーターも使用される。使用可能なウイルスプロモーターの他の例には、モロニーマウス白血病ウイルス末端繰返し配列 (MMLV LTR)、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) IE プロモーター、および HPV プロモーター、特に HPV 上流制御領域 (URR) がある。他の適当なプロモーターは、組換え DNA 分野の当業者に公知である。

10

**【0042】**

本発明の発現ベクターは、さらに真核生物ゲノム配列、好ましくは哺乳動物ゲノム配列、またはウイルスゲノム配列に相補的配列を提供する本発明の所望のポリペプチドのためのコード配列の両側に位置する配列を含む。これは、相同的組換えによる真核生物細胞またはウイルスのゲノム内への本発明のそのようなポリヌクレオチドの導入を可能にする。特に、ウイルス配列が両側に位置する発現カセットを含むプラスミドベクターを使用して、本発明のポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に送達するのに適したウイルスベクターが調製される。

**【0043】**

本発明はまた、HuIFRG15.4 タンパク質またはその変種を発現するように修飾されたインビトロの細胞、例えば原核生物細胞または真核生物細胞を含む。そのような細胞は、安定な、例えば真核生物細胞株を含み、ここで HuIFRG15.4 タンパク質またはその変種をコードするポリヌクレオチドは、宿主のゲノム内に取り込まれる。本発明の宿主細胞は、哺乳動物細胞または昆虫細胞、下等真核生物細胞 (例えば酵母)、または原核生物細胞 (例えば、細菌細胞) でもよい。本発明のポリペプチドをコードするベクターの挿入により修飾される細胞の具体的な例には、哺乳動物 HEK293T、CHO、HeLa および COS 細胞がある。好ましくは細胞株は、安定なだけでなく、ポリペプチドの成熟したグリコシル化を可能にするものが選択される。発現は、例えば、形質転換された卵母細胞中で行われる。

20

30

**【0044】**

本発明のポリペプチドは、トランスジェニック非ヒト動物、好ましくはマウスの細胞で発現される。本発明のポリペプチドを発現することができるトランスジェニック非ヒト動物は、本発明の範囲に含まれる。

**【0045】**

本発明のポリヌクレオチドはまた、アンチセンス配列の産生を提供することができるように、アンチセンス配向で上記のベクター中に挿入される。アンチセンス RNA または他のアンチセンスポリヌクレオチドもまた、合成手段により産生される。

**【0046】**

ヒトまたはヒトではない動物の治療に使用される、配列番号 2 で定義されるアミノ酸配列のコード配列またはその天然に存在する変種のアンチセンスをインビボで発現することができる、例えば発現ベクターの形の、ポリヌクレオチドもまた、本発明の追加の面を構成することが企図される。そのようなポリヌクレオチドは、HuIFRG15.4 タンパク質のアップレギュレーションに関連する疾患の治療に有用であろう。

40

**【0047】**

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの cDNA 内の配列を標的とする核酸増幅のためのプライマーのセット、または PCR 増幅のためのプライマー対を包含する。本発明はまた、本発明のポリペプチドの cDNA または RNA 内の配列を標的とするのに適したプローブを提供し、これは、露出性の標識物、例えば放射能標識物または非放射能標識物 (例えば、酵素またはビオチン) で標識されてよい。そのようなプローブは、固

50

体支持体に結合してもよい。そのような固体支持体は、さらなる核酸（例えば、他の1型インターフェロンアップレギュレートされた遺伝子、例えばIFN- $\alpha$ の口腔粘膜または静脈内投与に反応してアップレギュレートされるとして同定される遺伝子に対応する、mRNAまたはその増幅産物）のプローブを運搬するマイクロアレイ（一般的に核酸、プローブまたはDNAチップとも呼ばれる）でもよい。そのようなマイクロアレイを構築する方法は公知である（例えば、アフィマックス・テクノロジーズ（Affymax Technologies）N.V.のEP-B0476014号および0619321号、およびNature Genetics 増刊、1999年1月号、標題「チップング予測」を参照）。

#### 【0048】

そのようなプライマーまたはプローブの核酸配列は、好ましくは少なくとも10、好ましくは少なくとも15または少なくとも20、例えば少なくとも25、少なくとも30または少なくとも40ヌクレオチドの長さである。しかしこれは、最大40、50、60、70、100または150ヌクレオチドの長さまたはそれ以上でもよい。

#### 【0049】

本発明の別の面は、HuIFRG15.4遺伝子中の突然変異（例えば、単一のヌクレオチド多型（SNPs））を同定するための本発明のプローブまたはプライマーの使用である。

#### 【0050】

前記したように、別の面において本発明は、HuIFRG15.4タンパク質または天然に存在するその変種を発現することができる細胞を提供し、該細胞を試験化合物とインキュベートし、HuIFRG15.4遺伝子発現のアップレギュレーションを追跡することを含む、免疫調節活性および/または抗ウイルス活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物の同定方法を提供する。そのような追跡は、HuIFRG15.4タンパク質またはその天然に存在する変種をコードするmRNAをプローブ結合することにより行われる。あるいは1つ以上のHuIFRG15.4および天然に存在する変種の1つ以上に特異的に結合することができる抗体または抗体断片も使用される。

#### 【0051】

抗体

別の面において本発明はまた、従来法により得られ、かつ本発明のポリペプチドに特異的な抗体（例えば、ポリクローナル抗体または好ましくはモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体と抗原結合能を保持するその断片）に関する。そのような抗体は、例えば、免疫沈降を含む精製、単離またはスクリーニング法に有用であり、HuIFRG15.4タンパク質またはその変種の機能をさらに解明するための手段として使用されるであろう。これらは、それ自身が治療薬であり得る。そのような抗体は、本発明のタンパク質の特異的エピトープに対して作成される。抗体は、あるタンパク質に高親和性で結合するが、他のタンパク質には結合しないかまたは低親和性で結合する時、そのタンパク質に特異的に結合する。抗体の特異的結合能を測定するための競合的結合アッセイまたは免疫放射アッセイのための種々のプロトコールが知られている。

#### 【0052】

医薬組成物

本発明のポリペプチドは典型的には、薬剤学的に許容される担体もしくは希釈剤とともに投与するために製剤化される。この薬剤学的に許容される担体もしくは希釈剤は、例えば等張溶液でもよい。例えば固体経口剤は、活性化合物とともに、希釈剤、例えば乳糖、デキストロース、サッカロース、セルロース、コーンスターチまたはポテトスターチ；滑沢剤、例えばシリカ、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウムまたはカルシウム、および/またはポリエチレングリコール；結合剤、例えばデンプン、アラビアゴム、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはポリビニルピロリドン；崩壊剤、例えばデンプン、アルギン酸、アルギン酸塩またはナトリウムデンプングリコレート；発泡剤；色素；甘味剤；湿潤剤、例えばリシチン、ポリソルベート、ラウリル硫酸

10

20

30

40

50

塩；および一般的に、製剤で使用される非毒性かつ薬学的不活性な物質を含有する。そのような医薬調製物は、公知の方法で製造され、例えば混合、造粒法、打錠法、糖衣、またはフィルムコーティングプロセスで製造される。

【0053】

経口投与用の液体分散物は、シロップ剤、乳剤および懸濁剤でもよい。シロップ剤は、担体として、例えばサッカロースまたはグリセリンおよび/またはマンニトールおよび/またはソルビトールとともにサッカロースを含有してもよい。

【0054】

懸濁剤と乳剤は、担体として例えば天然ゴム、寒天、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはポリビニルアルコールを含有してもよい。筋肉内注射のための懸濁剤または溶液剤は、活性化化合物とともに、薬剤学的に許容される担体、例えば無菌水、オリーブ油、オレイン酸エチル、グリコール、例えばプロピレングリコール、および所望であれば、適切な量の塩酸リドカインを含有してもよい。

10

【0055】

静脈内投与または点滴用の溶液は、担体として例えば無菌水を含有してもよく、または好ましくはこれらは、無菌、水性、等張の食塩水の形でもよい。

【0056】

本発明で使用されるHuIFRG15.4タンパク質またはその機能的類似体の適切な用量は、種々のパラメータ、特に使用される物質；治療される患者の年齢、体重および症状；投与経路；および必要な処方によって決定される。再度医師が、特定の患者の必要な投与経路や用量を決定するであろう。典型的な1日当たりの用量は、特異的インヒビターの活性、治療される被験体の年齢、体重および症状、および投与の頻度と経路に従って、約0.1~50mg/kg体重、好ましくは約0.1mg/kg~10mg/kg体重である。好ましくは1日当たりの用量レベルは、5mg~2gである。

20

【0057】

治療用途に適した本発明のポリヌクレオチドはまた、典型的には薬剤学的に許容される担体もしくは希釈剤との投与用に製剤化されるであろう。そのようなポリヌクレオチドは、インビボで所望のポリペプチドの発現が達成される任意の公知の方法により投与される。例えばポリヌクレオチドは、注射（好ましくは、皮内、皮下または筋肉内）により投与される。あるいは核酸を、直接皮膚を通して粒子介在送達装置を使用して投与してもよい。治療用核酸に適した本発明のポリヌクレオチドは、あるいは例えば鼻内または経口投与により、口腔粘膜表面に投与される。

30

【0058】

治療用途に適した本発明の非ウイルスベクターは、例えばリポソームまたは界面活性剤含有ベクター送達粒子中にパッケージングされる。本発明の核酸構築体の取り込みは、いくつかのトランスフェクション法（例えばトランスフェクション物質の使用を含むもの）により増強される。これらの物質の例には、陽イオン性物質、例えばリン酸カルシウム、およびDEAEデキストラン、リポフェクタント（例えば、リポフェクタムおよびトランスフェクタム）がある。投与される核酸の用量は変化してもよい。典型的には核酸は、1pg~1mg、好ましくは粒子介在遺伝子送達には1pg~10μg核酸、そして他の経路には10μg~1mgの範囲で投与される。

40

【0059】

1型インターフェロン応答性の予測

また前記したように、さらに別の面において本発明は、1型インターフェロンによる治療（例えば、口腔粘膜経路または静脈内経路によるIFN-治療のようなIFN-治療）に対する患者の応答性を予測する方法であって、患者の細胞試料中のHuIFRG15.4タンパク質またはその天然に存在する変種または対応するmRNAのレベルを測定することを含んでなり、該試料は、1型インターフェロンが投与された後に該患者から得られるか、または該測定前に1型インターフェロンでインビトロで処理される、上記方法を

50

提供する。

【0060】

好ましくは、応答性を試験するための1型インターフェロンは、治療用に選択された1型インターフェロンであろう。これは、提唱された治療経路および提唱された治療用量で投与される。好ましくは分析される以後の試料は、例えば血液試料または血液試料から単離された末梢血単核細胞(PBMCs)の試料である。

【0061】

より便利で好ましくは、血液から単離したPBMCsを含む患者から得られた試料を、インビトロで1型インターフェロン(例えば、約1~10,000IU/mlの用量範囲)で処理される。そのような処理は、数時間(例えば、約7~8時間)の長さである。そのようなインビトロ試験の好適な処理条件は、正常ドナーから取ったPBMCsを同じインターフェロンで試験し、適切な発現生成物のアップレギュレーションを調べることにより決定される。使用される1型インターフェロンは、好ましくは患者の治療に提唱された1型インターフェロン(例えば、組換えIFN-)である。そのような試験のPBMCsは、従来法で血液試料からフィコール-ヒペーク(Ficoll-Hypaque)密度勾配を使用して単離してもよい。1型インターフェロン応答性のそのようなインビトロ試験の適切なプロトコルの例を、以下の表3に示す。

10

【0062】

試料は、1型インターフェロンによりインビトロ処理の後に適宜、HuIFRG15.4タンパク質またはその天然に存在する変種のレベルについて分析される。これは、HuIFRG15.4タンパク質およびその天然に存在する変種(例えば、そのアレレ変種)に特異的に結合することができる1つまたは複数の抗体を使用して行ってもよい。しかし好ましくは試料は、HuIFRG15.4タンパク質またはその天然に存在する変種をコードするmRNAについて分析される。そのようなmRNA分析は、mRNAの検出について公知の任意の方法(例えば、ノーザンブロット検出またはmRNA差別ディスプレイ)を使用する。検出前に、試料中に存在する目的のmRNAまたはその一部を増幅するのに、種々の公知の核酸増幅プロトコルが使用できる。目的のmRNAまたは対応する増幅核酸は、固体支持体に結合した核酸プローブを使用して、プローブ結合してもよい。そのような固体支持体は、前記したように、1型インターフェロンでアップレギュレートされた遺伝子、例えばIFN-の口腔粘膜または静脈内投与に反応してアップレギュレート

20

30

【0063】

以下の例は本発明を例示する。

【0064】

例

【0065】

例1

正常な成体マウスの各鼻孔にP20エッペンドルフマイクロピペットを使用して、5μlのクリスタルバイオレットを適用すると、口咽頭腔の全表面にわたってほとんど直後に色素が分布することが、実験で証明されている。口咽頭腔の染色は、色素の適用後約30分後もまだ明らかであった。これらの結果は、同じ方法で適用された125I-標識組換えヒトIFN-1-8を使用して確認された。同じ投与方法を使用して、以下に示す試験で口腔粘膜投与を行った。

40

【0066】

6週齢の雄のDBA/2マウスを、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中のライフテクノロジーズ社(Life Technologies Inc.)から購入した100,000IUの組換えマウスインターフェロン(IFN)、プロテインインスティテュート社(Protein Institute Inc.)から購入した10μgの組換えヒトインターロイキン15(IL-15)、100μg/mlのウシ血清アルブミン(BSA)

50

を含有するPBSで処理したか、または未処理のままとした。8時間後、マウスを頸部脱臼により屠殺し、口咽頭腔から外科的にリンパ組織を取り出し、液体窒素中で急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。チョムクジンスキー(Chomczynski)とサッチ(Sacchi)1987の方法(Anal. Biochem. 162, 156-159)によりリンパ組織からRNAを抽出し、mRNA差別ディスプレイ分析を行った(ラング・ピー(Lang. P.)とパルディー・エー・ビー(Pardue, A.B.), Science 257, 967-971)。

#### 【0067】

##### 差別ディスプレイ分析

差別ディスプレイ分析は、ゲンハンターコーポレーション(GenHunter Corporation)の「メッセージクリーン(Message Clean)」と「RNAイメージ(RNA image)」キットを、基本的に製造業者が記載するように使用して行った。簡単に説明すると、RNAをRNAを含まないDNAaseで処理し、 $1\mu\text{g}$ を、3つの1塩基アンカーオリゴ-(dT)プライマーA、C、またはGのいずれかを使用して、 $100\mu\text{l}$ の反応緩衝液中で逆転写した。RNAはまた、9個の2塩基アンカーオリゴ-(dT)プライマーAA、CC、GG、AC、CA、GA、AG、CG、GCのいずれかを使用して逆転写した。比較すべきすべて試料を、同じ実験で逆転写し、アリコートに分けて凍結した。TaqDNAポリメラーゼと $^{-32}\text{P}$  dATP( $3,000\text{Ci}/\text{mmol}$ )を含有する $10\mu\text{l}$ の増幅混合物中のわずかに $1\mu\text{l}$ の逆転写試料で、増幅を行った。80の5'末端(HAP)ランダム配列プライマーを、(HT11)A、C、G、AA、CC、GG、AC、CA、GA、AG、CG、またはGCプライマーのそれぞれと組合せて使用した。次に試料を、7%変性ポリアクリルアミドゲルで流し、オートラジオグラフィーに暴露した。推定の示差的に発現されたバンドを切り取り、供給業者の説明書に従って再増幅し、IFN処理、IL-15処理、および賦形剤処理動物の口咽頭腔から抽出したRNAのノーザンプロットとハイブリダイズするプローブとしてさらに使用した。

10

20

#### 【0068】

##### クローニングと配列決定

差別ディスプレイスクリーニングからの再増幅バンドを、pPCR-ScriptSK(+)プラスミド(ストラタジーン(Stratagene))のSfr1部位にクローン化し、cDNA末端の迅速増幅から増幅されたcDNAを、pCR3プラスミド(インビトロゲン(Invitrogen))中のTAクローニングにより単離した。自動ジデオキシシーケンサー(パーキン・エルマー(Perkin-Elmer)ABI PRISM 377)を使用して配列決定した。

30

#### 【0069】

##### ヒトcDNAの単離

差別ディスプレイスクリーニングから同定された示差的に発現されたマウス3'配列を、米国ナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーション(NCBI, National Center for Biotechnology Information)のGenBank(登録商標)のdbESTデータベース中に存在するランダムなヒトの発現配列標識(EST)と比較した。差別ディスプレイスクリーニングから単離されたマウスESTと関連するかも知れない配列をコンチグ(contig)で組合せて、推定cDNAに対応するヒトコンセンサス配列を構築するのに使用した。そのようなcDNAの1つは、556ヌクレオチドの長さであった。これは、IFN- $\gamma$ の口腔粘膜投与後にマウスの口腔のリンパ組織中でその発現が約5倍増強されることがわかったマウス遺伝子に対応した。

40

#### 【0070】

推定cDNAが真のヒト遺伝子に対応することを確認するために、コンセンサス配列の5'末端と3'末端から得られたプライマーを使用して、ヒト末梢血白血球(PBL)から抽出したmRNAから、特異的逆転写とPCR増幅によりcDNAを合成した。予測され

50

たサイズのユニークな cDNA 断片を得て、クローン化し配列決定した (配列番号 1)。この cDNA の配列は、両方向に 3 回配列決定することにより確認した。このヒト cDNA は、63 ~ 458 位に 396 bp の読みとり枠 (ORF) を含有し、131 アミノ酸 (配列番号 2) をコードする。

【0071】

例 2

IFN- の腹腔内投与

オスの DBA / 2 マウスに、200  $\mu$ l の PBS 中のライフテクノロジーズ社 (Life Technologies Inc.) から購入した 100,000 IU の組換えマウス IFN を腹腔内投与したか、または等量の PBS のみで処理した。4 時間後、頸部脱臼により動物を屠殺し、通常の方法で脾臓を取り出した。チョムクジンスキー (Chomczynski) とサッチ (Sacchi) の方法 (Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) により総 RNA を抽出し、試料当たり 10.0  $\mu$ g の総 RNA を、グリオキサールの存在下でノーザンブロッティングを行い、ダンドイ-ドロ (Dandoy-Dron) ら (J. Biol. Chem. (1998) 273, 7691-7697) が記載したように、HuIFRG15.4 mRNA の cDNA プローブとハイブリダイズさせた。プロットをまず、オートラジオグラフィーに暴露し、次にホスホルマージャー (PhosphorImager) を使用して製造業者の説明書に従って定量した。賦形剤のみで処理した動物と比較して、IFN- 処理動物の脾臓から抽出した RNA の試料では、増強したレベル (約 5 ~ 10 倍) の HuIFRG15.4 タンパク質の mRNA が検出された。

【0072】

例 3

1 型インターフェロン応答性のインビトロの試験

正常ドナーからヒト末梢血単核細胞 (PBMCs) を、フィコール-ヒペーク (Ficoll-Hypaque) 密度勾配を使用して単離し、PBS 中 10,000 IU の組換えヒト IFN- 2 (シェリング-プラウ (Shering-Plough) からのイントロン A) または等量の PBS のみで処理した。8 時間後、細胞を遠心分離 (800  $\times$  g で 10 分) し、細胞ペレットを回収した。上記例 2 に記載のように、チョムクジンスキー (Chomczynski) とサッチ (Sacchi) の方法により細胞ペレットから総 RNA を抽出し、試料当たり 10.0  $\mu$ g の総 RNA を、グリオキサールの存在下でノーザンブロッティングを行い、HuIFRG15.4 mRNA の cDNA プローブとハイブリダイズさせた。PBS のみで処理した動物と比較して、IFN- 処理 PBMCs から抽出した RNA の試料では、増強したレベルの HuIFRG15.4 タンパク質の mRNA (約 3 倍) が検出された。

【0073】

同じ操作を使用して、1 型インターフェロンで処理する予定の患者から取った PBMCs を使用して、1 型インターフェロン応答性を予測してもよい。

【0074】

例 4

HuIFRG15.4 の生物活性の測定

HuIFRG15.4 cDNA を、真の組換えタンパク質および EGF P 融合タンパク質として発現して、このタンパク質の細胞性および亜細胞性局在化を促進した。EGF P タンパク質をコードする遺伝子を、HuIFRG15.4 cDNA の 5' 末端の上流にクローン化した。HuIFRG15.4 cDNA と、HuIFRG15.4-GFP 融合タンパク質をコードする cDNA の両方を、構成性真核生物発現ベクター p cDNA 3.1 と誘導性真核生物発現ベクター p RevTRE 中で発現させた。すなわち、HuIFRG15.4 cDNA、または HuIFRG15.4-GFP 融合タンパク質をコードする cDNA を、製造業者が記載したようにプラスミド p cDNA 3.1-V5/His TOPO (インビトロゲン (Invitrogen)、グロニンゲン (Groninge



n)、オランダ)中にサブクローン化し、これを使用して、製造業者の説明書に従ってスーパーフェクト(Superfect)(キアゲン(Qiagen)、GmbH、ヒルデン(Hilden)、ドイツ)を使用して、ヒトHeLa細胞をトランスフェクションした。簡単に説明すると、EGFP/HuIFRG 15.4融合タンパク質をコードするcDNAを含有するプラスミドpcDNA3.1-V5/HisTOPPOの2 $\mu$ gを、4 $\mu$ gのスーパーフェクト(Superfect)(キアゲン(Qiagen)、GmbH、ヒルデン(Hilden)、ドイツ)と混合し、細胞培養について処理した顕微鏡スライド(ベクトンディッキンソン(Becton Dickinson)、フランクリンレークス(Franklin Lakes)、アメリカ合衆国)上で、10%胎児牛血清(インビトロゲン(Invitrogen)、グロニンゲン(Groningen)、オランダ)を含有するDMEM培地の存在下で、ヒトHeLa細胞と37 $^{\circ}$ Cで12時間接触させた。次に細胞を3回洗浄し、新鮮な培地中に再懸濁し、37 $^{\circ}$ Cでさらに36時間インキュベートした。次に細胞を、オーソパーメアフィクス(Orthopermeafix)(オーソクリニカルダイアグノスティクス(Orthoclinical Diagnostics)、バンクーバー、カナダ)で固定し、核を100ng/mlのヨウ化プロピオジウムで染色し、フルオロモント-G(Fluoromont-G)(サザンバイオテクノロジーズアソシエーツ(Southern Biotechnologies Associates)、アメリカ合衆国)を使用して密封した。次に共焦点顕微鏡(ライカ(Leica))を使用して、蛍光を検出した。EGFG/HuIFRG 15.4融合タンパク質が、トランスフェクションしたHeLa細胞の細胞質全体に発現されていることが証明された。

10

20

30

40

**【0075】**

HuIFRG 15.4 cDNA、またはHuIFRG 15.4-GFP融合タンパク質をコードするcDNAをまた、pRev-TRE(クロンテク(Clontech)、パロアルト(Palo Alto)、カリフォルニア州)にサブクローン化し、次にこれを使用して、製造業者が記載するように、アンフォパック(Amphopack)封入株(クロンテク(Clontech)、パロアルト(Palo Alto)、カリフォルニア州)をトランスフェクションした。次に、レトロウイルスベクターを含有する細胞上清を集め、これを使用して、製造業者が記載するように、HeLa Tet/OnまたはWISH Tet/On標的細胞(クロンテク(Clontech)、パロアルト(Palo Alto)、カリフォルニア州)を連続的に感染させた。アンフォパック(Amphopack)封入株から得られたウイルスで標的細胞を最後に連続感染した2~3日後に、標的細胞をヒグロマイシンで処理し、耐性コロニーを限界希釈により単離した。

**【0076】**

ドキシサイクリンの存在下または非存在下で、未変性のHuIFRG 15.4タンパク質またはHuIFRG 15.4-GFP融合タンパク質の誘導発現が、未変性のHuIFRG 15.4タンパク質またはHuIFRG 15.4-GFP融合タンパク質をコードする遺伝子でトランスフェクションしたヒトHeLa細胞のクローンのアポトーシスを引き起こすことがわかった。簡単に説明すると値フェニルしたHeLa細胞を、1.0 $\mu$ g/mlのデオキシサイクリンの存在下または非存在下で24時間試験し、蛍光活性化細胞ソーター(FACS CALIBUR、ベクトンディッキンソン(Becton Dickinson)、フランクリンレークス(Franklin Lakes)、アメリカ合衆国)でアネキシン(Annexin)V-PE染色(ホスファチジルセリンエクスターナリゼーション)により測定した。

**【0077】**

従って、例えばウイルス感染に対するIFN- $\gamma$ 応答により誘導されるように、細胞中のHuIFRG 15.4の発現は、アポトーシスに至る。従いHuIFRG 15.4は、ウイルスで感染されている細胞中でアポトーシスを引き起こすことにより抗ウイルス作用を有する。

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/062840 A1

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47, C12N 15/12, 5/10, C07K 16/28, A61K 38/17, A61P 31/00, G01N 33/50, C12N 15/11, C12Q 1/68, A01K 67/027, C07K 14/56
- (21) International Application Number: PCT/GB01/02942
- (22) International Filing Date: 29 June 2001 (29.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
0016028.3 29 June 2000 (29.06.2000) GB  
0027089.2 6 November 2000 (06.11.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMA PACIFIC PTY. LTD. [AU/AU]; 103-105 Pipe Road, Laverton North, Victoria 3026 (AU).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): MERITET, Jean-Francois [FR/FR]; 62, rue de Picpus, F-75012 Paris (FR). DRON, Michel [FR/FR]; 22, avenue des Cottages, F-92340 Bourg la Reine (FR). TOVEY, Michael, Gerard [GB/FR]; 7, rue Lagrange, F-75005 Paris (FR).
- (74) Agent: IRVINE, Jonquil, Claire; J.A. Kemp & Co., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SI, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T1, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/062840 A1

(54) Title: INTERFERON- $\alpha$  INDUCED GENE

(57) Abstract: The present invention relates to identification of a gene upregulated by interferon- $\alpha$  administration corresponding to the cDNA sequence set forth in SEQ.ID. No.1. Determination of expression products of this gene is proposed as having utility in predicting responsiveness to treatment with interferon- $\alpha$  and other interferons which act at the Type 1 interferon receptor. Therapeutic use of the protein encoded by the same gene is also envisaged.

**INTERFERON- $\alpha$  INDUCED GENE****Field of the Invention**

The present invention relates to identification of a human gene upregulated by  
5 interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) administration, the coding sequence of which is believed to be  
previously unknown. Detection of expression products of this gene may find use in  
predicting responsiveness to IFN- $\alpha$  and other interferons which act at the Type 1  
interferon receptor. Therapeutic use of the isolated novel protein encoded by the same  
gene is also envisaged.

10

**Background of the Invention**

IFN- $\alpha$  is widely used for the treatment of a number of disorders. Disorders  
which may be treated using IFN- $\alpha$  include neoplastic diseases such as leukemia,  
lymphomas, and solid tumours, AIDS-related Kaposi's sarcoma and viral infections such  
15 as chronic hepatitis. IFN- $\alpha$  has also been proposed for administration via the oromucosal  
route for the treatment of autoimmune, mycobacterial, neurodegenerative, parasitic and  
viral disease. In particular, IFN- $\alpha$  has been proposed, for example, for the treatment of  
multiple sclerosis, leprosy, tuberculosis, encephalitis, malaria, cervical cancer, genital  
herpes, hepatitis B and C, HIV, HPV and HSV-1 and 2. It has also been suggested for the  
20 treatment of arthritis, lupus and diabetes. Neoplastic diseases such as multiple myeloma,  
hairy cell leukemia, chronic myelogenous leukemia, low grade lymphoma, cutaneous T-  
cell lymphoma, carcinoid tumours, cervical cancer, sarcomas including Kaposi's  
sarcoma, kidney tumours, carcinomas including renal cell carcinoma, hepatic cellular  
carcinoma, nasopharyngeal carcinoma, haematological malignancies, colorectal cancer,  
25 glioblastoma, laryngeal papillomas, lung cancer, colon cancer, malignant melanoma and  
brain tumours are also suggested as being treatable by administration of IFN- $\alpha$  via the  
oromucosal route, i.e. the oral route or the nasal route.

IFN- $\alpha$  is a member of the Type 1 interferon family, which exert their  
characteristic biological activities through interaction with the Type 1 interferon  
30 receptor. Other Type 1 interferons include IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  and IFN- $\tau$ .

Unfortunately, not all potential patients for treatment with a Type 1 interferon  
such as interferon- $\alpha$ , particularly, for example, patients suffering from chronic viral

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

2

hepatitis, neoplastic disease and relapsing remitting multiple sclerosis, respond favourably to Type 1 interferon therapy and only a fraction of those who do respond exhibit long-term benefit. The inability of the physician to confidently predict the therapeutic outcome of Type 1 interferon treatment raises serious concerns as to the cost-benefit ratio of such treatment, not only in terms of wastage of an expensive biopharmaceutical and lost time in therapy, but also in terms of the serious side effects to which the patient is exposed. Furthermore, abnormal production of IFN- $\alpha$  has been shown to be associated with a number of autoimmune diseases. For these reasons, there is much interest in identifying Type 1 interferon responsive genes since Type 1 interferons exert their therapeutic action by modulating the expression of a number of genes. Indeed, it is the specific pattern of gene expression induced by Type 1 interferon treatment that determines whether a patient will respond favourably or not to the treatment.

15 **Summary of the Invention**

A human gene cDNA has now been identified as corresponding to a mouse gene upregulated by administration of IFN- $\alpha$  by an oromucosal route or intraperitoneally. The corresponding human gene is thus now also designated an IFN- $\alpha$  upregulated gene.

The protein encoded by the same gene is referred to below as HuIFRG 15.4 protein. This protein, and functional variants thereof, are now envisaged as therapeutic agents, in particular for use as an anti-viral, anti-tumour or immunomodulatory agent. For example, they may be used in the treatment of autoimmune, mycobacterial, neurodegenerative, parasitic or viral disease, arthritis, diabetes, lupus, multiple sclerosis, leprosy, tuberculosis, encephalitis, malaria, cervical cancer, genital herpes, hepatitis B or C, HIV, HPV, HSV-1 or 2, or neoplastic disease such as multiple myeloma, hairy cell leukemia, chronic myelogenous leukemia, low grade lymphoma, cutaneous T-cell lymphoma, carcinoid tumours, cervical cancer, sarcomas including Kaposi's sarcoma, kidney tumours, carcinomas including renal cell carcinoma, hepatic cellular carcinoma, nasopharyngeal carcinoma, haematological malignancies, colorectal cancer, glioblastoma, laryngeal papillomas, lung cancer, colon cancer, malignant melanoma or brain tumours. In other words, such a protein may find use in treating any Type 1 interferon treatable disease.

Determination of the level of HULFRG 15.4 protein or a naturally-occurring variant thereof, or the corresponding mRNA, in cell samples of Type 1 interferon-treated patients, e.g. patients treated with IFN- $\alpha$ , e.g. such as by the oromucosal route or a parenteral route, may also be used to predict responsiveness to such treatment. It has additionally been found that alternatively, and more preferably, such responsiveness may be judged, for example, by treating a sample of human peripheral blood mononuclear cells *in vitro* with a Type 1 interferon and looking for upregulation or downregulation of an expression product, preferably mRNA, corresponding to the HULFRG 15.4 gene.

According to a first aspect of the invention, there is thus provided an isolated polypeptide comprising:

- (i) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2;
- (ii) a variant thereof having substantially similar function, e.g. an immunomodulatory activity and/or an anti-viral activity and/or an anti-tumour activity; or
- (iii) a fragment of (i) or (ii) which retains substantially similar function, e.g. an immunomodulatory activity and/or an anti-viral activity and/or an anti-tumour activity.

The invention also provides such a protein for use in therapeutic treatment of a human or non-human animal, more particularly for use as an anti-viral, anti-tumour or immunomodulatory agent. As indicated above, such use may extend to any Type 1 interferon treatable disease.

According to another aspect of the invention, there is provided an isolated polynucleotide encoding a polypeptide of the invention as defined above or a complement thereof. Such a polynucleotide will typically include a sequence comprising:

- (a) the nucleic acid of SEQ. ID. No. 1 or the coding sequence thereof and/or a sequence complementary thereto;
- (b) a sequence which hybridises, e.g. under stringent conditions, to a sequence complementary to a sequence as defined in (a);
- (c) a sequence which is degenerate as a result of the genetic code to a sequence as defined in (a) or (b);
- (d) a sequence having at least 50% identity to a sequence as defined in (a), (b) or (c).

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

4

The invention also provides;

- an expression vector which comprises a polynucleotide of the invention and which is capable of expressing a polypeptide of the invention;
- a host cell containing an expression vector of the invention;
- 5 - an antibody specific for a polypeptide of the invention;
- a method of treating a subject having a Type 1 interferon treatable disease, which method comprises administering to the said patient an effective amount of HULFPG 15.4 protein or a functional variant thereof
- use of such a polypeptide in the manufacture of a medicament for use in therapy as an anti-viral or anti-tumour or immunomodulatory agent, more particularly for use in treatment of a Type 1 interferon treatable disease;
- 10 - a pharmaceutical composition comprising a polypeptide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent;
- a method of producing a polypeptide of the invention, which method comprises maintaining host cells of the invention under conditions suitable for obtaining expression of the polypeptide and isolating the said polypeptide;
- a polynucleotide of the invention, e.g. in the form of an expression vector, which directs expression *in vivo* of a polypeptide as defined above for use in therapeutic treatment of a human or non-human animal, more particularly for use as an anti-viral, anti-tumour or immunomodulatory agent;
- 20 - a pharmaceutical composition comprising such a polynucleotide and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent;
- a method of treating a subject having a Type 1 interferon treatable disease, which method comprises administering to said patient an effective amount of such a polynucleotide;
- use of such a polynucleotide in the manufacture of a medicament, e.g. a vector preparation, for use in therapy as an anti-viral, anti-tumour or immunomodulatory agent, more particularly for use in treating a Type 1
- 30 interferon treatable disease; and

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

5

a method of identifying a compound having immunomodulatory activity and/or anti-viral activity and/or anti-tumour activity comprising providing a cell capable of expressing HuIFRG 15.4 protein or a naturally occurring variant thereof, incubating said cell with a compound under test and monitoring for upregulation of HuIFRG 15.4 gene expression.

5  
10  
15  
In a still further aspect, the invention provides a method of predicting responsiveness of a patient to treatment with a Type 1 interferon, e.g. IFN- $\alpha$  treatment (such as IFN- $\alpha$  treatment by the oromucosal route or a parenteral route, for example, intravenously, subcutaneously, or intramuscularly), which comprises determining the level of HuIFRG 15.4 protein or a naturally-occurring variant thereof, e.g. an allelic variant, or the corresponding mRNA, in a cell sample from said patient, e.g. a blood sample, wherein said sample is obtained from said patient following administration of a Type 1 interferon, e.g. IFN- $\alpha$  by an oromucosal route or intravenously, or is treated prior to said determining with a Type 1 interferon such as IFN- $\alpha$  *in vitro*. The invention also extends to kits for carrying out such testing.

#### Brief description of the Sequences

SEQ. ID. No.1 is the amino acid sequence of human protein HuIFRG 15.4 and its encoding cDNA.

20 SEQ. ID. No.2 is the amino acid sequence alone of HuIFRG 15.4 protein.

#### Detailed Description of the Invention

As indicated above, human protein HuIFRG 15.4 and functional variants thereof are now envisaged as therapeutically useful agents, more particularly for use as an anti-viral, anti-tumour or immunomodulatory agent.

25  
30  
A variant of HuIFRG 15.4 protein for this purpose may be a naturally occurring variant, either an allelic variant or species variant, which has substantially the same functional activity as HuIFRG 15.4 protein and is also upregulated in response to administration of IFN- $\alpha$ . Alternatively, a variant of HuIFRG 15.4 protein for therapeutic use may comprise a sequence which varies from SEQ. ID. No. 2 but which is a non-natural mutant.

The term "functional variant" refers to a polypeptide which has the same essential character or basic function of HnIFRG 15.4 protein. The essential character of HnIFRG 15.4 protein may be deemed to be as an immunomodulatory peptide. A functional variant polypeptide may show additionally or alternatively anti-viral activity (e.g. apoptosis) and/or anti-tumour activity.

Desired anti-viral activity may, for example, be tested as follows. A sequence encoding a variant to be tested is cloned into a retroviral vector such as a retroviral vector derived from the Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) containing the viral packaging signal  $\psi$ , and a drug-resistance marker. A pantropic packaging cell line containing the viral *gag*, and *pol*, genes is then co-transfected with the recombinant retroviral vector and a plasmid, pVSV-G, containing the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein in order to produce high-titre infectious replication incompetent virus (Burns *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5232-5236). The infectious recombinant virus is then used to transfect interferon sensitive fibroblasts or lymphoblastoid cells and cell lines that stably express the variant protein are then selected and tested for resistance to virus infection in a standard interferon bio-assay (Tovey *et al.*, Nature, 271, 622-625, 1978). Growth inhibition using a standard proliferation assay (Mosmann, T., J. Immunol. Methods, 65, 55-63, 1983) and expression of MHC class I and class II antigens using standard techniques may also be determined.

A desired functional variant of HnIFRG 15.4 may consist essentially of the sequence of SEQ. ID. No. 2. A functional variant of SEQ. ID. No.2 may be a polypeptide which has a least 60% to 70% identity, preferably at least 80% or at least 90% and particularly preferably at least 95%, at least 97% or at least 99% identity with the amino acid sequence of SEQ. ID. No. 2 over a region of at least 20, preferably at least 30, for instance at least 100 contiguous amino acids or over the full length of SEQ. ID. No. 2. Methods of measuring protein identity are well known in the art.

Amino acid substitutions may be made, for example from 1, 2 or 3 to 10, 20 or 30 substitutions. Conservative substitutions may be made, for example according to the following Table. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other.



WO 02/062840

PCT/GB01/02942

7

ALIPHATIC	Non-polar	G A P
		I L V
	Polar-uncharged	C S T M
		N Q
	Polar-charged	D E
		K R
AROMATIC		H F W Y

Variant polypeptide sequences for therapeutic use in accordance with the invention may be shorter polypeptide sequences, for example, a peptide of at least 20 amino acids or up to 50, 60, 70, 80, 100, 150 or 200 amino acids in length is considered to fall within the scope of the invention provided it retains appropriate biological activity of HuIFRG 15.4 protein. In particular, but not exclusively, this aspect of the invention encompasses the situation when the variant is a fragment of a complete natural naturally-occurring protein sequence.

Also encompassed by the invention are modified forms of HuIFRG 15.4 protein and fragments thereof which can be used to raise anti-HuIFRG 15.4 protein antibodies. Such variants will comprise an epitope of the HuIFRG 15.4 protein.

Polypeptides of the invention may be chemically modified, e.g. post-translationally modified. For example, they may be glycosylated and/or comprise modified amino acid residues. They may also be modified by the addition of a sequence at the N-terminus and/or C-terminus, for example by provision of histidine residues or a T7 tag to assist their purification or by the addition of a signal sequence to promote insertion into the cell membrane. Such modified polypeptides fall within the scope of the term "polypeptide" of the invention.

A polypeptide of the invention may be labelled with a revealing label. The revealing label may be any suitable label which allows the polypeptide to be detected. Suitable labels include radioisotopes such as <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S or enzymes, antibodies, polynucleotides and linkers such as biotin. Labelled polypeptides of the invention may be used in assays. In such assays it may be preferred to provide the polypeptide attached

to a solid support. The present invention also relates to such labelled and/or immobilised polypeptides packaged in the form of a kit in a container. The kit may optionally contain other suitable reagent(s), control(s) or instructions and the like.

The polypeptides of the invention may be made synthetically or by recombinant means. Such polypeptides of the invention may be modified to include non-naturally occurring amino acids, e.g. D amino acids. Variant polypeptides of the invention may have modifications to increase stability *in vitro* and/or *in vivo*. When the polypeptides are produced by synthetic means, such modifications may be introduced during production. The polypeptides may also be modified following either synthetic or recombinant production.

A number of side chain modifications are known in the protein modification art and may be present in polypeptides of the invention. Such modifications include, for example, modifications of amino acids by reductive alkylation by reaction with an aldehyde followed by reduction with NaBH<sub>4</sub>, amidination with methylacetimidate or acylation with acetic anhydride.

Polypeptides of the invention will be in substantially isolated form. It will be understood that the polypeptides may be mixed with carriers or diluents which will not interfere with the intended purpose of the polypeptide and still be regarded as substantially isolated. A polypeptide of the invention may also be in substantially purified form, in which case it will generally comprise the polypeptide in a preparation in which more than 90%, for example more than 95%, 98% or 99%, by weight of polypeptide in the preparation is a polypeptide of the invention.

#### Polynucleotides

The invention also includes isolated nucleotide sequences that encode HhFRG 15.4 protein or a variant thereof as well as isolated nucleotide sequences which are complementary thereto. The nucleotide sequence may be DNA or RNA, single or double stranded, including genomic DNA, synthetic DNA or cDNA. Preferably the nucleotide sequence is a DNA sequence and most preferably, a cDNA sequence.

As indicated above, such a polynucleotide will typically include a sequence comprising:

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

9

- (a) the nucleic acid of SEQ. ID. No. 1 or the coding sequence thereof and/or a sequence complementary thereto;
- (b) a sequence which hybridises, e.g. under stringent conditions, to a sequence complementary to a sequence as defined in (a);
- 5 (c) a sequence which is degenerate as a result of the genetic code to a sequence as defined in (a) or (b);
- (d) a sequence having at least 60% identity to a sequence as defined in (a), (b) or (c).

Polynucleotides comprising an appropriate coding sequence can be isolated from human cells or synthesised according to methods well known in the art, as described by way of example in Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Polynucleotides of the invention may include within them synthetic or modified nucleotides. A number of different types of modification to polynucleotides are known in the art. These include methylphosphonate and phosphothioate backbones, addition of acridine or polylysine chains at the 3' and/or 5' ends of the molecule. Such modifications may be carried out in order to enhance the *in vivo* activity or lifespan of polynucleotides of the invention.

Typically a polynucleotide of the invention will include a sequence of nucleotides, which may preferably be a contiguous sequence of nucleotides, which is capable of hybridising under selective conditions to the coding sequence or the complement of the coding sequence of SEQ. ID. No. 1. Such hybridisation will occur at a level significantly above background. Background hybridisation may occur, for example, because of other cDNAs present in a cDNA library. The signal level generated by the interaction between a polynucleotide of the invention and the coding sequence or complement of the coding sequence of SEQ. ID. No. 1 will typically be at least 10 fold, preferably at least 100 fold, as intense as interactions between other polynucleotides and the coding sequence of SEQ. ID. No. 1. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with <sup>32</sup>P. Selective hybridisation may typically be achieved using conditions of low stringency (0.3M sodium chloride and 0.03M sodium citrate at about 40°C), medium stringency (for example, 0.3M sodium

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

10

chloride and 0.03M sodium citrate at about 50°C) or high stringency (for example, 0.03M sodium chloride and 0.03M sodium citrate at about 60°C).

The coding sequence of SEQ ID No: 1 may be modified by nucleotide substitutions, for example from 1, 2 or 3 to 10, 25, 50 or 100 substitutions. Degenerate  
5 substitutions may be made and/or substitutions may be made which would result in a conservative amino acid substitution when the modified sequence is translated, for example as shown in the table above. The coding sequence of SEQ. ID. NO: 1 may alternatively or additionally be modified by one or more insertions and/or deletions and/or by an extension at either or both ends.

10 A polynucleotide of the invention capable of selectively hybridising to a DNA sequence selected from SEQ. ID No.1, the coding sequence thereof and DNA sequences complementary thereto will be generally at least 70%, preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% or 97%, homologous to the target sequence. This homology may typically be over a region of at least 20, preferably at least 30, for  
15 instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides.

Any combination of the above mentioned degrees of homology and minimum sized may be used to define polynucleotides of the invention, with the more stringent combinations (i.e. higher homology over longer lengths) being preferred. Thus for  
20 example a polynucleotide which is at least 80% homologous over 25, preferably over 30 nucleotides forms may be found suitable, as may be a polynucleotide which is at least 90% homologous over 40 nucleotides.

Homologues of polynucleotide or protein sequences as referred to herein may be determined in accordance with well-known means of homology calculation, e.g. protein homology may be calculated on the basis of amino acid identity (sometimes referred to  
25 as "hard homology"). For example the UWGCG Package provides the BESTFIT program which can be used to calculate homology, for example used on its default settings, (Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). The PILEUP and BLAST algorithms can be used to calculate homology or line up sequences or to identify equivalent or corresponding sequences, typically used on their default settings,  
30 for example as described in Altschul S. F. (1993) *J. Mol. Evol.* 36,290-300; Altschul, S. F. *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215,403-10.

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

11

Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length  $W$  in the query sequence that either match or satisfy some positive-valued threshold score  $T$  when aligned with a word of the same length in a database sequence.  $T$  is referred to as the neighbourhood word score threshold (Altschul *et al.*, supra). These initial neighbourhood word hits act as seeds for initiating searches to find HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Extensions for the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity  $X$  from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters  $W$ ,  $T$  and  $X$  determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLAST program uses as defaults a word length ( $W$ ) of 11, the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89,10915-10919) alignments ( $B$ ) of 50, expectation ( $E$ ) of 10,  $M=5$ ,  $N=4$ , and a comparison of both strands.

The BLAST algorithm performs a statistical analysis of the similarity between two sequences; see e.g., Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability ( $P(N)$ ), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a sequence is considered similar to another sequence if the smallest sum probability in comparison of the first sequence to the second sequence is less than about 1, preferably less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

Polynucleotides according to the invention have utility in production of the proteins according to the invention, which may take place *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo*. In such a polynucleotide, the coding sequence for the desired protein of the invention will be operably-linked to a promoter sequence which is capable of directing expression of the desired protein in the chosen host cell. Such a polynucleotide will generally be in the form of an expression vector. Polynucleotides of the invention, e.g. in the form of an

expression vector, which direct expression *in vivo* of a polypeptide of the invention having immunomodulatory activity and/or anti-viral activity and/or anti-tumour activity may also be used as a therapeutic agent.

Expression vectors for such purposes may be constructed in accordance with conventional practices in the art of recombinant DNA technology. They may, for example, involve the use of plasmid DNA. They may be provided with an origin of replication. Such a vector may contain one or more selectable markers genes, for example an ampicillin resistance gene in the case of a bacterial plasmid. Other features of vectors of the invention may include appropriate initiators, enhancers and other elements, such as for example polyadenylation signals which may be desirable, and which are positioned in the correct orientation, in order to allow for protein expression. Other suitable non-plasmid vectors would be apparent to persons skilled in the art. By way of further example in this regard reference is made again to Sambrook *et al.*, 1989 (*supra*). Such vectors additionally include, for example, viral vectors. Examples of suitable viral vectors include herpes simplex viral vectors, replication-defective retroviruses, including lentiviruses, adenoviruses, adeno-associated virus, HPV viruses (such as HPV-16 and HPV-18) and attenuated influenza virus vectors.

Promoters and other expression regulation signals may be selected to be compatible with the host cell for which expression is designed. For example, yeast promoters include *S. cerevisiae* GAL4 and ADH promoters, *S. pombe* *mti* and *adh* promoter. Mammalian promoters include the metallothionein promoter which can be induced in response to heavy metals such as cadmium and  $\beta$ -actin promoters. Viral promoters such as the SV40 large T antigen promoter or adenovirus promoters may also be used. Other examples of viral promoters which may be employed include the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat (MMLV LTR), the rous sarcoma virus (RSV) LTR promoter, the human cytomegalovirus (CMV) IE promoter, and HPV promoters, particularly the HPV upstream regulatory region (URR). Other suitable promoters will be well-known to those skilled in the recombinant DNA art.

An expression vector of the invention may further include sequences flanking the coding sequence for the desired polypeptide of the invention providing sequences homologous to eukaryotic genomic sequences, preferably mammalian genomic sequences, or viral genomic sequences. This will allow the introduction of such

polynucleotides of the invention into the genome of eukaryotic cells or viruses by homologous recombination. In particular, a plasmid vector comprising the expression cassette flanked by viral sequences can be used to prepare a viral vector suitable for delivering the polynucleotides of the invention to a mammalian cell.

5 The invention also includes cells *in vitro*, for example prokaryotic or eukaryotic cells, which have been modified to express the HuIFRG 15.4 protein or a variant thereof. Such cells include stable, e.g. eukaryotic, cell lines wherein a polynucleotide encoding HuIFRG 15.4 protein or a variant thereof is incorporated into the host genome. Host cells of the invention may be mammalian cells or insect cells, lower eukaryotic cells, such as 10 yeast or prokaryotic cells such as bacterial cells. Particular examples of cells which may be modified by insertion of vectors encoding for a polypeptide according to the invention include mammalian HEK293T, CHO, HeLa and COS cells. Preferably a cell line may be chosen which is not only stable, but also allows for mature glycosylation of a polypeptide. Expression may, for example, be achieved in transformed oocytes.

15 A polypeptide of the invention may be expressed in cells of a transgenic non-human animal, preferably a mouse. A transgenic non-human animal capable of expressing a polypeptide of the invention is included within the scope of the invention.

Polynucleotides according to the invention may also be inserted into vectors as described above in an antisense orientation in order to provide for the production of 20 antisense sequences. Antisense RNA or other antisense polynucleotides may also be produced by synthetic means.

A polynucleotide, e.g. in the form of an expression vector, capable of expressing *in vivo* an antisense sequence to a coding sequence for the amino acid sequence defined by SEQ. ID. No. 2, or a naturally-occurring variant thereof, for use in therapeutic 25 treatment of a human or non-human animal is also envisaged as constituting an additional aspect of the invention. Such a polynucleotide will find use in treatment of diseases associated with upregulation of HuIFRG 15.4 protein.

Polynucleotides of the invention extend to sets of primers for nucleic acid amplification which target sequences within the cDNA for a polypeptide of the 30 invention, e.g. pairs of primers for PCR amplification. The invention also provides probes suitable for targeting a sequence within a cDNA or RNA for a polypeptide of the invention which may be labelled with a revealing label, e.g. a radioactive label or a non-

radioactive label such as an enzyme or biotin. Such probes may be attached to a solid support. Such a solid support may be a micro-array (also commonly referred to as nucleic acid, probe or DNA chip) carrying probes for further nucleic acids, e.g. mRNAs or amplification products thereof corresponding to other Type I interferon upregulated genes, e.g. such genes identified as upregulated in response to oromucosal or intravenous administration of IFN- $\alpha$ . Methods for constructing such micro-arrays are well-known (see, for example, EP-B 0476014 and 0619321 of Affymax Technologies N.V. and Nature Genetics Supplement January 1999 entitled "The Chipping Forecast").

The nucleic acid sequence of such a primer or probe will preferably be at least 10, preferably at least 15 or at least 20, for example at least 25, at least 30 or at least 40 nucleotides in length. It may, however, be up to 40, 50, 60, 70, 100 or 150 nucleotides in length or even longer.

Another aspect of the invention is the use of probes or primers of the invention to identify mutations in HULFRG 15.4 genes, for example single nucleotide polymorphisms (SNPs).

As indicated above, in a still further aspect the present invention provides a method of identifying a compound having immunomodulatory activity and/or antiviral activity and/or anti-tumour activity comprising providing a cell capable of expressing HULFRG 15.4 protein or a naturally-occurring variant thereof, incubating said cell with a compound under test and monitoring for upregulation of HULFRG 15.4 gene expression. Such monitoring may be by probing for mRNA encoding HULFRG 15.4 protein or a naturally-occurring variant thereof. Alternatively antibodies or antibody fragments capable of specifically binding one or more of HULFRG 15.4 and naturally-occurring variants thereof may be employed.

25

#### Antibodies

According to another aspect, the present invention also relates to antibodies (for example polyclonal or preferably monoclonal antibodies, chimeric antibodies, humanised antibodies and fragments thereof which retain antigen-binding capability) which have been obtained by conventional techniques and are specific for a polypeptide of the invention. Such antibodies could, for example, be useful in purification, isolation or screening methods involving immunoprecipitation and may be used as tools to further

30



WO 02/062840

PCT/GB01/02942

15

elucidate the function of HulfRG 15.4 protein or a variant thereof. They may be therapeutic agents in their own right. Such antibodies may be raised against specific epitopes of proteins according to the invention. An antibody specifically binds to a protein when it binds with high affinity to the protein for which it is specific but does not  
5 bind or binds with only low affinity to other proteins. A variety of protocols for competitive binding or immunoradiometric assays to determine the specific binding capability of an antibody are well-known.

#### Pharmaceutical compositions

10 A polypeptide of the invention is typically formulated for administration with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The pharmaceutical carrier or diluent may be, for example, an isotonic solution. For example, solid oral forms may contain, together with the active compound, diluents, e.g. lactose, dextrose, saccharose, cellulose, corn starch or potato starch; lubricants, e.g. silica, talc, stearic acid, magnesium or  
15 calcium stearate, and/or polyethylene glycols; binding agents, e.g. starches, arabic gums, gelatin, methyl cellulose, carboxymethylcellulose or polyvinyl pyrrolidone; desegregating agents, e.g. starch, alginic acid, alginates or sodium starch glycolate; effervescent mixtures; dyestuffs; sweeteners; wetting agents, such as lecithin, polysorbates, laurylsulphates; and, in general, non-toxic and pharmacologically inactive  
20 substances used in pharmaceutical formulations. Such pharmaceutical preparations may be manufactured in known manner, for example, by means of mixing, granulating, tableting, sugar-coating, or film coating processes.

Liquid dispersions for oral administration may be syrups, emulsions and suspensions. The syrups may contain as carriers, for example, saccharose or saccharose  
25 with glycerine and/or mannitol and/or sorbitol.

Suspensions and emulsions may contain as carrier, for example a natural gum, agar, sodium alginate, pectin, methyl cellulose, carboxymethylcellulose, or polyvinyl alcohol. The suspensions or solutions for intramuscular injections may contain, together  
30 with the active compound, a pharmaceutically acceptable carrier, e.g. sterile water, olive oil, ethyl oleate, glycols, e.g. propylene glycol, and if desired, a suitable amount of lidocaine hydrochloride.

Solutions for intravenous administration or infusions may contain as carrier, for example, sterile water or preferably they may be in the form of sterile, aqueous, isotonic saline solutions.

A suitable dose of HuIFRG 15.4 protein or a functional analogue thereof for use  
5 in accordance with the invention may be determined according to various parameters, especially according to the substance used; the age, weight and condition of the patient to be treated; the route of administration; and the required regimen. Again, a physician will be able to determine the required route of administration and dosage for any particular patient. A typical daily dose may be from about 0.1 to 50 mg per kg, preferably from  
10 about 0.1mg/kg to 10mg/kg of body weight, according to the activity of the specific inhibitor, the age, weight and condition of the subject to be treated, and the frequency and route of administration. Preferably, daily dosage levels may be from 5 mg to 2 g.

A polynucleotide of the invention suitable for therapeutic use will also typically be formulated for administration with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.  
15 Such a polynucleotide may be administered by any known technique whereby expression of the desired polypeptide can be attained *in vivo*. For example, the polynucleotide may be introduced by injection, preferably intradermally, subcutaneously or intramuscularly. Alternatively, the nucleic acid may be delivered directly across the skin using a particle-mediated delivery device. A polynucleotide of the invention suitable for therapeutic  
20 nucleic acid may alternatively be administered to the oromucosal surface for example by intranasal or oral administration.

A non-viral vector of the invention suitable for therapeutic use may, for example, be packaged into liposomes or into surfactant containing vector delivery particles. Uptake of nucleic acid constructs of the invention may be enhanced by several known  
25 transfection techniques, for example those including the use of transfection agents. Examples of these agents include cationic agents, for example calcium phosphate and DEAE dextran and lipofectants, for example lipofectam and transfectam. The dosage of the nucleic acid to be administered can be varied. Typically, the nucleic acid will be administered in the range of from 1pg to 1mg, preferably from 1pg to 10 $\mu$ g nucleic acid  
30 for particle-mediated gene delivery and from 10 $\mu$ g to 1 mg for other routes.

Prediction of Type 1 interferon responsiveness

As also indicated above, in a still further aspect the present invention provides a method of predicting responsiveness of a patient to treatment with a Type 1 interferon, e.g. IFN- $\alpha$  treatment such as IFN- $\alpha$  treatment by an oromucosal route or intravenously, which comprises determining the level of HuIFRG 15.4 protein or a naturally-occurring variant thereof, or the corresponding mRNA, in a cell sample from said patient, wherein said sample is taken from said patient following administration of a Type 1 interferon or is treated prior to said determining with a Type 1 interferon *in vitro*.

Preferably, the Type 1 interferon for testing responsiveness will be the Type 1 interferon selected for treatment. It may be administered by the proposed treatment route and at the proposed treatment dose. Preferably, the subsequent sample analysed may be, for example, a blood sample or a sample of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from a blood sample.

More conveniently and preferably, a sample obtained from the patient comprising PBMCs isolated from blood may be treated *in vitro* with a Type 1 interferon, e.g. at a dosage range of about 1 to 10,000 IU/ml. Such treatment may be for a period of hours, e.g. about 7 to 8 hours. Preferred treatment conditions for such *in vitro* testing may be determined by testing PBMCs taken from normal donors with the same interferon and looking for upregulation of an appropriate expression product. Again, the Type 1 interferon employed will preferably be the Type 1 interferon proposed for treatment of the patient, e.g. recombinant IFN- $\alpha$ . PBMCs for such testing may be isolated in conventional manner from a blood sample using Ficoll-Hypaque density gradients. An example of a suitable protocol for such *in vitro* testing of Type 1 interferon responsiveness is provided in Example 3 below.

The sample, if appropriate after *in vitro* treatment with a Type 1 interferon, may be analysed for the level of HuIFRG 15.4 protein or a naturally-occurring variant thereof. This may be done using an antibody or antibodies capable of specifically binding one or more of HuIFRG 15.4 protein and naturally-occurring variants thereof, e.g. allelic variants thereof. Preferably, however, the sample will be analysed for mRNA encoding HuIFRG 15.4 protein or a naturally-occurring variant thereof. Such mRNA analysis may employ any of the techniques known for detection of mRNAs, e.g. Northern blot detection or mRNA differential display. A variety of known nucleic acid amplification

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

18

protocols may be employed to amplify any mRNA of interest present in the sample, or a portion thereof, prior to detection. The mRNA of interest, or a corresponding amplified nucleic acid, may be probed for using a nucleic acid probe attached to a solid support. Such a solid support may be a micro-array as previously discussed above carrying probes to determine the level of further mRNAs or amplification products thereof corresponding to Type 1 interferon upregulated genes, e.g. such genes identified as upregulated in response to oromucosal or intravenous administration of IFN- $\alpha$ .

The following examples illustrate the invention:

10

#### Examples

##### Example 1

15 Previous experiments had shown that the application of 5  $\mu$ l of crystal violet to each nostril of a normal adult mouse using a P20 Eppendorf micropipette resulted in an almost immediate distribution of the dye over the whole surface of the oropharyngeal cavity. Staining of the oropharyngeal cavity was still apparent some 30 minutes after application of the dye. These results were confirmed by using  $^{125}$ I-labelled recombinant human IFN- $\alpha$ 1-8 applied in the same manner. The same method of administration was employed to effect oromucosal administration in the studies which are described below.

20 Six week old, male DBA/2 mice were treated with either 100,000 IU of recombinant murine interferon  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) purchased from Life Technologies Inc, in phosphate buffered saline (PBS), 10 $\mu$ g of recombinant human interleukin 15 (IL-15) purchased from Protein Institute Inc, PBS containing 100  $\mu$ g/ml of bovine serum albumin (BSA), or left untreated. Eight hours later, the mice were sacrificed by cervical dislocation and the lymphoid tissue was removed surgically from the oropharyngeal cavity and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. RNA was extracted from the lymphoid tissue by the method of Chomczynski and Sacchi 1987, (Anal. Biochem. 162, 156-159) and subjected to mRNA Differential Display Analysis (Lang, P. and Pardee, A.B., Science, 257, 967-971).

#### Differential Display Analysis

Differential display analysis was carried out using the "Message Clean" and "RNA image" kits of the GenHunter Corporation essentially as described by the manufacturer. Briefly, RNA was treated with RNase-free DNase, and 1 µg was reverse-transcribed in 100 µl of reaction buffer using either one or the other of the three one-base anchored oligo-(dT) primers A, C, or G. RNA was also reverse-transcribed using one or the other of the 9 two-base anchored oligo-(dT) primers AA, CC, GG, AC, CA, GA, AG, CG, GC. All the samples to be compared were reverse transcribed in the same experiment, separated into aliquots and frozen. The amplification was performed with only 1 µl of the reverse transcription sample in 10 µl of amplification mixture containing *Taq* DNA polymerase and  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP (3,000 Ci/mmol). Eighty 5' end (HAP) random sequence primers were used in combination with each of the (HTT) A, C, G, AA, CC, GG, AC, CA, GA, AG, CG or GC primers. Samples were then run on 7% denaturing polyacrylamide gels and exposed to autoradiography. Putative differentially expressed bands were cut out, reamplified according to the instructions of the supplier, and further used as probes to hybridize Northern blots of RNA extracted from the oropharyngeal cavity of IFN treated, IL-15 treated, and excipient treated animals.

#### Cloning and Sequencing

Re-amplified bands from the differential display screen were cloned in the *Sfr* 1 site of the pPCR-Script SK(+) plasmid (Stratagene) and cDNAs amplified from the rapid amplification of cDNA ends were isolated by TA cloning in the pCR3 plasmid (Invitrogen). DNA was sequenced using an automatic di-deoxy sequencer (Perkin Elmer ABI PRISM 377).

#### Isolation of Human cDNA

Differentially expressed murine 3' sequences identified from the differential display screen were compared with random human expressed sequence tags (EST) present in the dbEST database of GenBank™ of the United States National Center for Biotechnology Information (NCBI). The sequences potentially related to the murine EST isolated from the differential display screen were combined in a contig and used to construct a human consensus sequence corresponding to a putative cDNA. One such

20

cDNA was found to be 556 nucleotides in length. This corresponded to a mouse gene whose expression was found to be enhanced approximately 5-fold in the lymphoid tissue of the oral cavity of mice following oromucosal administration of IFN- $\alpha$ .

In order to establish that this putative cDNA corresponded to an authentic human gene, primers derived from the 5' and 3' ends of the consensus sequence were used to synthesise cDNA from mRNA extracted from human peripheral blood leukocytes (PBL) by specific reverse transcription and PCR amplification. A unique cDNA fragment of the predicted size was obtained, cloned and sequenced (SEQ. ID. No.1). The sequence of this cDNA was confirmed by sequencing three times in both directions. This human cDNA contains an open reading frame (ORF) of 396 bp in length at positions 63-458 encoding a protein of 131 amino acids (SEQ. ID. No. 2).

#### Example 2

##### Intraperitoneal administration of IFN- $\alpha$

Male DBA/2 mice were injected intraperitoneally with 100,000 IU of recombinant murine IFN- $\alpha$  purchased from Life Technologies Inc. in 200  $\mu$ l of PBS or treated with an equal volume of PBS alone. Four hours later the animals were sacrificed by cervical dislocation and the spleen was removed using conventional procedures. Total RNA was extracted by the method of Chomczynski and Sacchi (Anal. Biochem. (1987) 162,156-159) and 10.0  $\mu$ g of total RNA per sample was subjected to Northern blotting in the presence of glyoxal and hybridised with a cDNA probe for HULPRG 15.4 mRNA as described by Dandoy-Dron et al.(J. Biol. Chem. (1998) 273, 7691-7697). The blots were first exposed to autoradiography and then quantified using a PhosphorImager according to the manufacturer's instructions. Enhanced levels of mRNA for HULPRG 15.4 protein (approximately 10 fold) were detected in samples of RNA extracted from spleens of IFN- $\alpha$  treated animals relative to animals treated with excipient alone.

#### Example 3

##### Testing Type 1 interferon responsiveness *in vitro*

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from normal donors were isolated on Ficoll-Hypaque density gradients and treated *in vitro* with 10,000 IU of recombinant human IFN- $\alpha$ 2 (Intron A from Schering-Plough) in PBS or with an equal

volume of PBS alone. Eight hours later the cells were centrifuged (800 x g for 10 minutes) and the cell pellet recovered. Total RNA was extracted from the cell pellet by the method of Chomczynski and Sacchi and 10.0 µg of total RNA per sample was subjected to Northern blotting in the presence of glyoxal and hybridised with a cDNA probe for HuIFRG 15.4 mRNA as previously described in Example 2 above. Enhanced levels of mRNA for HuIFRG 15.4 protein (approximately 3-fold) were detected in samples of RNA extracted from IFN-α treated PBMCs compared to samples treated with PBS alone.

The same procedure may be used to predict Type 1 interferon responsiveness using PBMCs taken from a patient proposed to be treated with a Type 1 interferon.

#### Example 4

##### Determination of the Biological Activity of HuIFRG 15.4

The HuIFRG 15.4 cDNA was expressed both as the authentic recombinant protein and as an EGFP fusion protein to facilitate cellular and sub-cellular localisation of the protein. The gene encoding the EGFP protein was cloned upstream of the 5' terminus of the HuIFRG 15.4 cDNA. HuIFRG 15.4 cDNA and a cDNA encoding the HuIFRG 15.4-GFP fusion protein were both expressed in the constitutive eucaryotic expression vector pcDNA 3.1 and the inducible eucaryotic expression vector pRevTRE. Thus, the HuIFRG 15.4 cDNA or a cDNA encoding the HuIFRG 15.4-GFP fusion protein was subcloned into plasmid pcDNA 3.1-V5/HisTOPO (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) as described by the manufacturer, and used to transfect human HeLa cells using Superfect (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturers instructions. Briefly, 2 µg of plasmid pcDNA 3.1-V5/HisTOPO containing the cDNA encoding the EGFP/HuIFRG 15.4 fusion protein was mixed with 4µg of Superfect (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) and left in contact with Human HeLa cells for 12 hours at 37°C in the presence of DMEM medium containing 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), on microscope slides treated for cell culture (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). The cells were then washed three times, resuspended in fresh medium and incubated for a further 36 hours at 37°C. Cells were then fixed with Orthopermeafix (Orthoclinical Diagnostics, Vancouver, Canada), the nuclei were stained with 100 ng/ml of propidium iodide, and the slides sealed using

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

22

Fluoromont-G (Southern Biotechnologies Associates, USA). Fluorescence was then detected using a confocal microscope (Leica). The EGFP/HuIFRG 15.4 fusion protein was shown to be expressed throughout the cytoplasm of transfected HeLa cells.

The HuIFRG 15.4 cDNA or a cDNA encoding the HuIFRG 15.4-GFP fusion protein were also subcloned into pRev-TRE (Clontech, Palo Alto, CA, USA) which was then used to transfect the Amphopack encapsidation line (Clontech, Palo Alto, CA, USA) as described by the manufacturer. The cell supernatant containing the retroviral vector was then collected and used to serially infect the HeLa Tet/On or WISH Tet/On target cells (Clontech, Palo Alto, CA, USA) as described by the manufacturer. Two to three days after the last serial infection of the target cells with virus derived from the Amphopack cell line the target cells were treated with hygromycin and resistant clones were isolated by limiting dilution.

Induced expression of the native HuIFRG 15.4 protein or the HuIFRG 15.4-GFP fusion protein in the presence or absence of doxycycline, was found to cause the apoptosis of clones of human HeLa cells transfected with the gene encoding either the native HuIFRG 15.4 protein or the HuIFRG 15.4-GFP fusion protein. Briefly, transfected HeLa cells were treated for 24 hours in the presence or absence of 1.0 µg/ml of doxycycline and the extent of apoptosis was determined by Annexin V-PE staining (phosphatidylserine externalisation) in a fluorescent activated cell sorter (FACS CALIBUR, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Expression of HuIFRG 15.4 in a cell, for example as induced by an IFN-α response to viral infection, may therefore lead to apoptosis. HuIFRG 15.4 may therefore have an anti-viral effect by causing apoptosis in cells that have been infected by a virus.



CLAIMS

1. An isolated polypeptide comprising
  - (i) the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2;
  - 5 (ii) a variant thereof having substantially similar function selected from immunomodulatory activity and/or anti-viral activity and/or anti-tumour activity; or
  - (iii) a fragment of (i) or (ii) which retains substantially similar function selected from immunomodulatory activity and/or anti-viral activity and/or
  - 10 anti-tumour activity.
2. A variant or fragment of the polypeptide defined by the amino acid sequence set forth in SEQ. ID. No. 2 suitable for raising specific antibodies for said polypeptide and/or a naturally-occurring variant thereof.
3. A polynucleotide encoding a polypeptide as claimed in claim 1 or 2.
- 15 4. A polynucleotide as claimed in claim 3 which is a cDNA.
5. A polynucleotide encoding a polypeptide as claimed in claim 1, which polynucleotide comprises:
  - (a) the nucleic acid sequence of SEQ ID NO: 1 or the coding sequence thereof and/or a sequence complementary thereto;
  - 20 (b) a sequence which hybridises to a sequence as defined in (a);
  - (c) a sequence that is degenerate as a result of the genetic code to a sequence as defined in (a) or (b); or
  - (d) a sequence having at least 60% identity to a sequence as defined in (a), (b) or (c).
- 25 6. An expression vector comprising a polynucleotide sequence as claimed in any one of claims 3 to 5, which is capable of expressing a polypeptide according to claim 1 or 2.
7. A host cell containing an expression vector according to claim 6.
8. An antibody specific for a polypeptide as claimed in claim 1 or claim 2.
- 30 9. An isolated polynucleotide which directs expression *in vivo* of a polypeptide as claimed in claim 1.
10. A polypeptide as claimed in claim 1 or a polynucleotide as claimed in claim 9 for use in therapeutic treatment of a human or non-human animal.

11. A pharmaceutical composition comprising a polypeptide as claimed in claim 1 or a polynucleotide as claimed in claim 9 and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
12. Use of a polypeptide as claimed in claim 1 or a polynucleotide as claimed in claim 9 in the preparation of medicament for use in therapy as an anti-viral, anti-tumour or immunomodulatory agent.
13. A method of treating a patient having a Type 1 interferon treatable disease, which comprises administering to said patient an effective amount of a polypeptide as claimed in claim 1 or a polynucleotide as claimed in claim 9.
14. A method of producing a polypeptide according to claim 1 or 2, which method comprises culturing host cells as claimed in claim 7 under conditions suitable for obtaining expression of the polypeptide and isolating the said polypeptide.
15. A method of identifying a compound having immunomodulatory activity and/or anti-viral activity and/or anti-tumour activity comprising providing a cell capable of expressing the polypeptide of SEQ. ID. No. 2 or a naturally-occurring variant thereof, incubating said cell with a compound under test and monitoring for upregulation of the gene encoding said polypeptide or variant.
16. A polynucleotide capable of expressing *in vivo* an antisense sequence to a coding sequence for the amino acid sequence defined by SEQ. ID. No. 2 or a naturally-occurring variant of said coding sequence for use in therapeutic treatment of a human or non-human animal.
17. An antibody as claimed in claim 8 for use in therapeutic treatment.
18. A set of primers for nucleic acid amplification which target sequences within a cDNA as claimed in claim 4.
19. A nucleic acid probe derived from a polynucleotide as claimed in any one of claims 3 to 5.
20. A probe as claimed in claim 19 which is attached to a solid support.
21. A method of predicting responsiveness of a patient to treatment with a Type 1 interferon, which comprises determining the level of the protein defined by the amino acid sequence set forth in SEQ. ID. No. 2 or a naturally-occurring variant thereof, or the corresponding mRNA, in a cell sample from said patient, wherein said sample is

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

25

obtained from said patient following administration of a Type 1 interferon or is treated prior to said determining with a Type 1 interferon *in vitro*.

22. A method as claimed in claim 21 wherein the interferon administered prior to obtaining said sample or used to treat said sample *in vitro* is the interferon  
5 proposed for treatment of said patient.

23. A method as claimed in claim 21 or claim 22 wherein a sample comprising peripheral blood mononuclear cells isolated from a blood sample of the patient is treated with a Type 1 interferon *in vitro*.

24. A method as claimed in any one of claims 21 to 23 wherein said  
10 determining comprises determining the level of mRNA encoding the protein defined by the sequence set forth in SEQ. ID. No. 2 or a naturally-occurring variant of said protein.

25. A non-human transgenic animal capable of expressing a polypeptide that is claimed in claim 1.

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

1

## SEQUENCE LISTING

<110> PHARMA PACIFIC PTY. LTD.

5 <120> INTERFERON-ALPHA INDUCED GENE

<130> N60003B JCI

<140>

10 <141>

<150> GB 0016028.3

<151> 2000-06-29

15 <150> GB 0027089.2

<151> 2000-11-06

<160> 2

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 556

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (63)..(488)

30 <400> 1

tctctctgtc actgttgtct ctgtctgtca cattgtgttc tgtattgtct ttttaggtcc 60

ag atg ttt tca gat aat tca cat tgc cct gat tgt ggc caa cag tgg 107

35 Met Phe Ser Asp Asn Ser His Cys Pro Asp Cys Gly Gln Gln Trp

1 6 10 15

ttc cct agt tta gaa cta ggc cac tgg tta tac caa act gaa ctt gtt 155

40 Phe Pro Ser Leu Glu Leu Gly His Trp Leu Tyr Gln Thr Glu Leu Val

20 25 30

gaa aat gaa tgt tac cag gta ttc tta gac cgt att aac aga gct gat 203

45 Glu Asn Glu Cys Tyr Gln Val Phe Leu Asp Arg Ile Asn Arg Ala Asp

35 40 45

tat tgt cct gag tgt tat cct gat aat cct gct aat aga agc ctt gtt 251

50 Tyr Cys Pro Glu Cys Tyr Pro Asp Asn Pro Ala Asn Arg Ser Leu Val

50 55 60

ctt cct tgg tct ttc cca ctt gag tgg gct ccc cag aat ctc acc aga 299

55 Leu Pro Trp Ser Phe Pro Leu Glu Trp Ala Pro Gln Asn Leu Thr Arg

65 70 75

tgg acc ttt gag aaa gct tgc cat cca ttt ctt ctg ggt cct cca ctg 347

55 Trp Thr Phe Glu Lys Ala Cys His Pro Phe Leu Leu Gly Pro Pro Leu

80 85 90 95

WO 02/062840

PCT/GB01/02942

2

```

gtt aga aaa aga ata cat gac tct cga gta gct ggt ttt aac cct gca 395
Val Arg Lys Arg Ile His Asp Ser Arg Val Ala Gly Phe Asn Pro Ala
100 105 110
5
tta cag tta atc ctg acc aga aca gat aaa acc tta aac aaa aaa ctg 443
Leu Gln Leu Ile Leu Thr Arg Thr Asp Lys Thr Leu Asn Lys Lys Leu
115 120 125
10
ggc caa aac aaa tag ctctataat agtcaaaatt gtcaagtcta gaggcttttg 498
Gly Gln Asn Lys
130
15
cgtaggtagc ccaaggeaga tggaaaata attcatttct aagctgacc cagattga 536

<210> 2
20 <211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
25 Met Phe Ser Asp Asn Ser His Cys Pro Asp Cys Gly Gln Gln Trp Phe
1 5 10 15
Pro Ser Leu Glu Leu Gly His Trp Leu Tyr Gln Thr Glu Leu Val Glu
20 25 30
30 Asn Glu Cys Tyr Gln Val Phe Leu Asp Arg Ile Asn Arg Ala Asp Tyr
35 40 45
Cys Pro Glu Cys Tyr Pro Asp Asn Pro Ala Asn Arg Ser Leu Val Leu
50 55 60
35 Pro Trp Ser Phe Pro Leu Glu Trp Ala Pro Gln Asn Leu Thr Arg Trp
65 70 75 80
40 Thr Phe Glu Lys Ala Cys His Pro Phe Leu Leu Gly Pro Pro Leu Val
85 90 95
Arg Lys Arg Ile His Asp Ser Arg Val Ala Gly Phe Asn Pro Ala Leu
100 105 110
45 Gln Leu Ile Leu Thr Arg Thr Asp Lys Thr Leu Asn Lys Lys Leu Gly
115 120 125
50 Gln Asn Lys
130

```

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Ap: PCT/88 01702942
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/28 A61K38/17 A61P31/00 G01N33/50 C12N15/11 C12Q1/68 A01K67/027 C07K14/56		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, MPI Data, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, EMBL, CHEM ABS Dat		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Accession Number BE094215, 23 June 2000 (2000-06-23) DIAS NIETO E, ET AL.: "PM3-BT0761-070500-002-d09 BT0761 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence." XP002181973	3-7,9, 19,20
Y	the whole document -> DIAS NIETO E, ET AL.: "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags." PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 97, no. 7, 28 March 2000 (2000-03-28), pages 3491-3496, XP000996193 the whole document --- --/--	16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority claim date "T" later document published after the international filing date or priority date and free to consult with the applicant but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 December 2001		Date of mailing of the international search report 06.12.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patent Plaza 2 NL - 2500 RB The Hague Tel: (+31-70) 546-2000, Tx: 91 851 epo nl, Fax: (+31-70) 546-0918		Authorized officer Armandola, E

Form PCT/88AQ10 (Revised Sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International
PCT/GB 01702942

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Accession Number BE094182, 23 June 2000 (2000-06-23) DIAS NIETO E. ET AL.: "PM3-Bt0761-100400-001-e12 BT0761 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence." XP002181974	3-7,9, 19,20
Y	the whole document -& DIAS NIETO E. ET AL.: "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags." PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 97, no. 7, 28 March 2000 (2000-03-28), page 3491-3496 XP000996193	16
X	--- DATABASE EMBL [Online] Accession Number AL359853, 28 June 2000 (2000-06-28) COVILLE G.: "Human sequence from clone RP11-12N5 on chromosome 1." XP002181975	3,5
Y	the whole document	4
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] Accession Number AJ299406, 16 October 2000 (2000-10-16) DRON H.: "Homo sapiens mRNA for IFRG15 protein." XP002181976	1-7,19, 20
Y	the whole document	
Y	US 5 834 235 A (RICH STEVEN A ET AL) 10 November 1998 (1998-11-10) the whole document	1-11,14, 17,21-24
Y	--- EP 0 242 329 A (CIBA GEIGY AG) 21 October 1987 (1987-10-21) the whole document	1-17, 19-24
Y	--- WO 87 00864 A (STAENELI PETER) 12 February 1987 (1987-02-12) the whole document	1-17, 19-24
X	-----	25

6

Form PCT/ISA210 (continuation of annexed sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International PCT/GB 01/02942
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 12, 13, 16, 17 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p>
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: 18 (complete), 1-4, 6-14, 19, 20 and 25 (partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p>
3.	<input type="checkbox"/>	<p>Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).</p>
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
The International Searching Authority found multiple inventions in the international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 01/02942

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18 (complete), 1-4, 6-14, 19, 20 and 25 (partially)

Present claims 1-4, 6-14 and 18-20 relate to an extremely large number of possible fragments, primers and probes, namely all the possible fragments of at least 8-10 nucleotides and of at least 6 amino acids which can be derived from SEQ. ID. NO: 1 and 2, respectively. A meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been limited to a sequence comparison of the full-length SEQ. ID. NO: 1 and 2 with DNA and protein databases. This kind of search covers only part of the subject-matter encompassed by claims 1-4, 6-14, 19, 20 and 25, as short sequences which might also be useful for raising antibodies, serve as probes or be useful for therapy, may not be identified in such a search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Ap				
PCT/GB 01/02942				
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5834235	A	10-11-1998	US 6060279 A	09-05-2000
EP 0242329	A	21-10-1987	AT 125304 T	15-08-1995
			AU 608216 B2	28-03-1991
			AU 7151087 A	22-10-1987
			CA 1340289 A1	29-12-1998
			DE 3751409 D1	24-08-1995
			DE 3751409 T2	25-01-1996
			DK 193187 A	16-10-1987
			EP 0242329 A2	21-10-1987
			ES 2074420 T3	16-09-1995
			IE 67564 B1	17-04-1996
			JP 2572956 B2	16-01-1997
			JP 7236497 A	12-09-1995
			JP 2107176 C	06-11-1996
			JP 8022880 B	06-03-1996
			JP 62270599 A	24-11-1987
			PT 84670 A ,B	01-05-1987
			US 5466585 A	14-11-1995
			US 5739290 A	14-04-1998
			US 5198350 A	30-03-1993
			US 5869264 A	09-02-1999
WO 8700864	A	12-02-1987	EP 0231374 A1	12-08-1987
			JP 63560800 T	24-03-1988
			WO 8700864 A1	12-02-1987

From PCT/GB01/02942 (patent family member 1/182)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 メリテ、ジャン - フランソワ  
フランス国 パリ、リュ デ ピクピユ、6 2

(72) 発明者 ドロン、ミシェル  
フランス国 ブール ラ レーヌ、アブニュ デ コテッジ、2 2

(72) 発明者 トヴェイ、ミハエル、ジェラルド  
フランス国 パリ、リュ ラグランジェ、7

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CA25 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12 DA02 DA03  
EA04 GA11 GA18 HA03 HA08 HA12 HA14  
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA12  
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ20 QQ53 QR08 QR32 QR41 QR42 QR55  
QR59 QR66 QR69 QR77 QR82 QS10 QS12 QS25 QS34 QS39  
QX02  
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01 DA05 DA13 DA14 DA15  
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA21 BA23 MA01  
NA14 ZA012 ZA752 ZA812 ZA962 ZB032 ZB052 ZB072 ZB112 ZB212  
ZB262 ZB272 ZB322 ZB332 ZB352 ZB372 ZC352

4C085 AA13 AA14 CC32 EE01 GG01

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA75  
ZA81 ZA96 ZB03 ZB05 ZB07 ZB11 ZB21 ZB26 ZB27 ZB32  
ZB33 ZB35 ZB37 ZC35

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA28  
EA29 EA50