



Office de la Propriété

Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

CA 2451874 C 2013/07/30

(11)(21) **2 451 874**

(12) **BREVET CANADIEN**
CANADIAN PATENT

(13) **C**

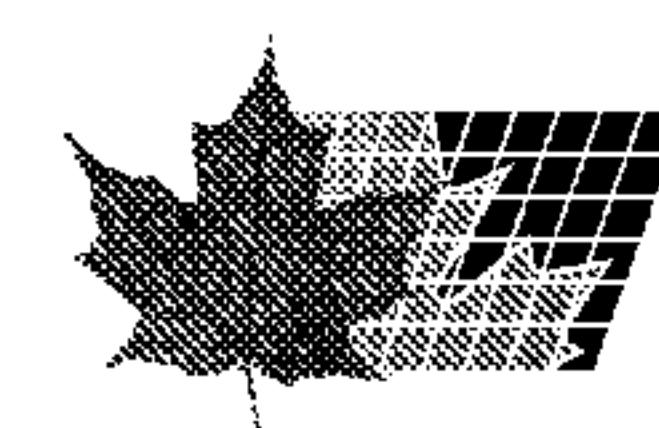
(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2002/06/14
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/12/27
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2013/07/30
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/12/12
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2002/002067
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/103014
(30) Priorité/Priority: 2001/06/14 (FR0107805)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/11* (2006.01),
A61K 31/7088 (2006.01), *A61P 9/00* (2006.01),
A61K 38/00 (2006.01)
(72) Inventeur/Inventor:
AL-MAHMOOD, SALMAN, IQ
(73) Propriétaire/Owner:
GENE SIGNAL INTERNATIONAL SA, CH
(74) Agent: GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) Titre : OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS CAPABLES D'INHIBER LA FORMATION DES TUBES CAPILLAIRES PAR
DES CELLULES ENDOTHELIALES
(54) Title: ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES WHICH CAN INHIBIT THE FORMATION OF CAPILLARY TUBES BY
ENDOTHELIAL CELLS

(57) Abrégé/Abstract:

La présente invention a pour objet des compositions pharmaceutiques pour inhiber la formation de tubes capillaires par les cellules endothéliales, comprenant au moins un oligonucléotide capable d'inhiber l'expression de la protéine IRS-1. Les oligonucléotides selon l'invention sont indiqués comme agents anti-angiogéniques. Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont particulièrement utiles pour le traitement de pathologies liées à l'angiogénèse.



**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
27 décembre 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/103014 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/11, A61K 31/7088, A61P 9/00

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02067

(22) Date de dépôt international : 14 juin 2002 (14.06.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (regional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0107805 14 juin 2001 (14.06.2001) FR

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant et
(72) Inventeur : **AL-MAHMOOD, Salman** [FR/FR]; 2, square Alice, F-75014 Paris (IQ).

(74) Mandataires : **BREESE, Pierre** etc.; Breesé-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,



(54) Title: ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES WHICH CAN INHIBIT THE FORMATION OF CAPILLARY TUBES BY ENDOTHELIAL CELLS

WO 02/103014 A2

(54) Titre : OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS CAPABLES D'INHIBER LA FORMATION DES TUBES CAPILLAIRES PAR DES CELLULES ENDOTHELIALES

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutical compositions which inhibit the formation of capillary tubes by endothelial cells, comprising at least one oligonucleotide which can inhibit the expression of the IRS-1 protein. According to the invention, the oligonucleotides are embodied as anti-angiogenesis agents. Said pharmaceutical compositions are particularly useful in treating angiogenesis-related pathologies.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des compositions pharmaceutiques pour inhiber la formation de tubes capillaires par les cellules endothéliales, comprenant au moins un oligonucléotide capable d'inhiber l'expression de la protéine IRS-1. Les oligonucléotides selon l'invention sont indiqués comme agents anti-angiogéniques. Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont particulièrement utiles pour le traitement de pathologies liées à l'angiogénèse.

OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS CAPABLES D'INHIBER LA FORMATION
DES TUBES CAPILLAIRES PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES.

La présente invention a pour objet des
5 oligonucléotides antisens capables d'inhiber l'expression
de la protéine IRS-1 et d'inhiber la formation des tubes
capillaires par les cellules endothéliales. Les
oligonucléotides selon l'invention sont donc indiqués
10 comme agent anti-angiogénique. Ils sont également
indiqués comme agents anti-multiplication cellulaire, en
particulier comme agents anti-tumoraux.

L'invention concerne aussi des compositions
pharmaceutiques contenant lesdits oligonucléotides et
15 l'utilisation desdits oligonucléotides comme réactifs
d'analyse.

L'angiogénèse est un processus fondamental
par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment. Ce
processus est essentiel dans plusieurs phénomènes
20 physiologiques normaux tels que la reproduction, le
développement ou encore la cicatrisation. Dans ces
phénomènes biologiques normaux, l'angiogénèse est sous
contrôle strict, c'est-à-dire qu'elle est déclenchée
25 pendant une période courte (quelques jours), puis
complètement inhibée. Cependant, plusieurs pathologies
sont liées à une angiogénèse invasive et incontrôlée;
l'arthrite, une pathologie due à l'endommagement des
cartilages par les néovaisseaux invasifs; la rétinopathie
30 diabétique où l'invasion de la rétine par les
néovaisseaux conduit à l'aveuglement des malades; la
néovascularisation de l'appareil oculaire présente la
cause majeure de l'aveuglement, et cette
néovascularisation intervient dans une vingtaine de
maladies de l'œil; ou encore la croissance et la
métastase des tumeurs qui sont liées directement à la

néovascularisation et sont dépendantes de l'angiogénèse. La tumeur stimule la croissance des néovaisseaux pour sa croissance elle-même. De plus, ces néovaisseaux sont des voies d'échappement des tumeurs qui joignent ainsi la circulation sanguine et provoquent des métastases dans des sites éloignés du foyer tumoral initial, comme le foie, le poumon ou l'os.

La formation de néovaisseaux par les cellules endothéliales, l'angiogénèse, implique la migration, la croissance, et la différentiation des cellules endothéliales. La régulation de ces phénomènes biologiques est directement liée à l'expression génétique.

Ainsi, les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont permis d'identifier et de préparer des séquences d'acide nucléique impliquées dans la régulation de l'angiogénèse.

D'autres travaux concernant l'angiogénèse ont permis de mettre en évidence une expression importante et une phosphorylation, au niveau d'un résidu tyrosine d'une protéine intracellulaire de 180 kDa, par les cellules endothéliales cultivées sur un tapis du collagène type I et stimulées par un facteur angiogénique tel que le bFGF. L'expression importante et la phosphorylation au niveau du résidu tyrosine de la protéine intracellulaire de 180 kDa accompagnent la formation des tubes capillaires par les cellules endothéliales.

Cette protéine est déjà connue en tant que substrat du récepteur de l'insuline (nommé IRS-1). Elle a été, en effet, partiellement identifiée et étudiée par certains auteurs travaillant sur le diabète (Quon et al., J. Biol. Chem. (1994), 269 (45), 27920-27924).

Ces auteurs ont étudié le rôle de l'IRS-1 sur (i) la translocation du GLUT 4 stimulée par l'insuline et

(ii) le transport du glucose, dans des cellules adipeuses de rat. Pour ce faire, ils ont construit un plasmide contenant :

5 - un oligonucléotide bicaténaire, obtenu à partir de l'oligonucléotide sens de séquence SEQ ID No. 1 suivante : 5'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGAAACTCTGGCCTAG-3', et

-l'ADNc codant pour l'IRS-1 humain,

10 et ont transfecté des cellules adipeuses de rat avec ledit plasmide.

15 Les travaux menés dans le cadre de la présente invention ont mis en évidence le fait que l'expression de la protéine IRS-1 est également induite dans les cellules endothéliales lorsque ces dernières sont stimulées par le facteur angiogénique bFGF.

20 L'invention concerne donc une composition pharmaceutique active sur les phénomènes d'angiogénèse comprenant à titre d'agent actif au moins une substance choisie parmi : (i) une molécule d'acide nucléique du gène codant pour la protéine IRS-1, d'une séquence complémentaire ou d'un fragment de celle-ci ou un fragment de celle-ci, (ii) une molécule capable d'inhiber 25 l'expression d'une molécule d'acide nucléique selon (i).

30 Dans le cadre de l'invention, des oligonucléotides anti-sens du gène codant pour cette protéine ont été préparés. Ces oligonucléotides présentent des activités anti-angiogénique et anti-tumorale remarquables. Ils sont donc particulièrement utiles pour le traitement des maladies liées à une angiogénèse invasive et non contrôlée par des méthodes de thérapies géniques consistant à administrer à un individu

une composition contenant au moins un de ces oligonucléotides.

5 Ainsi, un oligonucléotide selon l'invention est constitué par la séquence nucléotidique de formule SEQ ID No.2 suivante :

5'-TATCCGGAGGGCTGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3',

12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

10 L'invention concerne tout particulièrement un oligonucléotide constitué par l'une des séquences nucléotidiques de formules SEQ ID No.3 et 4 suivantes :

5'-TATCCGGAGGGCTGCCATGCTGCT-3',

5'-TCGCCATGCTGCTGCGGAGCAGA-3',

15 un fragment de celles-ci comprenant au moins 12 nucléotides contigus, ou leur dérivé.

20 On entend par dérivé, une séquence capable de s'hybrider dans des conditions strictes avec l'une des séquences SEQ ID No.2, 3 ou 4 ou avec un fragment de celles-ci d'au moins 12 nucléotides contigus.

A titre d'exemples d'oligonucléotides selon l'invention, on peut mentionner ceux de séquences suivantes :

SEQ ID No.5: 5'-TATCCGGAGGGCCTGCCATGCTGCT-3'

25 SEQ ID No.6: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG CTGC-3'

SEQ ID No.7: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG CTG-3'

SEQ ID No.8: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG CT-3'

SEQ ID No.9: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG C-3'

SEQ ID No.10: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCATG-3'

30 SEQ ID No.11: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCAT-3'

SEQ ID No.12: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCCA-3'

SEQ ID No.13: 5'-TATCCGGAGG GCCTGCC-3'

SEQ ID No.14: 5'-TATCCGGAGG GCCTGC-3'

SEQ ID No.15: 5'-TATCCGGAGG GCCTG-3'

SEQ ID No.16: 5'-TATCCGGAGG GCCT-3'

SEQ ID No.17: 5'-TATCCGGAGG GCC-3'

SEQ ID No.18: 5'-TATCCGGAGG GC-3'

SEQ ID No.19: 5'-CCGGAGG GCCTGCCATG CTGCT-3'

5 SEQ ID No.20: 5'-GAGG GCCTGCCATG CTGCT-3'

SEQ ID No.21: 5'-G GCCTGCCATG CTGCT-3'

SEQ ID No.22: 5'-CTGCCATG CTGCT-3'

SEQ ID No.23: 5'-TGCCATG CTGCT-3'

Avantageusement, tout ou partie des liaisons 10 phosphodiester des oligonucléotides de l'invention sont protégées. Cette protection s'effectue généralement par voie chimique, selon des méthodes classiques bien connues de l'homme du métier. Par exemple, on peut protéger les liaisons phosphodiester par une fonction thiol ou amine 15 ou bien encore par un groupement phényle.

De façon également avantageuse, les extrémités 5'- et/ou 3'- des oligonucléotides de l'invention sont protégées, par exemple en utilisant la technique indiquée précédemment pour protéger les 20 liaisons phosphodiester.

Les oligonucléotides de l'invention peuvent être synthétisés selon les techniques conventionnelles bien connues de l'homme du métier, par exemple à l'aide d'un synthétiseur d'ADN commercialisé par différentes 25 sociétés.

Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas entièrement élucidé, les oligonucléotides selon l'invention inhibent l'expression de la protéine IRS-1 au sein des cellules endothéliales. Ces oligonucléotides sont capables de bloquer la formation des néovaisseaux par les cellules endothéliales (i.e. inhibent l'angiogénèse), et de ce fait ils inhibent la multiplication des cellules tumorales chez la souris. 30

5 L'invention a donc aussi pour objet une composition pharmaceutique pour l'inhibition du gène codant pour la protéine IRS-1 comprenant au moins un oligonucléotide complémentaire d'une partie dudit gène ou d'un transcrit dudit gène.

10 De préférence, la molécule capable d'inhiber l'expression d'une molécule d'acide nucléique du gène codant pour la protéine IRS-1 est une séquence antisens de la région codante de la séquence identifiée sous le numéro SEQ ID No. 28 dans la liste de séquences en annexe.

15 Avantageusement, ladite séquence antisens comprend au moins douze nucléotides contigus ou leur dérivé.

20 Plus préférentiellement, l'agent actif capable d'inhiber l'expression d'une molécule d'acide nucléique du gène codant pour la protéine IRS-1 de la composition de l'invention est une séquence nucléotidique choisie parmi l'ensemble de séquences nucléotidiques identifiées sous les numéros SEQ ID No. 2 à SEQ ID No 23 dans la liste de séquences en annexe comprenant au moins 25 douze nucléotides contigus ou leur dérivé.

30 Une telle composition comprend avantageusement comme agent actif au moins un oligonucléotide défini précédemment, avantageusement associé dans ladite composition avec un véhicule acceptable.

L'analyse des travaux réalisés dans le cadre de l'invention a donc permis de montrer que la protéine

IRS-1 représente un constituant cellulaire essentiel dans le processus de l'angiogénèse. En effet, l'inhibition de l'expression de la protéine IRS-1 par lesdits oligonucléotides antisens conduit à l'inhibition de la formation de tubes capillaires par les cellules endothéliales.

Les oligonucléotides selon l'invention et les compositions les contenant sont donc indiqués comme agent anti-angiogénique. Ils sont également indiqués comme agents anti-multiplication cellulaire, en particulier comme agents anti-tumoraux, et en conséquence sont tout particulièrement utiles pour le traitement des tumeurs. L'invention a donc pour objet l'utilisation desdits oligonucléotides pour la préparation d'une composition destinée au traitement ou à la prévention de pathologies liées à une angiogénèse invasive et incontrôlée, comme par exemple à titre non limitatif: le traitement de la vascularisation de tumeurs, des maladies de l'œil liées à la néovascularisation de l'appareil oculaire telles que les rétinopathies, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, l'athérosclérose, l'hyperstimulation de l'ovaire, le psoriasis, l'endométrie associée à la néovascularisation, la resténose due à l'angioplastie du ballon, la superproduction tissulaire due à la cicatrisation, la maladie vasculaire périphérique, l'hypertension, l'inflammation vasculaire, la maladie et les phénomènes de Raynaud, l'anévrisme, la resténose artérielle, la thrombophlébite, la lymphagyte, le lymphodème, la cicatrisation et la réparation tissulaire, l'ischémie, l'angine, l'infarctus de myocarde, la maladie chronique du cœur, les insuffisances cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque congestive, la dégénération maculaire liée à l'âge et l'ostéoporose.

Les compositions pharmaceutiques ci-dessus sont plus particulièrement réalisées de manière à pouvoir être administrées par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou transdermique. Pour une telle administration, on utilise notamment des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles, par exemple le propylèneglycol ou le butylèneglycol.

La dose unitaire usuelle à administrer contient de 0,001 mg à 50 mg de principe actif.

Ainsi, les compositions pharmaceutiques de l'invention sont particulièrement utiles pour la mise en œuvre des tests de diagnostic des pathologies liées aux phénomènes d'angiogénèse, notamment pour le diagnostic des rétinopathies, de l'arthrite rhumatoïde, de la maladie de Crohn, de l'athérosclérose, l'hyperstimulation de l'ovaire, du psoriasis, de l'endométrie associée à la néovascularisation, de la resténose due à l'angioplastie

du ballon, de la superproduction tissulaire due à la cicatrisation, de la maladie vasculaire périphérique, de l'hypertension, de l'inflammation vasculaire, de la maladie et les phénomènes de Raynaud, de l'anévrisme, de la resténose artérielle, de la thrombophlébite, de la lymphagite, du lymphodème, de la cicatrisation et de la réparation tissulaire, de l'ischémie, de l'angine, de l'infarctus de myocarde, de la maladie chronique du cœur, des insuffisances cardiaques telles que l'insuffisance cardiaque congestive ou de la dégénération maculaire liée à l'âge et de l'ostéoporose.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent dans lesquels on désigne par "oligonucléotide" l'oligonucléotide de séquence ID NO.3 et qui font référence aux figures jointes annexe dans lesquelles :

- la figure 1A représente l'image du Western Blot obtenu à partir des échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste S), révélée par un anticorps anti-IRS-1.

- la figure 1B montre l'image du Western blot obtenue après coloration au nitrate d'argent à partir des mêmes échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste S)

- la figure 2 montre les images du Western Blot obtenues à partir des échantillons des surnageants issus des cellules non stimulées (Piste NS) et des cellules stimulées avec le bFGF (Piste B), lorsque la membrane est incubée avec un anticorps monoclonal anti-

phosphotyrosine et révélée avec un anticorps anti-isotype marqué à la peroxydase comme indiqué dans l'exemple 3,

5 - Les figures 3A à 3D montrent les images des cultures, sur un tapis du collagène type I, des différents lots de cellules endothéliales :

- La figure 3A montre la culture des cellules endothéliales non traitées.

10 - La figure 3B montre la culture des cellules endothéliales stimulées avec 3 ng/ml de bFGF.

- la figure 3C montre la culture des cellules endothéliales incubés avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures, puis stimulées avec 3 ng/ml de bFGF.

15 - la figure 3D montre la culture des cellules endothéliales incubées avec 100 µg/ml de l'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures.

20 - Les figures 4A à 4F illustrent les résultats des essais d'inhibition de la néovascularisation cornéenne obtenue chez des rats.

25 La figure 4A montre les résultats obtenus par injection sous-conjonctivale d'un oligonucléotide antisens à une concentration de 60 µM.

La figure 4B illustre les résultats obtenus après injection sous-conjonctivale d'un oligonucléotide sens à une concentration de 60 µM.

30 La figure 4C montre les résultats obtenus après une application topique d'un oligonucléotide antisens à une concentration de 200µM.

La figure 4D montre les résultats obtenus après une application topique d'un oligonucléotide sens à une concentration de 200µM.

La figure 4E illustre l'état de la cornée en absence de tout traitement.

La figure 4F montre l'état de la cornée lorsque celle-ci est traitée avec des injonctions sous-conjonctivales de PBS.

Les figures 5A à 5J illustrent les résultats de l'inhibition de la néovascularisation cornéenne obtenus chez les différents groupes de rats (décris 10 section 6.6 Résultats), après désépithérialisation et résection limbique des cornées de rats à jour 4 (Figures 5A à 5E) et à jour 9 (Figures 5F à 5J). Il s'agit de photographies en lampe à fente montrant la comparaison de la croissance des vaisseaux dans les différents groupes 15 de rats. Grossissement x10

Exemple 1 : Mise en évidence de l'induction de l'expression d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa) dans les cellules endothéliales suite à la stimulation de ces 20 cellules par le bFGF.

La protéine 180 kDa a été mise en évidence de la manière suivante :

Les cellules endothéliales ont été mises en culture dans une plaque de microtitration à 6 trous préalablement recouverts avec du collagène type I comme décrit dans (Montesano et al., J. Cell. Biol., 1983, 83, 25 1648-1652). Le milieu de culture est le DMEM (Sigma) enrichi avec 10 % de sérum de vœu fétal, 4 mM glutamine, 500 U/ml pénicilline, et 100 µg/ml streptomycine. Après 3 à 4 jours de culture, on obtient une couche semi-confluente des cellules endothéliales. Les milieux de culture de six trous ont été aspirés et remplacés par du milieu de culture frais. Trois trous ont été enrichis 30 avec 3 ng/ml de bFGF. Après une incubation de 48 heures,

les différents puits sont lavés trois fois avec un tampon phosphate, et les cellules sont utilisées pour extraire l'ARN messager (ARNm) selon des protocoles connus de l'homme du métier. Les ARNm sont reverse transcrits par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant chacun des quatre groupes dégénérés d'amorces oligo(dT) (T12MN), M peut être G, A, ou C; et N est G, A, T, et C. Chaque groupe d'amorces est dicté par la base en position 3' (N), avec une dégénérescence dans la position (M). Exemple: le set d'amorces où N = G est constitué de:

SEQ ID No.24: 5'-TTTTTTTTTTGG-3'

SEQ ID No.25: 5'-TTTTTTTTTTAG-3'

SEQ ID No.26: 5'-TTTTTTTTTTTCG-3'

Les ADNc ainsi obtenus sont amplifiés et marqués au moyen d'un décamère arbitraire, en présence d'ATP marqué isotopiquement. L'analyse des ADNc amplifiés par électrophorèse a révélé la présence d'un fragment d'ADNc de 326 bp amplifié dans l'échantillon issu des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF, identifié dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID.No. : 27, cependant, ce même fragment est faiblement présent ou présent à l'état de trace dans l'échantillon issu des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF. Le séquençage de ce fragment et l'interrogation subséquente des banques des données ont révélé que ce fragment correspond à une partie d'un gène déjà connu, codant pour le substrat du récepteur de l'insuline (une protéine intracellulaire de 180 kDa).

Exemple 2 : Mise en évidence de l'induction de l'expression d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa).

Des cellules endothéliales en culture sur un tapis de collagène type I stimulées ou non stimulées avec le bFGF (cf. exemple 1) sont lysées dans un tampon de

lyse cellulaire contenant de l'orthovanadate de sodium. Ces solutions sont ensuite clarifiées par centrifugation à 14000 g pendant 15 min. Des échantillons de surnageants issus des cellules non stimulées et des cellules stimulées avec le bFGF, contenant des quantités équivalentes de protéines, ont été repris avec une solution d'électrophorèse contenant 2% SDS et 15 mM de dithiothréitol, chauffés à 100 °C pendant 5 min. puis déposés en gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 15% en acrylamide) dans des conditions dénaturantes (en présence de 2% SDS). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée par une incubation à température ambiante dans une solution de 5% de lait dans un tampon PBS. La membrane est ensuite lavée trois fois avec un tampon PBS, incubée dans un tampon PBS contenant 1 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-IRS-1 pendant 2 heures à température ambiante, et lavée trois fois avec un tampon PBS. Les protéines sont ensuite révélées au moyen d'un anticorps secondaire anti-isotype couplé à la peroxydase. On constate la présence d'une protéine de poids moléculaire 180 kDa reconnue par l'anticorps anti-IRS-1 monoclonal dans les préparations issues des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF; cette protéine est faiblement présente dans la préparation issue des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF (Figure 1).

Exemple 3 : Mise en évidence de l'induction de la phosphorylation au niveau de tyrosine d'IRS-1 (la protéine de 180 kDa).

Des cellules endothéliales humaines en culture sur un tapis du collagène type I stimulées ou non stimulées avec le bFGF sont lysées dans un tampon de lyse

cellulaire contenant de l'orthovanadate de sodium. Ces solutions sont ensuite clarifiées par centrifugation à 14000 g pendant 15 min (cf. exemple 2). La protéine IRS-1 a été extraite grâce à un anticorps monoclonal anti-IRS-1. Cette extraction est réalisée après une immunoprecipitation à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-IRS-1 (Sigma). Après addition de l'anticorps anti-IRS-1 couplé à l'agarose, la suspension est incubée pendant 2 heures à température ambiante, puis centrifugée à 4000 g pendant 15 min. Le précipité obtenu est repris avec une solution d'électrophorèse contenant 2% SDS et 15 mM de dithiothréitol, chauffé à 100 °C pendant 5 min., puis déposé en gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 15% en acrylamide) dans des conditions dénaturantes (en présence de 2% SDS). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée par une incubation à température ambiante dans une solution de 5% de lait dans un tampon PBS. La membrane est ensuite lavée trois fois avec un tampon PBS, incubée dans un tampon PBS contenant 1 µg/ml d'anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine pendant 2 heures à température ambiante, et lavée trois fois avec un tampon PBS. Les protéines sont ensuite révélées au moyen d'un anticorps secondaire anti-isotype couplé à la peroxydase. On constate que la protéine IRS-1 de poids moléculaire 180 kDa est phosphorylée au niveau du résidu tyrosine dans les préparations issues des cellules endothéliales stimulées avec le bFGF ; cette protéine est très faiblement phosphorylée au niveau du résidu tyrosine dans la préparation issue des cellules endothéliales non stimulées avec le bFGF (Figure 2)

Exemple 4 : Evaluation de l'activité anti-angiogénique *in vitro* de l'oligonucléotide.

Des cellules endothéliales humaines sont mises en culture sur un tapis du collagène type I. Au septième jour de culture, les puits de culture sont divisés en quatre lots :

5 Lot 1 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales non traitées. (Figure 3A)

Lot 2 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales stimulées avec 3 ng/ml de bFGF. (Figure 3B)

10 Lot 3 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales incubées avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures, puis stimulées avec 3 ng/ml de bFGF. (Figure 3C)

15 Lot 4 : Puits correspondant à la culture des cellules endothéliales incubées avec 100 µg/ml d'oligonucléotide de séquence SEQ ID No. 3 pendant 4 heures. (Figure 3D)

Après 3 à 4 jours de culture, les différents 20 puits sont examinés à l'aide de microscope optique à phase inverse. A la lecture des résultats, il apparaît que les cellules endothéliales humaines dans le lot 2 forment des tubes capillaires suite à la stimulation avec le bFGF. On constate aussi que l'oligonucléotide inhibe 25 la formation de néovaisseaux par ces mêmes cellules stimulées avec le bFGF dans le lot 3. On observe enfin que l'oligonucléotide ne modifie pas de manière prononcée la croissance des cellules endothéliales. En effet, le nombre des cellules endothéliales dans le puits de lot 1 et ceux de lot 4 sont comparables.

30 Exemple 5 : Evaluation de l'activité *in vivo* de l'oligonucléotide.

Trois lots de souris nude ont été utilisés. Chaque lot étant constitué de 5 souris.

5 Lot N°1 : Ce lot a servi de témoin. Chaque souris est inoculée en sous-cutané à J0 avec 200 µl d'une suspension de cellules de mélanome B16 (fournies par l'Institut Gustave Roussy de Villejuif) dispersées dans du PBS à raison de 10^6 cellules/ml. Ces souris ne sont pas traitées par la suite.

10 Lot N°2 : Chaque souris est inoculée en sous-cutané à J0 avec 200 µl d'une suspension de cellules de mélanome B16 dispersées dans du PBS à raison de 10^6 cellules/ml. A J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9 et J10 chaque souris reçoit une injection en sous-cutanée de 200 µl d'une solution d'oligonucléotide diluée dans du PBS à une concentration de 500 µg/ml. L'injection d'oligonucléotide est effectuée à proximité du site d'injection des cellules.

15 Lot N°3 : Les souris de ce lot ne sont pas inoculées avec les cellules de mélanome B16. Cependant, chacune de ces souris reçoit une injection de 200 µl d'une solution d'oligonucléotide dans du PBS à une concentration de 500 µg/ml ; les injections sont faites à J1, J2 J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9 et J10.

20 Les résultats sont les suivants :

25 Après inoculation, chez les souris du lot N°1, la masse tumorale se développe d'une façon très rapide. En effet, la masse tumorale atteint une taille de 1,6 à 2,5 cm de diamètre après dix jours chez les souris dudit lot N°1 (souris non traitées). L'évolution de la masse tumorale chez les souris du lot N°2 (souris traitées après inoculation par injection d'oligonucléotide à J1, J2 et J3), montre une augmentation nettement moindre du volume de la masse tumorale. La masse tumorale chez les souris du lot 2 ne

dépasse pas 0,8 cm de diamètre au dixième jour. Au quatorzième jour, la différence entre la masse tumorale des souris de lots N°2 et celle des souris du lot N°1 est remarquable.

5 Chez les souris du lot N°3 (souris n'ayant pas reçu de cellules de mélanome B16, mais traitées par injection d'oligonucléotide pendant trois jours) on note un effet général inattendu sur la peau. Il est identique à celui noté chez toutes les souris qui ont été traitées 10 par l'oligonucléotide (lot 2). La peau prend un aspect vieilli, fripé. On note aussi l'apparition de poils chez toutes les souris traitées. Il existe un parallélisme au cours de l'évolution entre la régression des signes cutanés et la reprise de la croissance tumorale.

15 On constate donc que l'oligonucléotide inhibe le développement et la formation des néovaisseaux par les cellules endothéliales *in vitro*; Il possède d'autre part une activité anti-tumorale *in vivo* remarquable chez la souris nude.

20

Exemple 6: Evaluation de l'oligonucléotide anti-angiogénique sur un modèle de néovascularisation cornéenne chez le rat

25 Sur la base des travaux d'Amano et al. (1998), le demandeur a repris, modifié et analysé un modèle de formation de néovaisseaux cornéens chez le rat après désépithérialisation et limbectomy (Figures 5A à 5J). Il est reproductible, permet d'examiner directement 30 les néovaisseaux en lampe à fente et de les quantifier, les détails sont indiqués ci-dessous. Ce modèle a ensuite été utilisé pour tester l'efficacité d'agents anti-angiogéniques de l'invention.

6.1 Animaux et modèle de néovascularisation cornéenne.

Des rats (*Rattus norvegicus*) Wistar mâles âgés de cinq semaines (Charles River France, St-Aubin les Elbeufs, France), exempts de germes pathogènes spécifiques sont nourris et abreuvés à volonté, et maintenus, dans l'animalerie du laboratoire, dans des conditions fixes de température et d'humidité, avec des cycles de 12 heures de lumière / 12 heures d'obscurité.

Les rats sont anesthésiés avec un mélange de kétamine (Kétamine 1000, UVA, Ivry-sur-Seine, France ; 128 mg/kg) et de chlorpromazine (Largactil 25 mg/ml; Specia Rhône Poulenc, Paris, France; 5 mg/kg), injecté par voie intra-musculaire. Une goutte d'oxybuprocaïne (Novésine, Chibret, Clermont-Ferrand, France) est instillée dans l'œil droit. A l'aide d'un système grossissant (macroscope Wild MPS 51 S, LEICA, Heerbrugg, Suisse), l'épithélium cornéen est enlevé par une « microsponge » imbibée d'éthanol à 70%. Une bande de conjonctive de 1,5 mm de large, au limbe, est excisée à l'aide de ciseaux microchirurgicaux, et les paupières sont fermées par une blépharorraphie temporaire à l'aide d'un fil Vicryl^{*} 5.0 (Dacron, Alcon, Rueil-Malmaison, France). L'œil est ensuite rincé abondamment au PBS 1X, une pommade oxytétracycline (Posicycline^{*}, Alcon, France) est appliquée et la blépharorraphie est ouverte le quatrième jour (8, 9).

30 6.2 Traitements par injections sous-conjonctivales et applications topiques de l'oligonucléotide anti-angiogénique.

L'ensemble de rats a été divisé en 6 groupes :

* Marque de commerce

Groupe A : modèle + injection sous-conjonctivale d'une solution d'oligonucléotide antisens à 60 µM dans du PBS 1X,

5 Groupe B : modèle + application topique d'une solution d'oligonucléotide antisens à 200 µM dans du PBS 1X,

Groupe C : modèle + injection sous-conjonctivale d'une solution d'oligonucléotide sens à 60 µM dans du PBS 1X,

10 Groupe D : modèle + application topique d'une solution d'oligonucléotide sens à 200 µM dans du PBS 1X,

Groupe E : modèle + injection sous-conjonctivale de PBS 1X,

Groupe F : modèle sans traitement).

15

Tous les rats ont été désépithélialisés comme décrit ci-dessus ; le traitement a été effectué toutes les 24 heures à partir du quatrième jour, et jusqu'au neuvième jour. La néovascularisation a été examinée en début, milieu et fin de protocole, par examen en lampe à fente ; des photographies ont été prises à J0 et J9.

6.3 Visualisation et quantification de la néovascularisation.

25

Les animaux ont été euthanasiés 10 jours après la désépithélialisation, par injection létale de pentobarbital (injection intra-péritonéale). Pour remplir les micro-vaisseaux et quantifier la néovascularisation cornéenne, la partie supérieure du corps de l'animal a été perfusée avec de la Fluorescéine-Dextran 2x1 000 000. Les yeux ont été énucléés et immergés dans du paraformaldéhyde/PBS 1X 4% pendant 3 heures, puis une nuit dans du PBS 1X. On a ensuite isolé la cornée avec 1 mm de limbe, sous microscope opératoire, et on l'a mise

à plat entre lame et lamelle grâce à 3 à 5 incisions radiales. Les cornées à plat ont ensuite été examinées et photographiées en microscopie à fluorescence. Une fois les cornées entières reconstituées, on les a scannées puis on a mesuré les surfaces par analyse d'image ; un logiciel (NIH image) permettant la quantification de la néovascularisation. Pour chaque photo, on a mesuré 3 fois la surface cornéenne totale, et 3 fois la surface néovascularisée ; le rapport des moyennes - surface néovascularisée / surface cornéenne totale - nous permet d'obtenir le « pourcentage de néovascularisation », et de mesurer l'inhibition obtenue.

6.4 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SD. Les pourcentages de surface néovascularisée/ surface totale ont été comparés avec le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives.

20

6.5 Dilution de l'oligonucléotide

L'oligonucléotide est dilué dans du PBS 1X à pH 7,2. En fonction des données de la littérature et des expériences menées par ailleurs avec d'autres oligonucléotides, il a été choisi d'utiliser une concentration de 60 μ M pour les injections sous-conjonctivales, et une concentration de 200 μ M pour les applications topiques.

30

6.6 Résultats

Sur le modèle de néovaisseaux cornéens, il a été effectué un traitement avec l'oligonucléotide 5'-TATCCGGAGGGCTGCCATGCTGCT-3', identifié sous le numéro SEQ IQ No. 3 dans la liste de séquences en annexe, modifié

sous forme phosphorothioate, par jour, de J4 à J9, selon le protocole suivant :

Groupe A : injection sous-conjonctivale de l'oligonucléotide antisens à 60 µM (AS 60)

5 Groupe B : application topique de l'oligonucléotide antisens à 200 µM (AS 200)

Groupe C : injection sous-conjonctivale de l'oligonucléotide sens à 60 µM (S 60)

10 Groupe D : application topique de l'oligonucléotide sens à 200 µM (S 200)

Groupe E : injection sous-conjonctivale de PBS 1X (PBS)

Groupe F : pas de traitement (O Tt)

15 Le dixième jour du protocole, les rats ont été perfusés avec une solution de FITC/Dextran, puis euthanasiés, les cornées ont été prélevées et fixées dans une solution de PAF 4%; ensuite les cornées ont été mises à plat entre lame et lamelle dans une solution de glycérol; les néovaisseaux fluorescents ont été observés et photographiés au microscope à fluorescence, les photos ont été scannées, et mesuré les pourcentages de néovascularisation pour chaque animal.

20 Les résultats observés sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous :

25

Tableau 1

	Groupe A AS 60	Groupe B AS 200	Groupe C S 60	Groupe D S 200	Groupe E PBS	Groupe F O Tt
Moyenne	0,6157	0,5058	0,9431	0,9392	0,9552	0,9170
SD	0,2194	0,1172	0,0964	0,0308	0,0481	0,0751
Nombre de mesures	15	15	15	12	9	9
SEM	0,0566	0,0303	0,0249	0,0089	0,0160	0,0250

L'analyse statistique des résultats par un test non paramétrique de Mann-Whitney donne les résultats suivants :

Les injections sous-conjonctivales d'ODN antisens à 60 µM (A) ont réduit la néovascularisation par rapport aux groupes E et F témoins (résultats très significatifs, $P<0,0001$ et $P=0,0011$) ; l'application topique de l'oligonucléotide antisens à une concentration de 200 µM (B) a réduit la néovascularisation par rapport aux groupes témoins E et F (résultats extrêmement significatifs, $P<0,0001$).

Comparées à l'administration sous-conjonctivale de d'ODN sens à 60 µM (C) ou à l'application topique d'ODN sens à 200 µM (D), l'injection d'ODN antisens à 60 µM (A) et l'application topique d'ODN antisens à 200 µM (B) ont réduit la néovascularisation. Ces résultats sont extrêmement significatifs $P<0,0001$. (Figures 4A à 4F).

L'inhibition de la néovascularisation n'est pas significativement différente, selon que l'on administre l'oligonucléotide antisens par voie sous-conjonctivale (60 µM) ou par voie topique (200 µM) ; elle est d'environ 35% par rapport aux témoins (E et F).

L'injection sous-conjonctivale d'ODN sens à 60 µM (C) et l'application topique d'ODN sens à une concentration de 200 µM (D) n'ont pas modifié la néovascularisation par rapport aux groupes témoins (E et F). Par contre, on observe un petit effet de l'oligonucléotide sens en application topique (D) par rapport à l'oligonucléotide sens en injections sous-conjonctivales (C) ($P=0,0117$).

Par ailleurs, on observe, dans les groupes traités par l'antisens (A et B), un calibre et une densité moindres des néovaisseaux. Leur répartition n'est pas différente par rapport aux groupes témoins, et aucune

différence de niveau d'inflammation n'est observée (Figure 4).

6.7 Effets secondaires

5 Au cours des deux séries d'expériences, aucun effet secondaire notable n'a été observé dans aucun groupe : après 6 jours de traitement aux doses mentionnées ci-dessus, la peau des rats n'était pas fripée, le pelage ne s'est pas modifié, l'état général 10 des animaux était bon ; ils se sont nourris normalement jusqu'au dernier jour, et aucune mortalité suspecte n'a été observée. Bien qu'il n'ait été pratiqué ni autopsie, ni analyse sanguine, l'état général des animaux en fin 15 d'expérimentation ne laisse pas supposer l'existence de troubles hépatiques. Le seul symptôme observé est un dépôt blanchâtre transitoire, à l'endroit des injections sous-conjonctivales, chez 60% des rats du groupe A, 60% des rats du groupe C, et 10% des rats du groupe E. Ce dépôt s'est résorbé en fin d'expérimentation dans tous 20 les cas.

Cet exemple montre que, contrairement à ce qu'on pouvait attendre, les injections sous-conjonctivales d'oligonucléotide antisens à une concentration de 60 μ M n'ont pas plus inhibé la néovascularisation que l'administration topique 25 d'oligonucléotide antisens à une concentration de 200 μ M.

Ceci peut s'expliquer en partie par la différence des concentrations utilisées ; mais ce résultat suggère également une pénétration de 30 l'oligonucléotide par voie topique plutôt que par le limbe. Il suggère également l'absence de libération prolongée du produit à partir du site d'injection.

6.8 Conclusion

L'application de l'oligonucléotide antisens, par voie topique ou en injections sous-conjonctivales réduit la néovascularisation sur notre modèle de néovaisseaux cornéens chez le rat.

5

Le but de ce travail était de tester l'efficacité des oligonucléotides anti-sens issus de la séquence du gène IRS-1 sur un modèle de néovascularisation cornéenne chez le rat préalablement mis au point.

10

Ce modèle est facilement accessible, reproductible, et quantifiable. De plus, cette étude a permis une première évaluation de la concentration d'oligonucléotide nécessaire, *in vivo*, pour inhiber une néovascularisation.

BIBLIOGRAPHIE

- 1-Aiello LP. Keeping in touch with angiogenesis. *Nat Med* 2000 ; 6 : 379-381
- 5 2-D'Amore P.A. Mechanisms of Retinal and Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(12) : 3974-3979
- 10 3-Hélène C. Rational design of sequence-specific oncogene inhibitors based on antisense and antigene oligonucleotides. *Eur J Cancer* 1991 ; 27 : 1466-1471
- 15 4-Agrawal S, Bunnel BA, Crooke ST, Davidkova G, Gyurko R, Iyer K et al. Antisense oligonucleotides and antisense RNA. Benjamin Weiss edition (Philadelphie, USA) 1997 ; 1-11, 19-40
- 5-Pierga JY, Cammilleri S, Benyahia B, Magdelénat H. Applications des oligonucléotides antisens en cancérologie. *Bull Cancer* 1994 ; 81 : 1023-1042
- 20 6-Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, Foley E, Webb R, Smith LEH. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 4851-4856
- 7-Aiello LP. Vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997 ; 38 :1647-1652
- 25 8-Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis AP. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998 ; 39 : 18-22
- 30 9-Hoang-Xuan T, Prisant O. Restauration de l'épithélium cornéen à partir des cellules souches limbiques. *Med Sci* 1998 ; 14 : 1375-1377
- 10-Parry T.J, Cushman C, Gallegos A.M, Agrawal A.B, Richardson M, Andrews L.E. et al.

Bioactivity of antiangiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA. *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 2569-2577

11-Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, Yamada H, Yamada E, Okamoto N et al. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* 2000; 156: 697-707

12-Berdugo Polak M, Administration par iontophorèse d'oligonucléotides antisens dans le segment antérieur de l'œil : application à un modèle de néovascularisation cornéenne chez le rat. DEA "Biologie et Pathologie des Epithéliums"; université Paris VII, Feldmann G.; Inserm U450, directeur Courtois Y., sous la direction de Behar Cohen F. 2000

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> AL MAHMOOD, SALMAN
 <120> Oligonucleotides antisens capables d'inhiber la formation de tubes
 capillaires par les cellules endothéliales
 <130> B6531-PCT-Juin 2002
 <140> PCT/FR02/xxxxx
 <141> 2002-06-14
 <150> FR01/07805
 <151> 2001-06-14
 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle.
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(48)
 <223> oligonucleotide sens

<400> 1
 tcgatgtgac gctactgatg agtccgtgag gacgaaactc tggcctag

48

<210> 2
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 2
 tatccggagg gctcgccatg ctgctgcgga gcaga

35

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 3
 tatccggagg gctcgccatg ctgct

25

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature

WO 02/103014

2

PCT/FR02/02067

<222> (1)..(23)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 4
 tcgccatgct gctgcggagc aga

23

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(25)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 5
 tatccggagg gcctgccatg ctgct

25

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(24)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 6
 tatccggagg gcctgccatg ctgc

24

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 7
 tatccggagg gcctgccatg ctg

23

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 8
tatccggagg gcctgccatg ct 22

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 9
tatccggagg gcctgccatg c 21

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 10
tatccggagg gcctgccatg 20

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 11
tatccggagg gcctgccat 19

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(18)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 12
tatccggagg gcctgcca 18

<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 13
tatccggagg gcctgacc

17

<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 14
tatccggagg gcctgac

16

<210> 15
<211> 15
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 15
tatccggagg gcctg

15

<210> 16
<211> 14
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 16
tatccggagg gcct

14

<210> 17
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 17
 tatccggagg gcc

13

<210> 18
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 18
 tatccggagg gc

12

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 19
 ccggagggcc tgccatgctg ct

22

<210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> Oigonucleotide anti-sens.

<400> 20
 gagggcctgc catgctgct

19

<210> 21
 <211> 16
 <212> DNA

<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 21
ggcctgccat gctgct

16

<210> 22
<211> 13
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(13)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 22
ctgccatgct gct

13

<210> 23
<211> 12
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 23
tgccatgctg ct

12

<210> 24
<211> 14
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> Oligonucleotide anti-sens;

<400> 24
tttttttttt ttgg

14

<210> 25
<211> 14
<212> DNA
<213> Séquence artificielle.
<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(14)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 25
 tttttttttt ttag

14

<210> 26
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 26
 tttttttttt ttcg

14

<210> 27
 <211> 326
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(326)
 <223> Fragment du gène IRS-1 codant pour le substrat du récepteur de l'insuline.

<400> 27
 gtgccgagct gagttcctta taagaattaa tcttaatttt gtatttttc ctgtaagaca 60
 ataggccatg ttaattaaac tgaagaagga tatatttggc tgggtgtttt caaatgtcag 120
 cttaaaattt gtaattgaat ggaagcaaaa ttataagaag aggaaattaa agtcttccat 180
 tgcattgttatt gtaaacagaa ggagatgggt gattccttca attcaaaagc tctctttgga 240
 atgaacaatg tgggcgtttg taaattctgg aatgtctttt ctattcataa taaacttagat 300
 actgttgatc ttttaaaaaa aaaaaaa 326

<210> 28
 <211> 5800
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1022)..(4750)
 <223>

<400> 28
 cggcggcgcg gtcggagggg gccggcgcg agagccagac gcccggctt gttttggttg 60

WO 02/103014

PCT/FR02/02067

gggctctcg caactctccg aggaggagga ggaggaggga ggaggggaga agtaactgca 120
 gcggcagcgc ctcccgagga acaggcgtct tccccgaacc cttcccaaac ctccccatc 180
 ccctctcgcc cttgtccccct cccctcctcc ccagccgcct ggagcgaggg gcagggatga 240
 gtctgtccct ccggccggtc cccagctgca gtggctgccc ggtatcgttt cgcatggaaa 300
 agccactttc tccacccgccc gagatggcc cggatggggg ctgcagagga cgcgcccgcg 360
 ggcggcggca gcagcagcag cagcagcagc agcaacagca acagccgcag cgccgcggc 420
 tctgcgactg agctggatt tggcggtcg gtggcggtcg ggacggttgg ggggtggag 480
 gaggcgaagg aggagggaga accccgtgca acgttggac ttggcaaccc gcctccccct 540
 gccaaggat atttaatttgc cctcggaat cgctgcttcc agagggaaac tcaggaggga 600
 aggcgcgccgc gcgcgcgcgc tcctggaggg gcaccgcagg gaccccgac tgtcgccctcc 660
 ctgtgccgga ctccagccgg ggcgacgaga gatgcattt cgctcattcc tggtgccggc 720
 ggccggctgag aggagacttg gctctcgag gatcggtcg gcccctcaccc cggacgcact 780
 gcctccccgc cggcggtgaa gcgcggaaa actccggtcg ggctctctcc tggctcagc 840
 agctgcgtcc tccttcagct gcccccccccc ggcgcggggg gcggcggtgaa tttcagagtc 900
 ggggtttctg ctgcctccag ccctgtttgc atgtgccggg ccgcggcgag gagcctccgc 960
 ccccccacccg gttgttttc ggagcctccc tctgctcagc gttggtggtg gcgggtggcag 1020
 c atg gcg agc cct ccg gag agc gat ggc ttc tcg gac gtg cgc aag gtg 1069
 Met Ala Ser Pro Pro Glu Ser Asp Gly Phe Ser Asp Val Arg Lys Val
 1 5 10 15

 ggc tac ctg cgc aaa ccc aag agc atg cac aaa cgc ttc ttc gta ctg 1117
 Gly Tyr Leu Arg Lys Pro Lys Ser Met His Lys Arg Phe Phe Val Leu
 20 25 30

 cgc gcg gcc agc gag gct ggg ggc ccg gcg cgc ctc gag tac tac gag 1165
 Arg Ala Ala Ser Glu Ala Gly Gly Pro Ala Arg Leu Glu Tyr Tyr Glu
 35 40 45

 aac gag aag aag tgg cgg cac aag tcg agc gcc ccc aaa cgc tcg atc 1213
 Asn Glu Lys Lys Trp Arg His Lys Ser Ser Ala Pro Lys Arg Ser Ile
 50 55 60

 ccc ctt gag agc tgc ttc aac atc aac aag cgg gct gac tcc aag aac 1261
 Pro Leu Glu Ser Cys Phe Asn Ile Asn Lys Arg Ala Asp Ser Lys Asn
 65 70 75 80

 aag cac ctg gtg gct ctc tac acc cgg gac gag cac ttt gcc atc gcg 1309
 Lys His Leu Val Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Glu His Phe Ala Ile Ala
 85 90 95

 gcg gac agc gag gcc gag caa gac agc tgg tac cag gct ctc cta cag 1357
 Ala Asp Ser Glu Ala Glu Gln Asp Ser Trp Tyr Gln Ala Leu Leu Gln
 100 105 110

 ctg cac aac cgt gct aag ggc cac cac gac gga gct gcg gcc ctc ggg 1405
 Leu His Asn Arg Ala Lys Gly His His Asp Gly Ala Ala Leu Gly
 115 120 125

gcg gga ggt ggt ggg ggc agc tgc agc ggc agc tcc ggc ctt ggt gag	1453
Ala Gly Gly Gly Gly Ser Cys Ser Gly Ser Ser Gly Leu Gly Glu	
130 135 140	
gct ggg gag gac ttg agc tac ggt gac gtg ccc cca gga ccc gca ttc	1501
Ala Gly Glu Asp Leu Ser Tyr Gly Asp Val Pro Pro Gly Pro Ala Phe	
145 150 155 160	
aaa gag gtc tgg caa gtg atc ctg aag ccc aag ggc ctg ggt cag aca	1549
Lys Glu Val Trp Gln Val Ile Leu Lys Pro Lys Gly Leu Gly Gln Thr	
165 170 175	
aag aac ctg att ggt atc tac cgc ctt tgc ctg acc agc aag acc atc	1597
Lys Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg Leu Cys Leu Thr Ser Lys Thr Ile	
180 185 190	
agc ttc gtg aag ctg aac tcg gag gca gcg gcc gtg gtg ctg cag ctg	1645
Ser Phe Val Lys Leu Asn Ser Glu Ala Ala Val Val Leu Gln Leu	
195 200 205	
atg aac atc agg cgc tgt ggc cac tcg gaa aac ttc ttc ttc atc gag	1693
Met Asn Ile Arg Arg Cys Gly His Ser Glu Asn Phe Phe Phe Ile Glu	
210 215 220	
gtg ggc cgt tct gcc gtg acg ggg ccc ggg gag ttc tgg atg cag gtg	1741
Val Gly Arg Ser Ala Val Thr Gly Pro Gly Glu Phe Trp Met Gln Val	
225 230 235 240	
gat gac tct gtg gtg gcc cag aac atg cac gag acc atc ctg gag gcc	1789
Asp Asp Ser Val Val Ala Gln Asn Met His Glu Thr Ile Leu Glu Ala	
245 250 255	
atg cgg gcc atg agt gat gag ttc cgc cct cgc agc aag agc cag tcc	1837
Met Arg Ala Met Ser Asp Glu Phe Arg Pro Arg Ser Lys Ser Gln Ser	
260 265 270	
tcg tcc aac tgc tct aac ccc atc agc gtc ccc ctg cgc cgg cac cat	1885
Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser Val Pro Leu Arg Arg His His	
275 280 285	
ctc aac aat ccc ccg ccc agc cag gtg ggg ctg acc cgc cga tca cgc	1933
Leu Asn Asn Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg Arg Ser Arg	
290 295 300	
act gag agc atc acc gcc acc tcc ccg gcc agc atg gtg ggc ggg aag	1981
Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val Gly Gly Lys	
305 310 315 320	
cca ggc tcc ttc cgt gtc cgc gcc tcc agt gac ggc gaa ggc acc atg	2029
Pro Gly Ser Phe Arg Val Arg Ala Ser Ser Asp Gly Glu Gly Thr Met	
325 330 335	
tcc cgc cca gcc tcg gtg gac ggc agc cct gtg agt ccc agc acc aac	2077
Ser Arg Pro Ala Ser Val Asp Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn	
340 345 350	
aga acc cac gcc cac cgg cat cgg ggc agc gcc cgg ctg cac ccc ccg	2125
Arg Thr His Ala His Arg His Arg Gly Ser Ala Arg Leu His Pro Pro	
355 360 365	
ctc aac cac agc cgc tcc atc ccc atg ccg gct tcc cgc tgc tcg cct	2173
Leu Asn His Ser Arg Ser Ile Pro Met Pro Ala Ser Arg Cys Ser Pro	

370	375	380	
tcg gcc acc agc ccg gtc agt ctg tcg tcc agt agc acc agt ggc cat 2221			
Ser Ala Thr Ser Pro Val Ser Leu Ser Ser Ser Thr Ser Gly His			
385	390	395	400
ggc tcc acc tcg gat tgt ctc ttc cca ccg cga tct agt gct tcg gtg 2269			
Gly Ser Thr Ser Asp Cys Leu Phe Pro Arg Arg Ser Ser Ala Ser Val			
405	410	415	
tct ggt tcc ccc agc gat ggc ggt ttc atc tcc tcg gat gag tat ggc 2317			
Ser Gly Ser Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ile Ser Ser Asp Glu Tyr Gly			
420	425	430	
tcc agt ccc tgc gat ttc ccg agt tcc ttc cgc agt gtc act ccg gat 2365			
Ser Ser Pro Cys Asp Phe Arg Ser Ser Phe Arg Ser Val Thr Pro Asp			
435	440	445	
tcc ctg ggc cac acc cca cca gcc cgc ggt gag gag gag cta agc aac 2413			
Ser Leu Gly His Thr Pro Pro Ala Arg Gly Glu Glu Leu Ser Asn			
450	455	460	
tat atc tgc atg ggt ggc aag ggg ccc tcc acc ctg acc gcc ccc aac 2461			
Tyr Ile Cys Met Gly Gly Lys Gly Pro Ser Thr Leu Thr Ala Pro Asn			
465	470	475	480
ggc cac tac att ttg tct ccg ggt ggc aat ggc cac cgc tgc acc cca 2509			
Gly His Tyr Ile Leu Ser Arg Gly Gly Asn Gly His Arg Cys Thr Pro			
485	490	495	
gga aca ggc ttg ggc acg agt cca gcc ttg gct ggg gat gaa gca gcc 2557			
Gly Thr Gly Leu Gly Thr Ser Pro Ala Leu Ala Gly Asp Glu Ala Ala			
500	505	510	
agt gct gca gat ctg gat aat ccg ttc cga aag aga act cac tcg gca 2605			
Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn Arg Phe Arg Lys Arg Thr His Ser Ala			
515	520	525	
ggc aca tcc cct acc att acc cac cag aag acc ccg tcc cag tcc tca 2653			
Gly Thr Ser Pro Thr Ile Thr His Gln Lys Thr Pro Ser Gln Ser Ser			
530	535	540	
gtg gct tcc att gag gag tac aca gag atg atg cct gcc tac cca cca 2701			
Val Ala Ser Ile Glu Glu Tyr Thr Glu Met Met Pro Ala Tyr Pro Pro			
545	550	555	560
gga ggt ggc agt gga ggc cga ctg ccg gga cac agg cac tcc gcc ttc 2749			
Gly Gly Ser Gly Gly Arg Leu Pro Gly His Arg His Ser Ala Phe			
565	570	575	
gtg ccc acc cgc tcc tac cca gag gag ggt ctg gaa atg cac ccc ttg 2797			
Val Pro Thr Arg Ser Tyr Pro Glu Glu Gly Leu Glu Met His Pro Leu			
580	585	590	
gag cgt cgg ggg ggg cac cac cgc cca gac agc tcc acc ctc cac acg 2845			
Glu Arg Arg Gly Gly His His Arg Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr			
595	600	605	
gat gat ggc tac atg ccc atg tcc cca ggg gtg gcc cca gtg ccc agt 2893			
Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser			
610	615	620	
ggc cga aag ggc agt gga gac tat atg ccc atg agc ccc aag agc gta 2941			

Gly Arg Lys Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys Ser Val				
625	630	635	640	
tct gcc cca cag cag atc atc aat ccc atc aga cgc cat ccc cag aga				2989
Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg Arg His Pro Gln Arg				
645				655
gtg gac ccc aat ggc tac atg atg tcc ccc agc ggt ggc tgc tct				3037
Val Asp Pro Asn Gly Tyr Met Met Ser Pro Ser Gly Gly Cys Ser				
660				670
cct gac att gga ggt ggc ccc agc agc agc agc agc aac gcc				3085
Pro Asp Ile Gly Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Asn Ala				
675				685
gtc cct tcc ggg acc agc tat gga aag ctg tgg aca aac ggg gta ggg				3133
Val Pro Ser Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Trp Thr Asn Gly Val Gly				
690				700
ggc cac cac tct cat gtc ttg cct cac ccc aaa ccc cca gtg gag agc				3181
Gly His His Ser His Val Leu Pro His Pro Lys Pro Pro Val Glu Ser				
705				720
agc ggt ggt aag ctc tta cct tgc aca ggt gac tac atg aac atg tca				3229
Ser Gly Gly Lys Leu Leu Pro Cys Thr Gly Asp Tyr Met Asn Met Ser				
725				735
cca gtg ggg gac tcc aac acc agc agc ccc tcc gac tgc tac tac ggc				3277
Pro Val Gly Asp Ser Asn Thr Ser Pro Ser Asp Cys Tyr Tyr Gly				
740				750
cct gag gac ccc cag cac aag cca gtc ctc tcc tac tac tca ttg cca				3325
Pro Glu Asp Pro Gln His Lys Pro Val Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Pro				
755				765
aga tcc ttt aag cac acc cag cgc ccc ggg gag ccg gag gag ggt gcc				3373
Arg Ser Phe Lys His Thr Gln Arg Pro Gly Glu Pro Glu Glu Gly Ala				
770				780
cgg cat cag cac ctc cgc ctt tcc act agc tct ggt cgc ctt ctc tat				3421
Arg His Gln His Leu Arg Leu Ser Thr Ser Ser Gly Arg Leu Leu Tyr				
785				800
gct gca aca gca gat gat tct tcc tct tcc acc agc agc gac agc ctg				3469
Ala Ala Thr Ala Asp Asp Ser Ser Ser Thr Ser Ser Asp Ser Leu				
805				815
ggt ggg gga tac tgc ggg gct agg ctg gag ccc agc ctt cca cat ccc				3517
Gly Gly Gly Tyr Cys Gly Ala Arg Leu Glu Pro Ser Leu Pro His Pro				
820				830
cac cat cag gtt ctg cag ccc cat ctg cct cga aag gtg gac aca gct				3565
His His Gln Val Leu Gln Pro His Leu Pro Arg Lys Val Asp Thr Ala				
835				845
gct cag acc aat agc cgc ctg gcc cgg ccc acg agg ctg tcc ctg ggg				3613
Ala Gln Thr Asn Ser Arg Leu Ala Arg Pro Thr Arg Leu Ser Leu Gly				
850				860
gat ccc aag gcc agc acc tta cct cgg gcc cga gag cag cag cag cag				3661
Asp Pro Lys Ala Ser Thr Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Gln Gln				
865				880

cag cag ccc ttg ctg cac cct cca gag ccc aag agc ccg ggg gaa tat	3709
Gln Gln Pro Leu Leu His Pro Pro Glu Pro Lys Ser Pro Gly Glu Tyr	
885 890 895	
gtc aat att gaa ttt ggg agt gat cag tct ggc tac ttg tct ggc ccg	3757
Val Asn Ile Glu Phe Gly Ser Asp Gln Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Pro	
900 905 910	
gtg gct ttc cac agc tca cct tct gtc agg tgt cca tcc cag ctc cag	3805
Val Ala Phe His Ser Ser Pro Ser Val Arg Cys Pro Ser Gln Leu Gln	
915 920 925	
cca gct ccc aga gag gaa gag act ggc act gag gag tac atg aag atg	3853
Pro Ala Pro Arg Glu Glu Thr Gly Thr Glu Glu Tyr Met Lys Met	
930 935 940	
gac ctg ggg ccg ggc cg agg gca gcc tgg cag gag agc act ggg gtc	3901
Asp Leu Gly Pro Gly Arg Arg Ala Ala Trp Gln Glu Ser Thr Gly Val	
945 950 955 960	
gag atg ggc aga ctg ggc cct gca cct ccc ggg gct gct agc att tgc	3949
Glu Met Gly Arg Leu Gly Pro Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ser Ile Cys	
965 970 975	
agg cct acc cgg gca gtg ccc agc agc cgg ggt gac tac atg acc atg	3997
Arg Pro Thr Arg Ala Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Tyr Met Thr Met	
980 985 990	
cag atg agt tgt ccc cgt cag agc tac gtg gac acc tcg cca gct gcc	4045
Gln Met Ser Cys Pro Arg Gln Ser Tyr Val Asp Thr Ser Pro Ala Ala	
995 1000 1005	
cct gta agc tat gct gac atg cga aca ggc att gct gca gag gag	4090
Pro Val Ser Tyr Ala Asp Met Arg Thr Gly Ile Ala Ala Glu Glu	
1010 1015 1020	
gtg agc ctg ccc agg gcc acc atg gct gct gcc tcc tca tcc tca	4135
Val Ser Leu Pro Arg Ala Thr Met Ala Ala Ser Ser Ser Ser	
1025 1030 1035	
gca gcc tct gct tcc ccg act ggg cct caa ggg gca gca gag ctg	4180
Ala Ala Ser Ala Ser Pro Thr Gly Pro Gln Gly Ala Ala Glu Leu	
1040 1045 1050	
gct gcc cac tcg tcc ctg ctg ggg ggc cca caa gga cct ggg ggc	4225
Ala Ala His Ser Ser Leu Leu Gly Gly Pro Gln Gly Pro Gly Gly	
1055 1060 1065	
atg agc gcc ttc acc cgg gtg aac ctc agt cct aac cgc aac cag	4270
Met Ser Ala Phe Thr Arg Val Asn Leu Ser Pro Asn Arg Asn Gln	
1070 1075 1080	
agt gcc aaa gtg atc cgt gca gac cca caa ggg tgc cgg cgg agg	4315
Ser Ala Lys Val Ile Arg Ala Asp Pro Gln Gly Cys Arg Arg Arg	
1085 1090 1095	
cat agc tcc gag act ttc tcc tca aca ccc agt gcc acc cgg gtg	4360
His Ser Ser Glu Thr Phe Ser Ser Thr Pro Ser Ala Thr Arg Val	
1100 1105 1110	
ggc aac aca gtg ccc ttt gga gcg ggg gca gca gta ggg ggc ggt	4405
Gly Asn Thr Val Pro Phe Gly Ala Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly	
1115 1120 1125	

ggc ggt	agc agc agc agc agc	gag gat gtg aaa cgc	cac agc tct	4450	
Gly Gly	Ser Ser Ser Ser Ser	Glu Asp Val Lys Arg	His Ser Ser		
1130	1135	1140			
gct tcc	ttt gag aat gtg tgg	ctg agg cct ggg gag	ctt ggg gga	4495	
Ala Ser	Phe Glu Asn Val	Trp Leu Arg Pro Gly	Glu Leu Gly Gly		
1145	1150	1155			
gcc ccc	aag gag cca gcc aaa	ctg tgt ggg gct gct	ggg ggt ttg	4540	
Ala Pro	Lys Glu Pro Ala Lys	Leu Cys Gly Ala Ala	Gly Gly Leu		
1160	1165	1170			
gag aat	ggt ctt aac tac ata	gac ctg gat ttg gtc	aag gac ttc	4585	
Glu Asn	Gly Leu Asn Tyr	Ile Asp Leu Asp Leu	Val Lys Asp Phe		
1175	1180	1185			
aaa cag	tgc cct cag gag tgc	acc cct gaa ccg cag	cct ccc cca	4630	
Lys Gln	Cys Pro Gln Glu Cys	Thr Pro Glu Pro Gln	Pro Pro Pro		
1190	1195	1200			
ccc cca	ccc cct cat caa ccc	ctg ggc agc ggt gag	agc agc tcc	4675	
Pro Pro	Pro Pro His Gln Pro	Leu Gly Ser Gly Glu	Ser Ser Ser		
1205	1210	1215			
acc cgc	cgc tca agt gag gat	tta agc gcc tat gcc	agc atc agt	4720	
Thr Arg	Arg Ser Ser Glu Asp	Leu Ser Ala Tyr Ala	Ser Ile Ser		
1220	1225	1230			
ttc cag	aag cag cca gag gac	cgt cag tag ctcaactgga	catcacagca	4770	
Phe Gln	Lys Gln Pro Glu Asp	Arg Gln			
1235	1240				
gaatgaagac	ctaaatgacc	tcagcaaatc	ctcttctaac	tcatgggtac	4830
aatatttcat	gattcacaac	taggaccta	tatcttcctc	atcagtagat	4890
atccatttca	gtttgtttac	tttatccaat	cctcaggatt	tcattgactg	4950
tctatattgt	gccaaagcgaa	aaaaaaaaat	gcactgtgac	accagaataa	5010
taaacttcat	cttcaacctt	aaggacttag	ctggccacag	tgagctgatg	5070
cgtgtcatga	gagaatgggt	ttactctcaa	tgcattttca	agatacattt	5130
tgaaactgtg	tacgacaaag	catcattgta	aattatttca	tacaaaactg	5190
gtggagagag	tattaaatat	ttaacatagg	ttttgattta	tatgtgtaat	5250
aaaatgtaac	ttttcttaca	gcacatctt	ttttggatg	tgggatggag	5310
ttctgttgta	aagagtggag	caaatgctt	aaacaaggct	taaaagagta	5370
tgatccttgt	tttaagattg	taattcagaa	aacataatat	aagaatcata	5430
tggttctcaa	ttgtatagtt	atattgctg	atactatctc	ttgtcatata	5490
tgagctgagt	tccttataag	aattaatctt	aattttgtat	ttttcctgt	5550
gccatgttaa	ttaaactgaa	gaaggatata	tttggctggg	tgtttcaaa	5610
aaattggtaa	ttgaatggaa	gcaaaattat	aagaagagga	aattaaagtc	5670

tgtattgtaa acagaaggag atgggtgatt cttcaattc aaaagcttc tttggaaatga 5730
 acaatgtggg cgttttaaa ttctggaaat gtcttctat tcataataaa ctagatactg 5790
 ttgatcttt 5800

<210> 29
 <211> 1242
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

Met Ala Ser Pro Pro Glu Ser Asp Gly Phe Ser Asp Val Arg Lys Val
 1 5 10 15

Gly Tyr Leu Arg Lys Pro Lys Ser Met His Lys Arg Phe Phe Val Leu
 20 25 30

Arg Ala Ala Ser Glu Ala Gly Gly Pro Ala Arg Leu Glu Tyr Tyr Glu
 35 40 45

Asn Glu Lys Lys Trp Arg His Lys Ser Ser Ala Pro Lys Arg Ser Ile
 50 55 60

Pro Leu Glu Ser Cys Phe Asn Ile Asn Lys Arg Ala Asp Ser Lys Asn
 65 70 75 80

Lys His Leu Val Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Glu His Phe Ala Ile Ala
 85 90 95

Ala Asp Ser Glu Ala Glu Gln Asp Ser Trp Tyr Gln Ala Leu Leu Gln
 100 105 110

Leu His Asn Arg Ala Lys Gly His His Asp Gly Ala Ala Ala Leu Gly
 115 120 125

Ala Gly Gly Gly Gly Ser Cys Ser Gly Ser Ser Gly Leu Gly Glu
 130 135 140

Ala Gly Glu Asp Leu Ser Tyr Gly Asp Val Pro Pro Gly Pro Ala Phe
 145 150 155 160

Lys Glu Val Trp Gln Val Ile Leu Lys Pro Lys Gly Leu Gly Gln Thr
 165 170 175

Lys Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg Leu Cys Leu Thr Ser Lys Thr Ile
 180 185 190

Ser Phe Val Lys Leu Asn Ser Glu Ala Ala Val Val Leu Gln Leu
 195 200 205

Met Asn Ile Arg Arg Cys Gly His Ser Glu Asn Phe Phe Ile Glu
 210 215 220

Val Gly Arg Ser Ala Val Thr Gly Pro Gly Glu Phe Trp Met Gln Val
 225 230 235 240

Asp Asp Ser Val Val Ala Gln Asn Met His Glu Thr Ile Leu Glu Ala
 245 250 255

Met Arg Ala Met Ser Asp Glu Phe Arg Pro Arg Ser Lys Ser Gln Ser

260	265	270
Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser Val Pro Leu Arg Arg His His		
275	280	285
Leu Asn Asn Pro Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg Arg Ser Arg		
290	295	300
Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val Gly Gly Lys		
305	310	315
Pro Gly Ser Phe Arg Val Arg Ala Ser Ser Asp Gly Glu Gly Thr Met		
325	330	335
Ser Arg Pro Ala Ser Val Asp Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn		
340	345	350
Arg Thr His Ala His Arg His Arg Gly Ser Ala Arg Leu His Pro Pro		
355	360	365
Leu Asn His Ser Arg Ser Ile Pro Met Pro Ala Ser Arg Cys Ser Pro		
370	375	380
Ser Ala Thr Ser Pro Val Ser Leu Ser Ser Ser Ser Thr Ser Gly His		
385	390	395
Gly Ser Thr Ser Asp Cys Leu Phe Pro Arg Arg Ser Ser Ala Ser Val		
405	410	415
Ser Gly Ser Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ile Ser Ser Asp Glu Tyr Gly		
420	425	430
Ser Ser Pro Cys Asp Phe Arg Ser Ser Phe Arg Ser Val Thr Pro Asp		
435	440	445
Ser Leu Gly His Thr Pro Pro Ala Arg Gly Glu Glu Leu Ser Asn		
450	455	460
Tyr Ile Cys Met Gly Gly Lys Gly Pro Ser Thr Leu Thr Ala Pro Asn		
465	470	475
Gly His Tyr Ile Leu Ser Arg Gly Gly Asn Gly His Arg Cys Thr Pro		
485	490	495
Gly Thr Gly Leu Gly Thr Ser Pro Ala Leu Ala Gly Asp Glu Ala Ala		
500	505	510
Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn Arg Phe Arg Lys Arg Thr His Ser Ala		
515	520	525
Gly Thr Ser Pro Thr Ile Thr His Gln Lys Thr Pro Ser Gln Ser Ser		
530	535	540
Val Ala Ser Ile Glu Glu Tyr Thr Glu Met Met Pro Ala Tyr Pro Pro		
545	550	555
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Arg Leu Pro Gly His Arg His Ser Ala Phe		
565	570	575
Val Pro Thr Arg Ser Tyr Pro Glu Glu Gly Leu Glu Met His Pro Leu		
580	585	590
Glu Arg Arg Gly Gly His His Arg Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr		

595	600	605
-----	-----	-----

Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser		
610	615	620

Gly Arg Lys Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys Ser Val		
625	630	635
		640

Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg Arg His Pro Gln Arg		
645	650	655

Val Asp Pro Asn Gly Tyr Met Met Ser Pro Ser Gly Gly Cys Ser		
660	665	670

Pro Asp Ile Gly Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Asn Ala		
675	680	685

Val Pro Ser Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Trp Thr Asn Gly Val Gly		
690	695	700

Gly His His Ser His Val Leu Pro His Pro Lys Pro Pro Val Glu Ser		
705	710	715
		720

Ser Gly Gly Lys Leu Leu Pro Cys Thr Gly Asp Tyr Met Asn Met Ser		
725	730	735

Pro Val Gly Asp Ser Asn Thr Ser Ser Pro Ser Asp Cys Tyr Tyr Gly		
740	745	750

Pro Glu Asp Pro Gln His Lys Pro Val Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Pro		
755	760	765

Arg Ser Phe Lys His Thr Gln Arg Pro Gly Glu Pro Glu Glu Gly Ala		
770	775	780

Arg His Gln His Leu Arg Leu Ser Thr Ser Ser Gly Arg Leu Leu Tyr		
785	790	795
		800

Ala Ala Thr Ala Asp Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Asp Ser Leu		
805	810	815

Gly Gly Gly Tyr Cys Gly Ala Arg Leu Glu Pro Ser Leu Pro His Pro		
820	825	830

His His Gln Val Leu Gln Pro His Leu Pro Arg Lys Val Asp Thr Ala		
835	840	845

Ala Gln Thr Asn Ser Arg Leu Ala Arg Pro Thr Arg Leu Ser Leu Gly		
850	855	860

Asp Pro Lys Ala Ser Thr Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Gln Gln Gln		
865	870	875
		880

Gln Gln Pro Leu Leu His Pro Pro Glu Pro Lys Ser Pro Gly Glu Tyr		
885	890	895

Val Asn Ile Glu Phe Gly Ser Asp Gln Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Pro		
900	905	910

Val Ala Phe His Ser Ser Pro Ser Val Arg Cys Pro Ser Gln Leu Gln		
915	920	925

Pro Ala Pro Arg Glu Glu Glu Thr Gly Thr Glu Glu Tyr Met Lys Met		
---	--	--

930

935

940

Asp Leu Gly Pro Gly Arg Arg Ala Ala Trp Gln Glu Ser Thr Gly Val
 945 950 955 960

Glu Met Gly Arg Leu Gly Pro Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ser Ile Cys
 965 970 975

Arg Pro Thr Arg Ala Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Tyr Met Thr Met
 980 985 990

Gln Met Ser Cys Pro Arg Gln Ser Tyr Val Asp Thr Ser Pro Ala Ala
 995 1000 1005

Pro Val Ser Tyr Ala Asp Met Arg Thr Gly Ile Ala Ala Glu Glu
 1010 1015 1020

Val Ser Leu Pro Arg Ala Thr Met Ala Ala Ala Ser Ser Ser Ser
 1025 1030 1035

Ala Ala Ser Ala Ser Pro Thr Gly Pro Gln Gly Ala Ala Glu Leu
 1040 1045 1050

Ala Ala His Ser Ser Leu Leu Gly Gly Pro Gln Gly Pro Gly Gly
 1055 1060 1065

Met Ser Ala Phe Thr Arg Val Asn Leu Ser Pro Asn Arg Asn Gln
 1070 1075 1080

Ser Ala Lys Val Ile Arg Ala Asp Pro Gln Gly Cys Arg Arg Arg
 1085 1090 1095

His Ser Ser Glu Thr Phe Ser Ser Thr Pro Ser Ala Thr Arg Val
 1100 1105 1110

Gly Asn Thr Val Pro Phe Gly Ala Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly
 1115 1120 1125

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Glu Asp Val Lys Arg His Ser Ser
 1130 1135 1140

Ala Ser Phe Glu Asn Val Trp Leu Arg Pro Gly Glu Leu Gly Gly
 1145 1150 1155

Ala Pro Lys Glu Pro Ala Lys Leu Cys Gly Ala Ala Gly Gly Leu
 1160 1165 1170

Glu Asn Gly Leu Asn Tyr Ile Asp Leu Asp Leu Val Lys Asp Phe
 1175 1180 1185

Lys Gln Cys Pro Gln Glu Cys Thr Pro Glu Pro Gln Pro Pro Pro
 1190 1195 1200

Pro Pro Pro Pro His Gln Pro Leu Gly Ser Gly Glu Ser Ser Ser
 1205 1210 1215

Thr Arg Arg Ser Ser Glu Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Ile Ser
 1220 1225 1230

Phe Gln Lys Gln Pro Glu Asp Arg Gln
 1235 1240

Revendications

1. Utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent actif une molécule d'acide nucléique qui consiste en la séquence SEQ ID NO: 3 ou un fragment de ladite séquence comprenant au moins douze nucléotides contigus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour le traitement de pathologies liées à l'angiogenèse.
5
2. Utilisation d'une molécule d'acide nucléique qui consiste en la séquence SEQ ID NO: 3 ou un fragment de ladite séquence comprenant au moins douze nucléotides contigus à titre d'agent actif et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour le traitement de pathologies liées à l'angiogenèse.
10
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle l'agent actif est associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable choisi parmi les suspensions aqueuses, les solutions salines isotoniques et les solutions stériles injectables.
15
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la composition se présente sous une forme adaptée à une administration par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse ou transdermique.
20
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la composition comprend de 0,001 mg à 50 mg d'agent actif.
25
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement des maladies de l'œil liées à la néovascularisation.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement de la néovascularisation cornéenne.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement des rétinopathies.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement de la rétinopathie diabétique.
10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).
- 5 11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement du psoriasis.
12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement de la superproduction tissulaire due à la cicatrisation.
- 10 13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement des tumeurs.
14. Molécule d'acide nucléique qui consiste en la SEQ ID NO: 3.
15. Molécule d'acide nucléique selon la revendication 14, pour une utilisation comme médicament pour le traitement de pathologies liées à l'angiogenèse.
- 15 16. Composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent actif une molécule d'acide nucléique selon la revendication 14 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
- 20 17. Composition pharmaceutique qui inhibe l'angiogenèse comprenant à titre d'agent actif une molécule d'acide nucléique qui consiste en la séquence SEQ ID NO: 3 ou un fragment de ladite séquence comprenant au moins douze nucléotides contigus choisis parmi SEQ ID NO : 6 à 23 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

NS : cellules non stimulées avec le bFGF
 s : cellules stimulées avec le bFGF

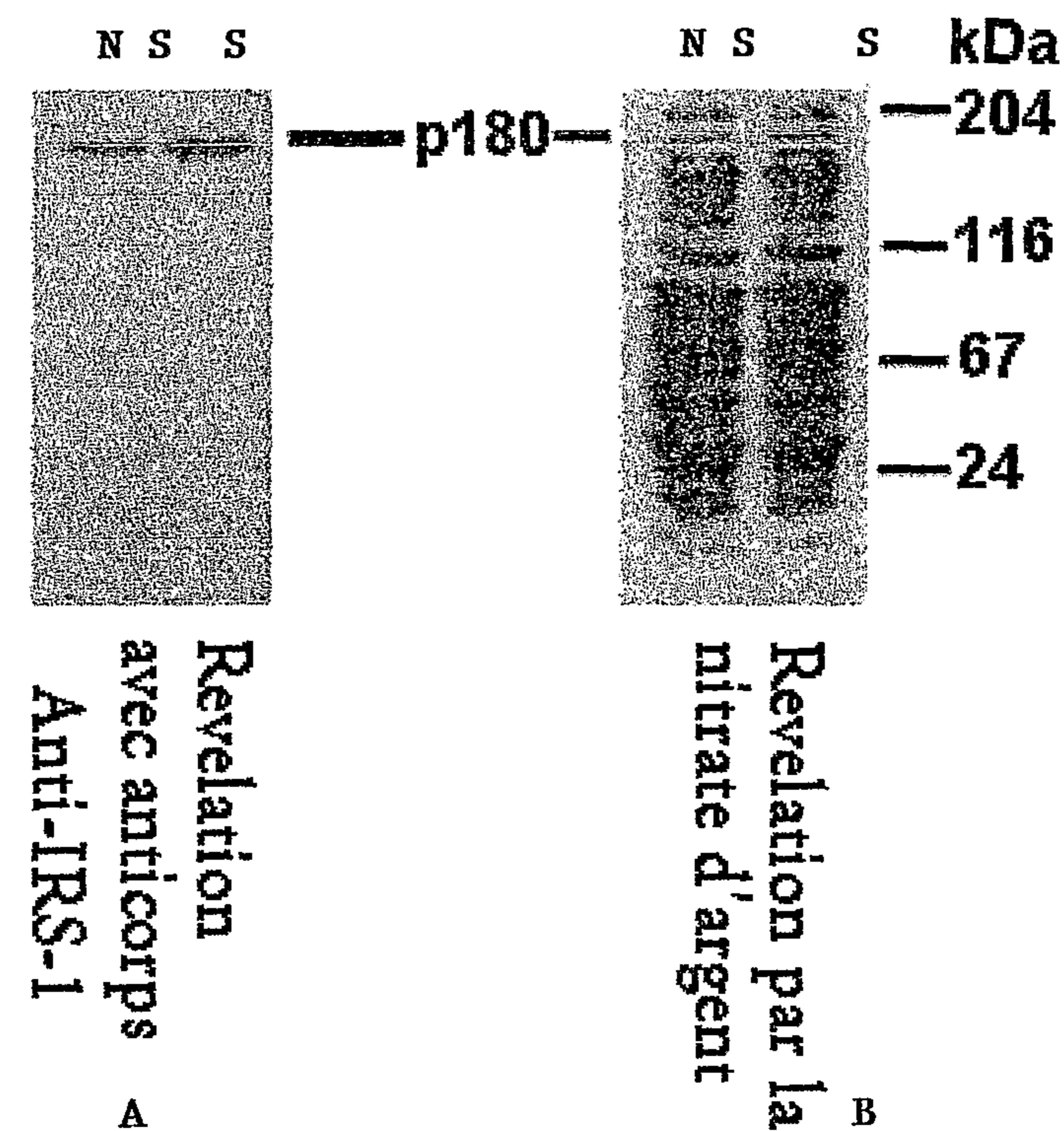
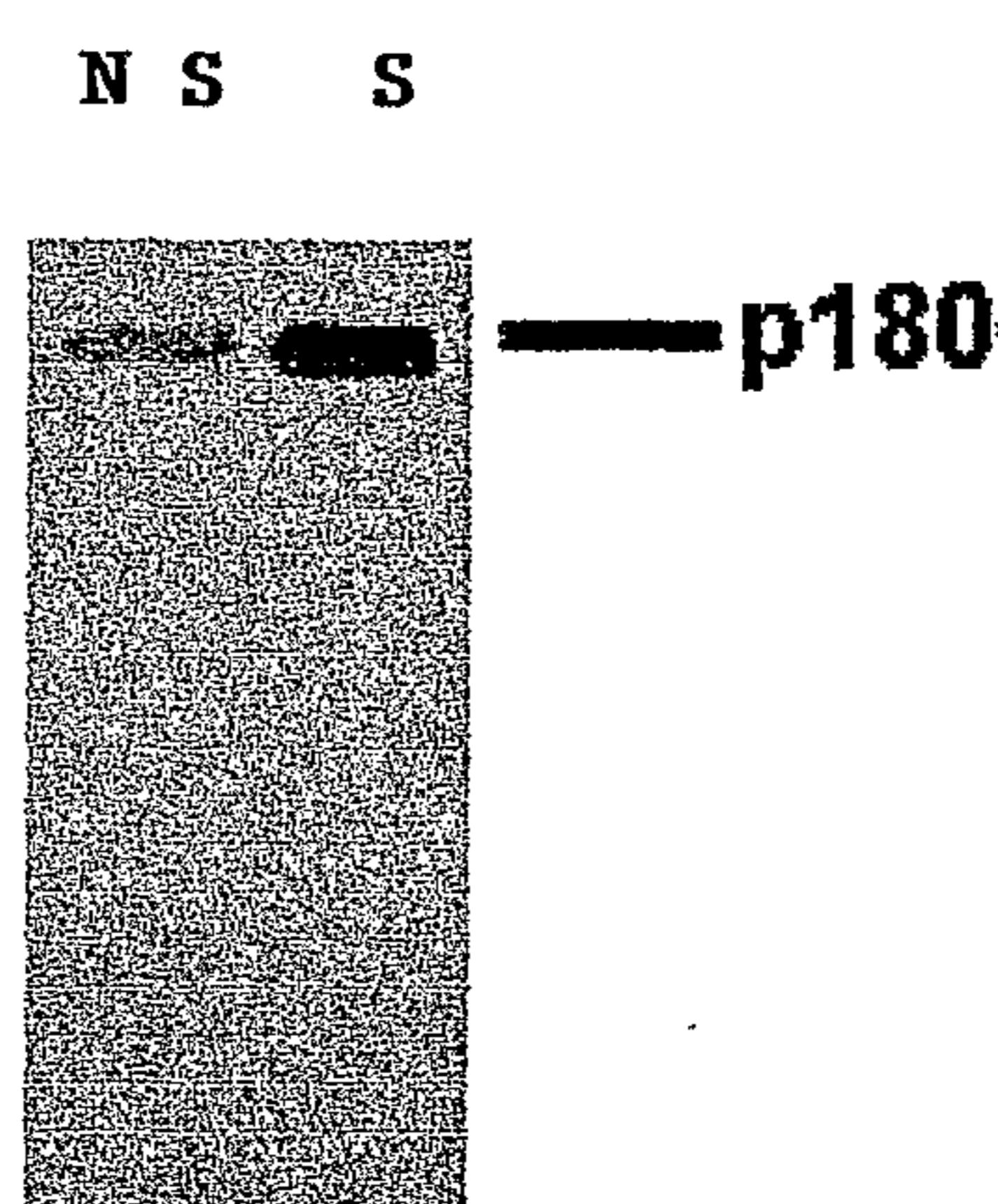


Fig.1

2/ 5

_N s: cellules non stimulées avec le bFGF
_s : cellules stimulées avec le bFGF



Revelation avec anticorps anti-phosphotyrosine

Fig.2

WO 02/103014

PCT/FR02/02067

3/5

LOT 4
LOT 3
LOT 2
LOT 1

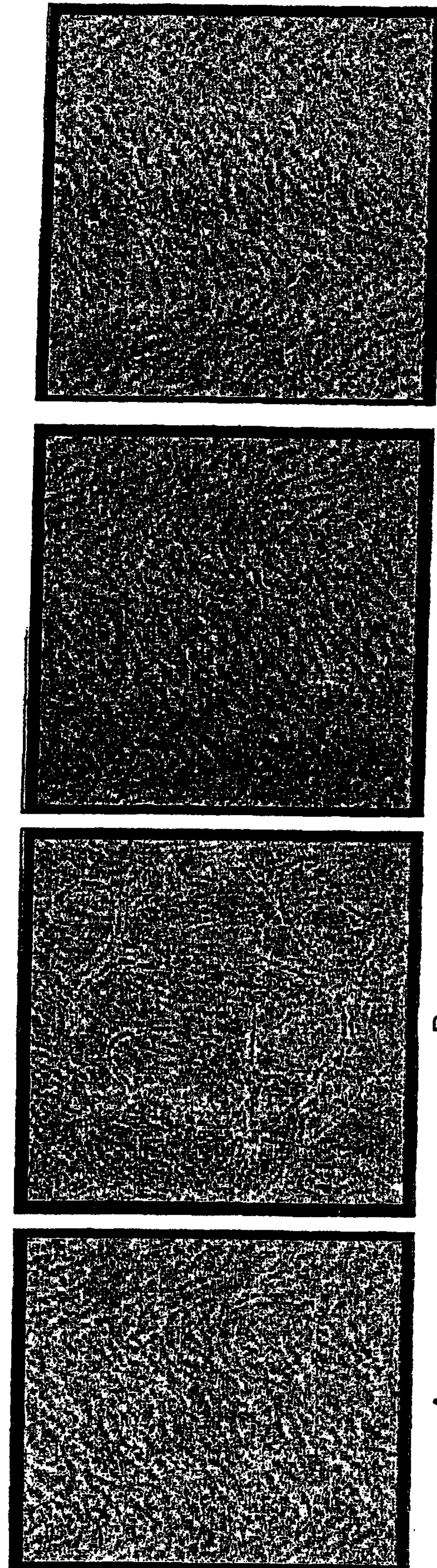


Fig.3

4/5



Figure 4A
Injections sous-conjonctivales
d'oligonucléotides antisens (60 μ M)

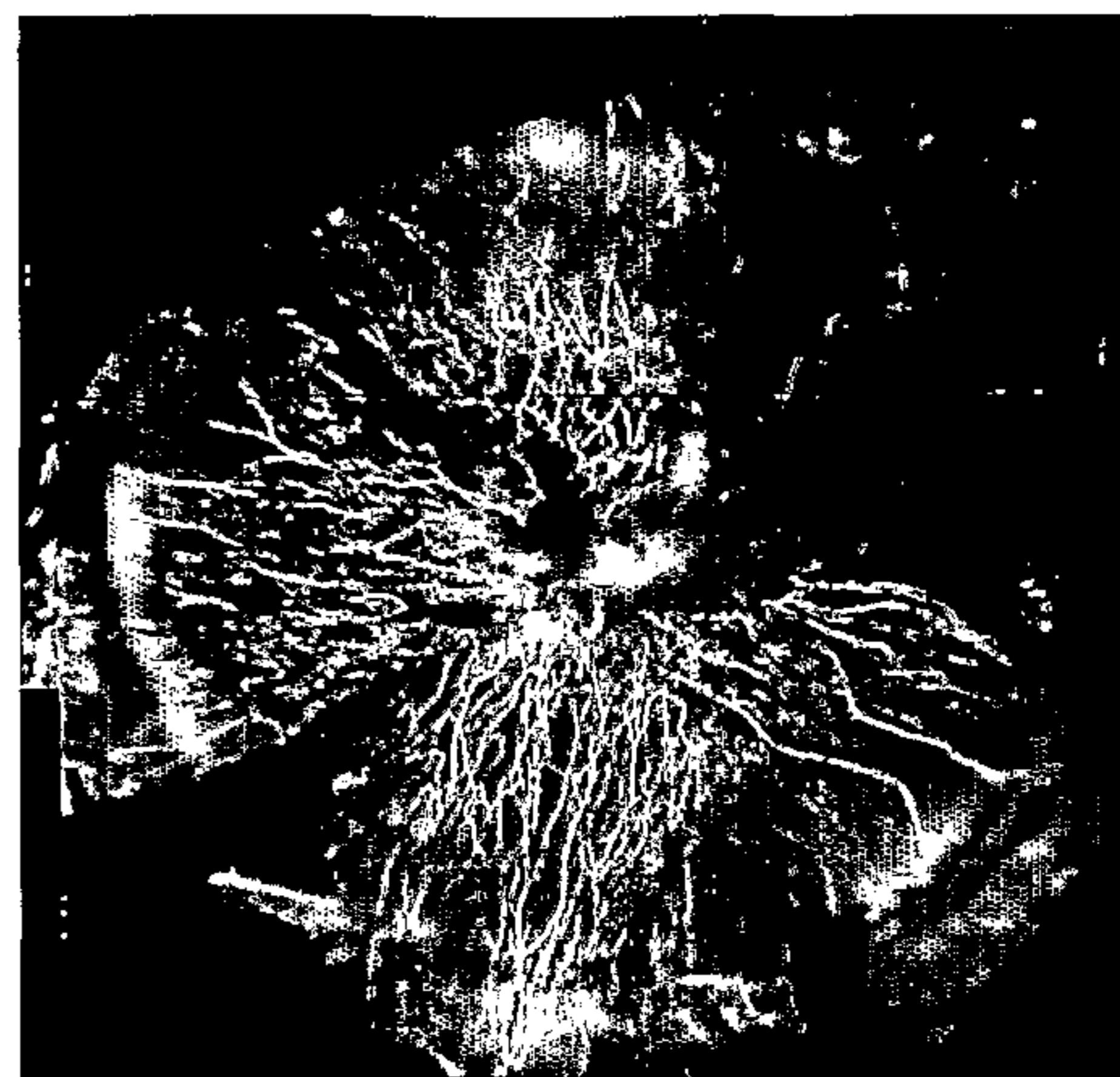


Figure 4B
Injections sous-conjonctivales
d'oligonucléotides sens (60 μ M)

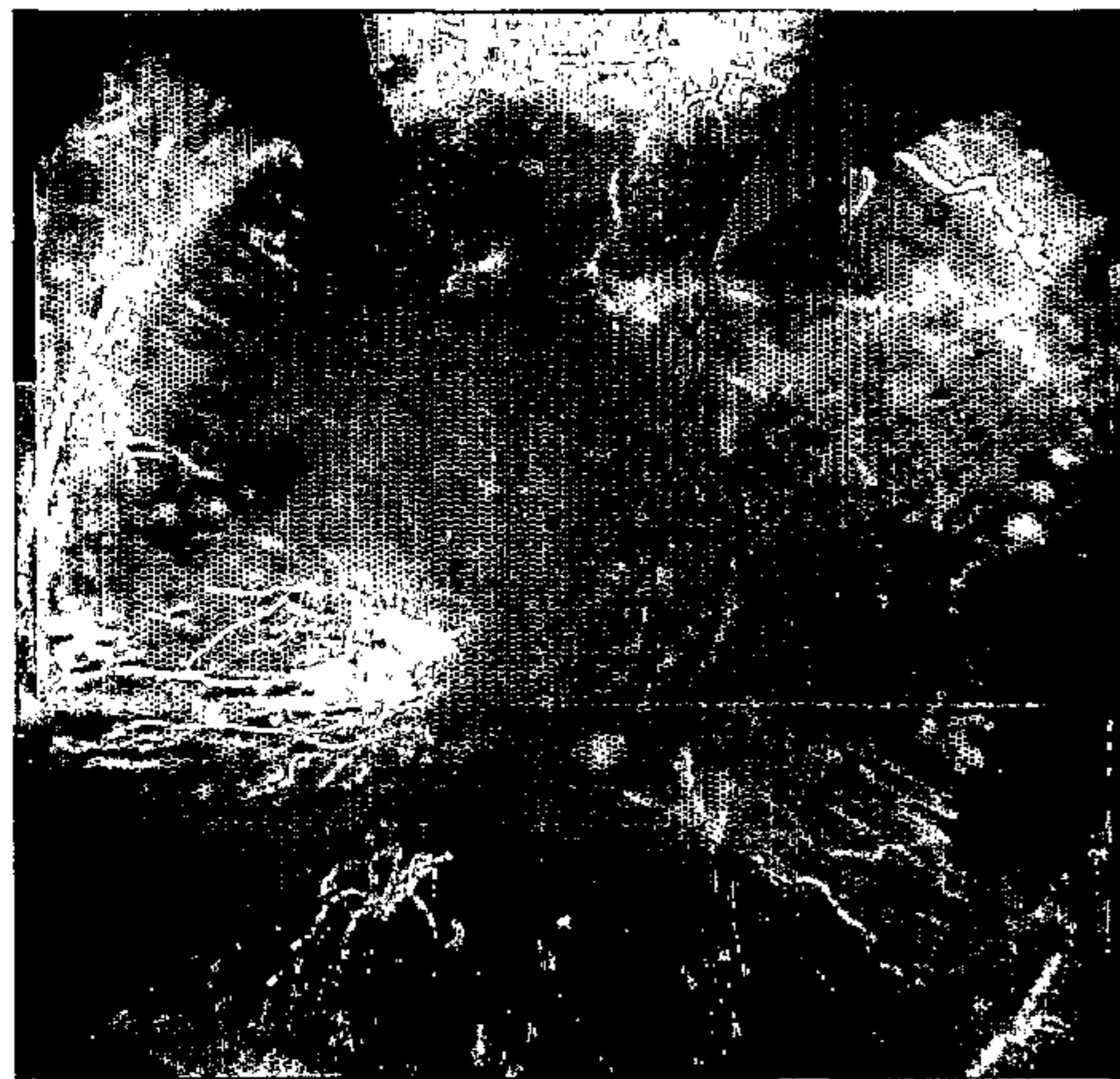


Figure 4C
Applications topiques
d'oligonucléotide antisens (200 μ M)

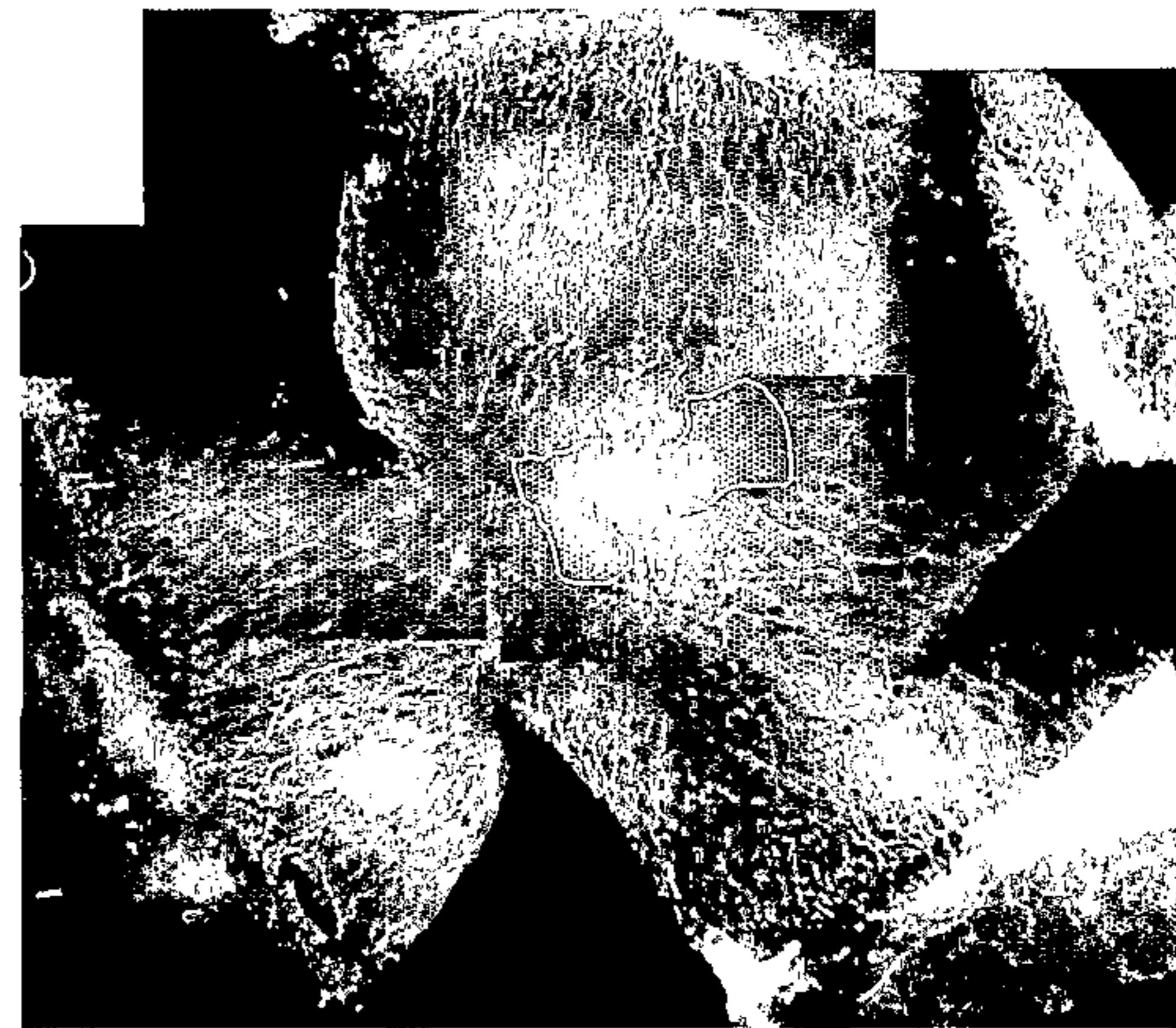


Figure 4D
Applications topiques
d'oligonucléotide sens (200 μ M)

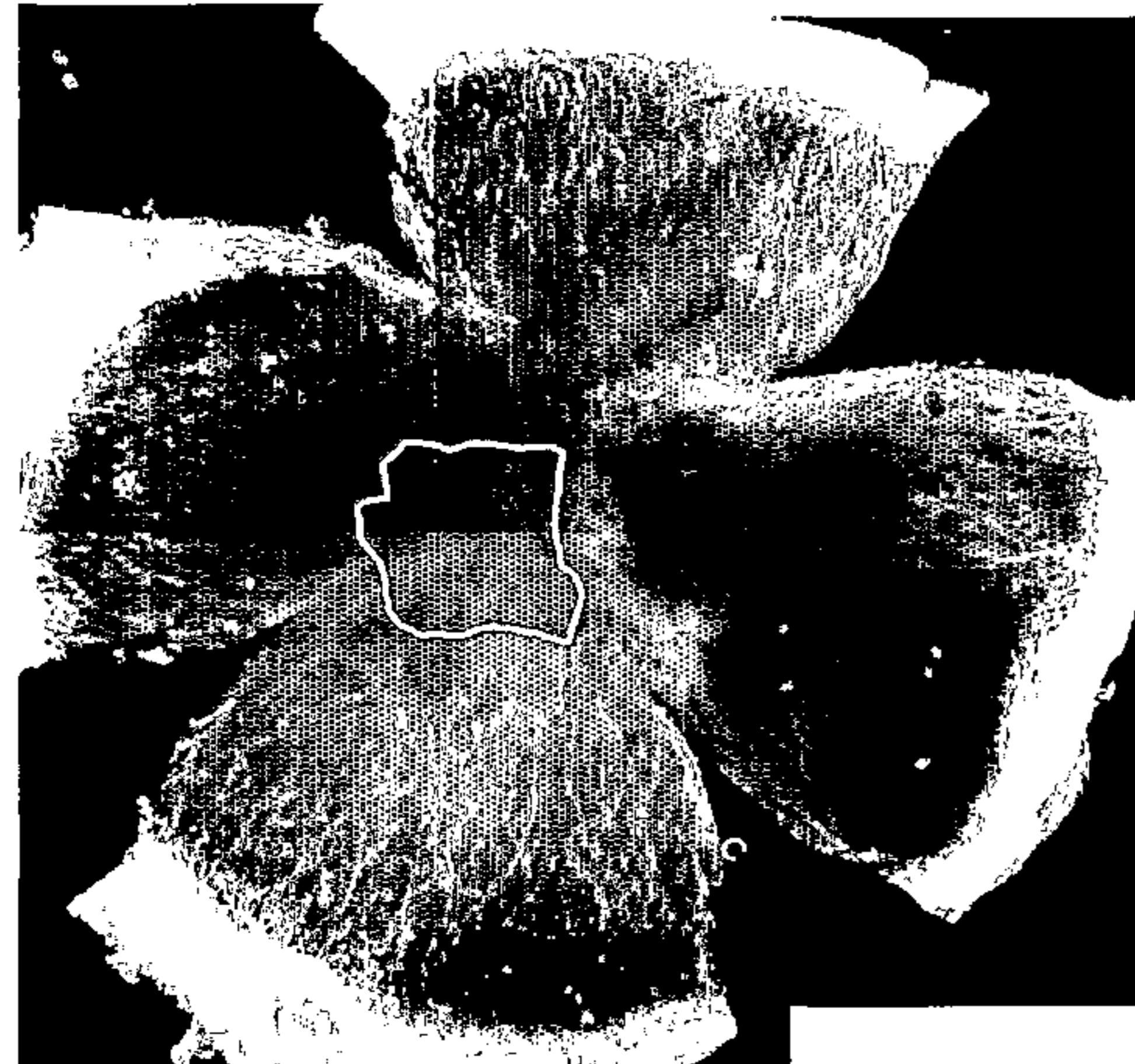


Figure 4E
Absence de traitement

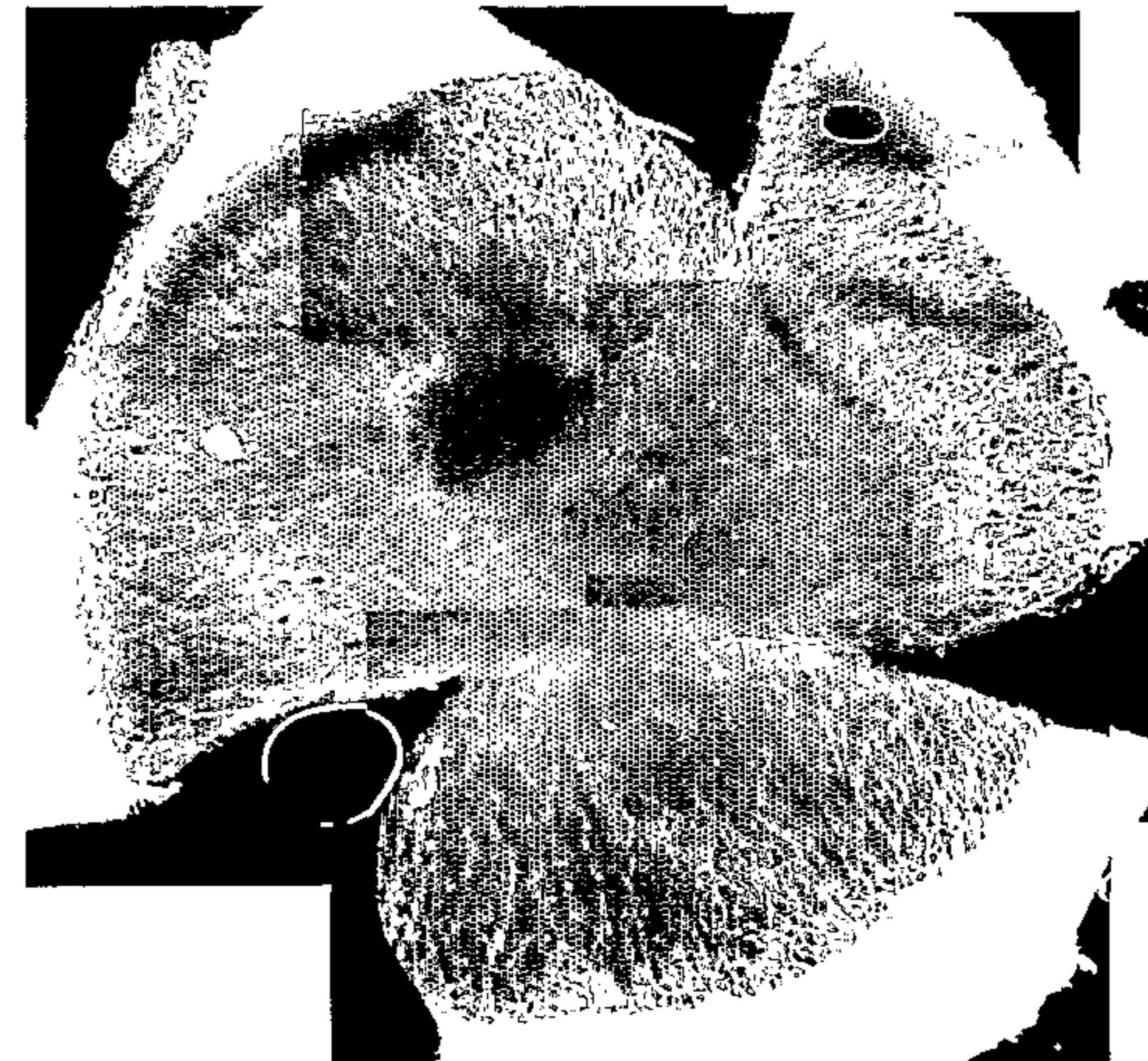


Figure 4F
Injections sous-conjonctivales de PBS

5/5

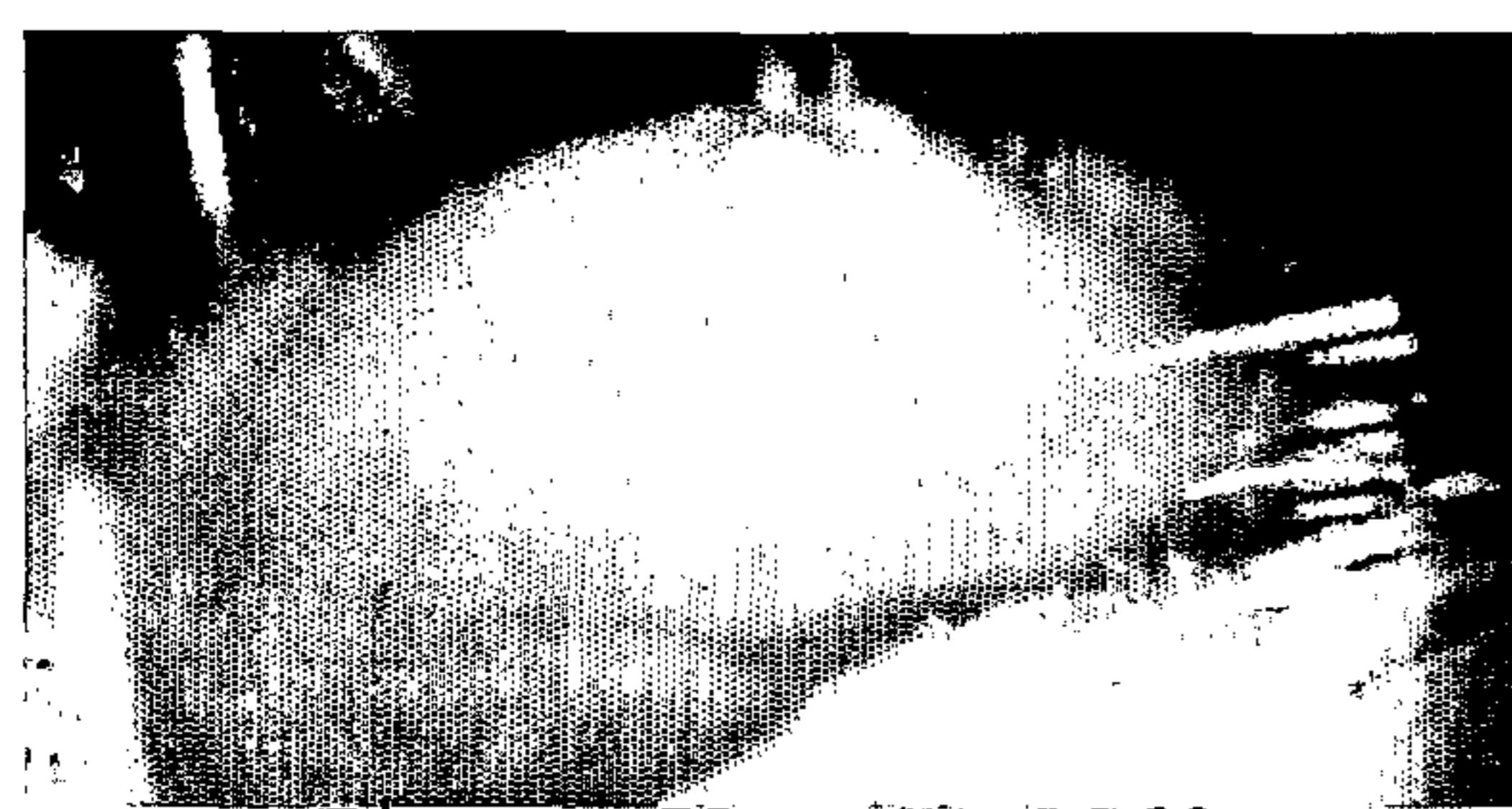


Figure 5A J4 AS60

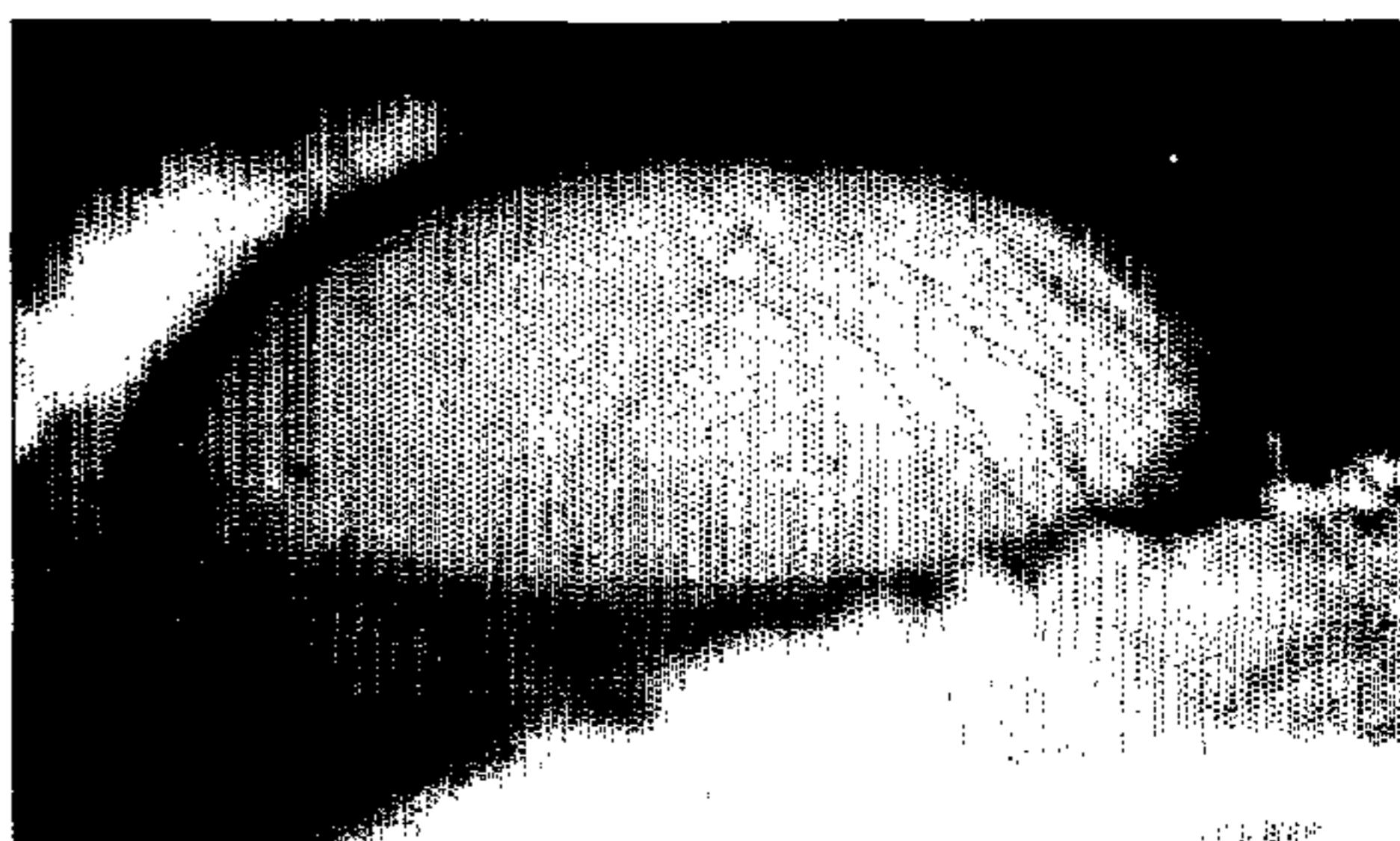


Figure 5F J9 AS60

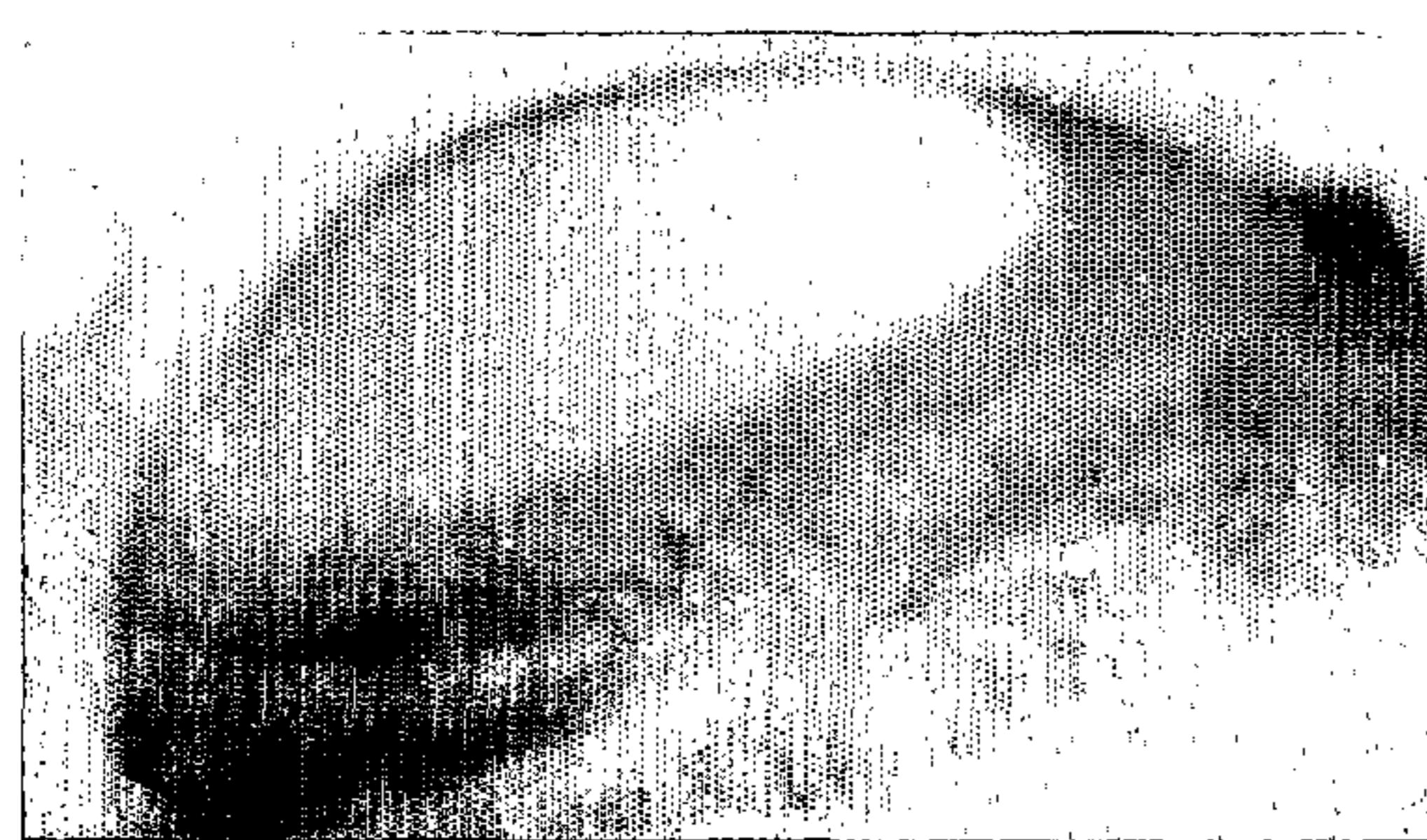


Figure 5B J4 AS200

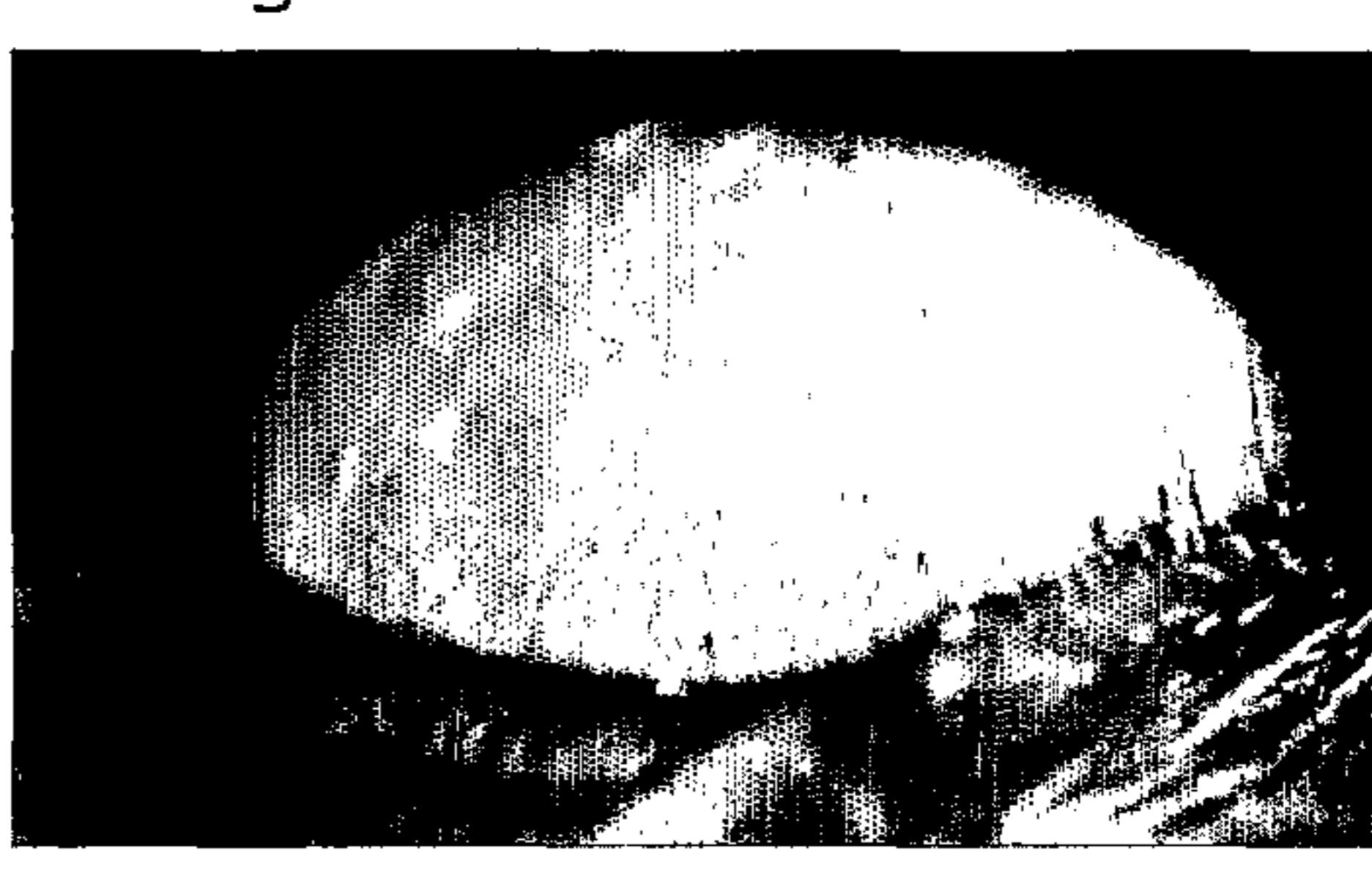


Figure 5G J9 AS200

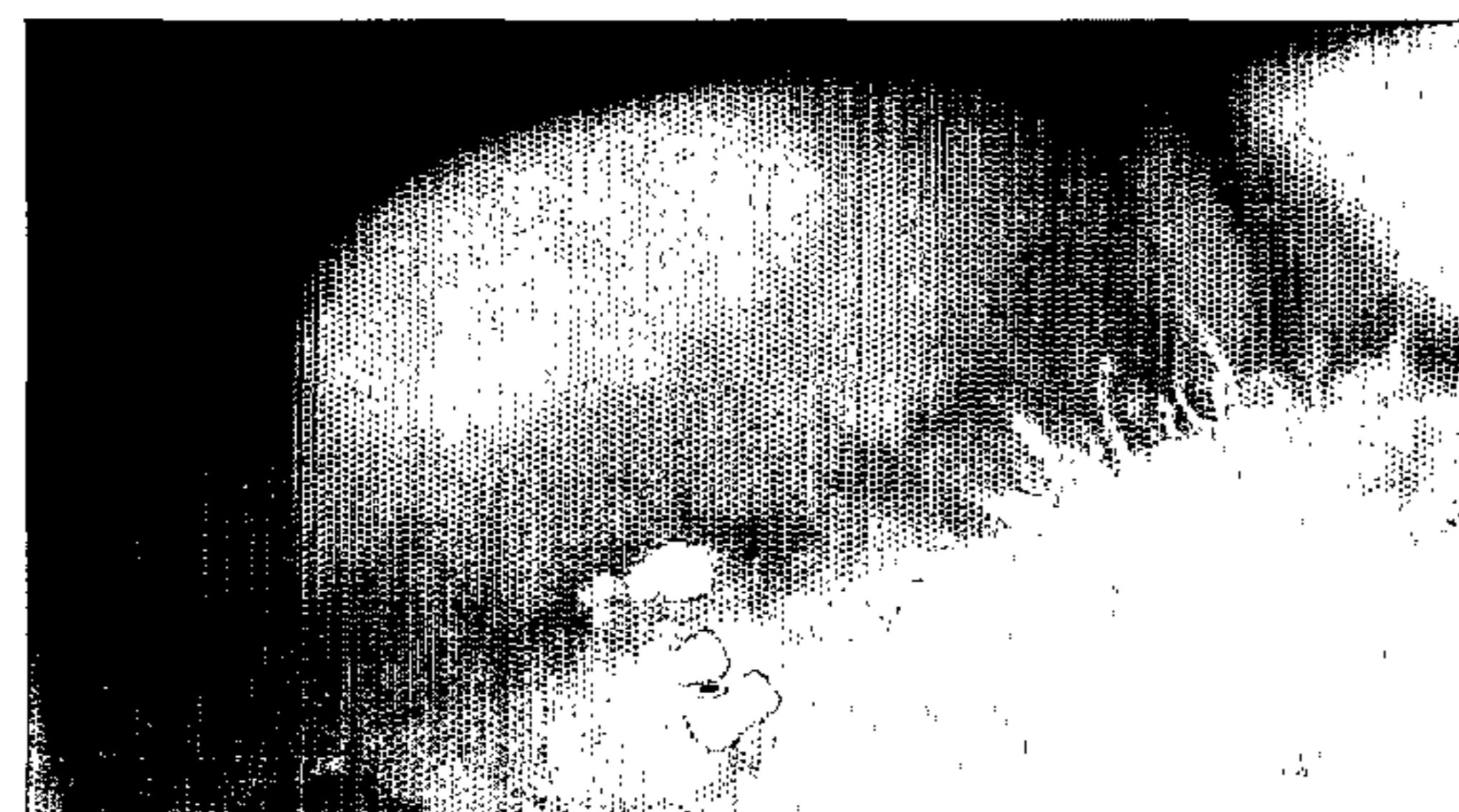


Figure 5C J4 S200

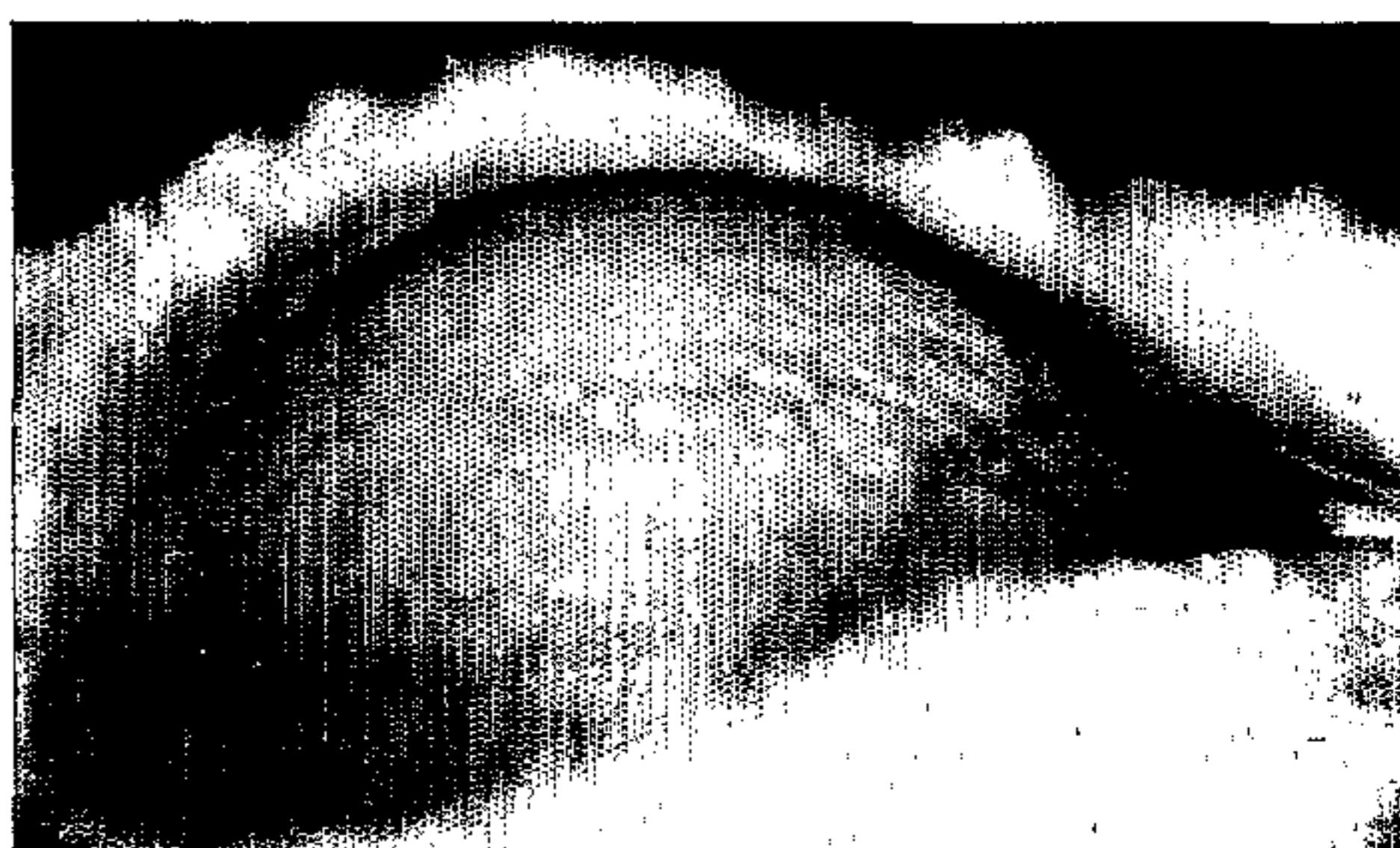


Figure 5H J9 S200

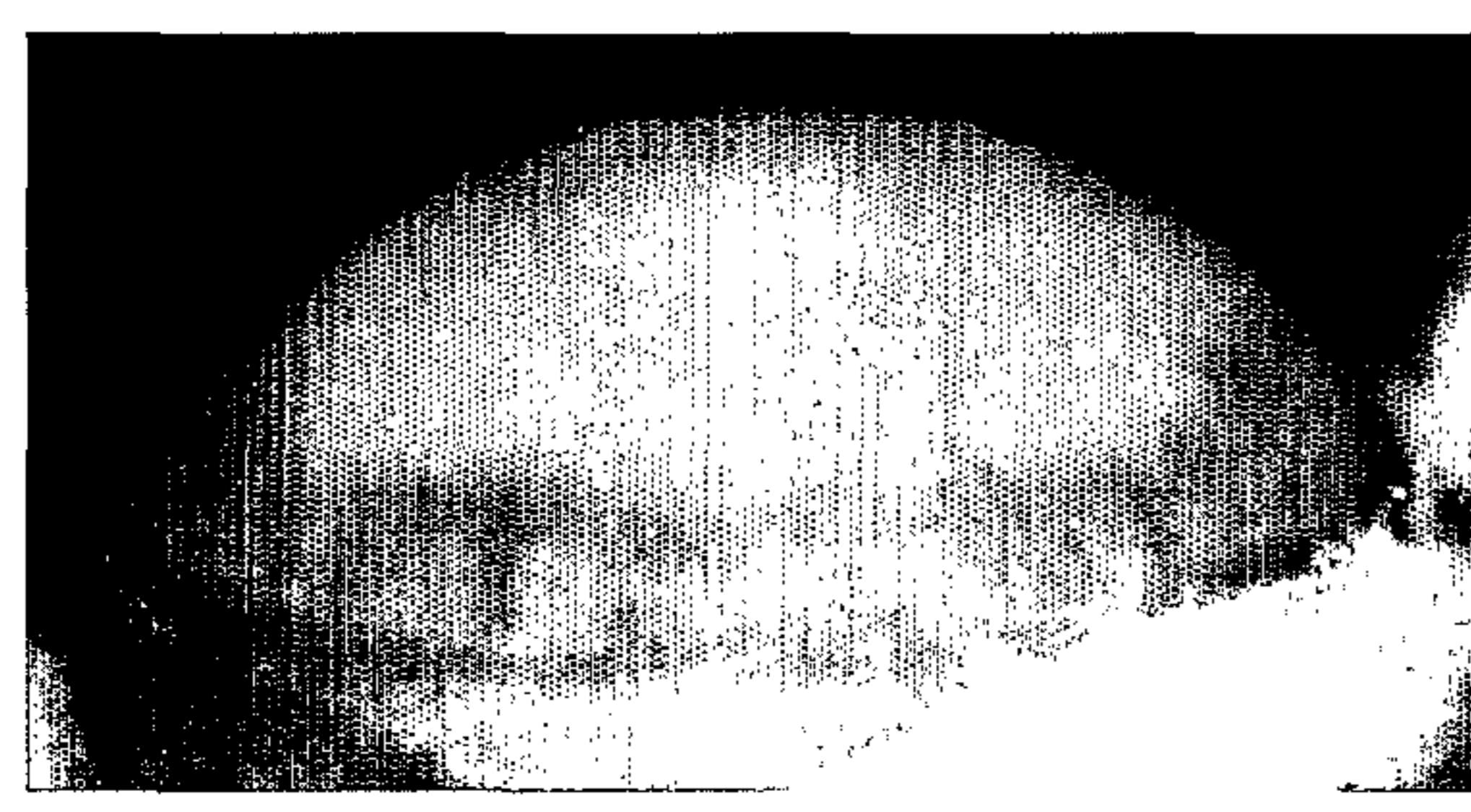


Figure 5D J4 PBS

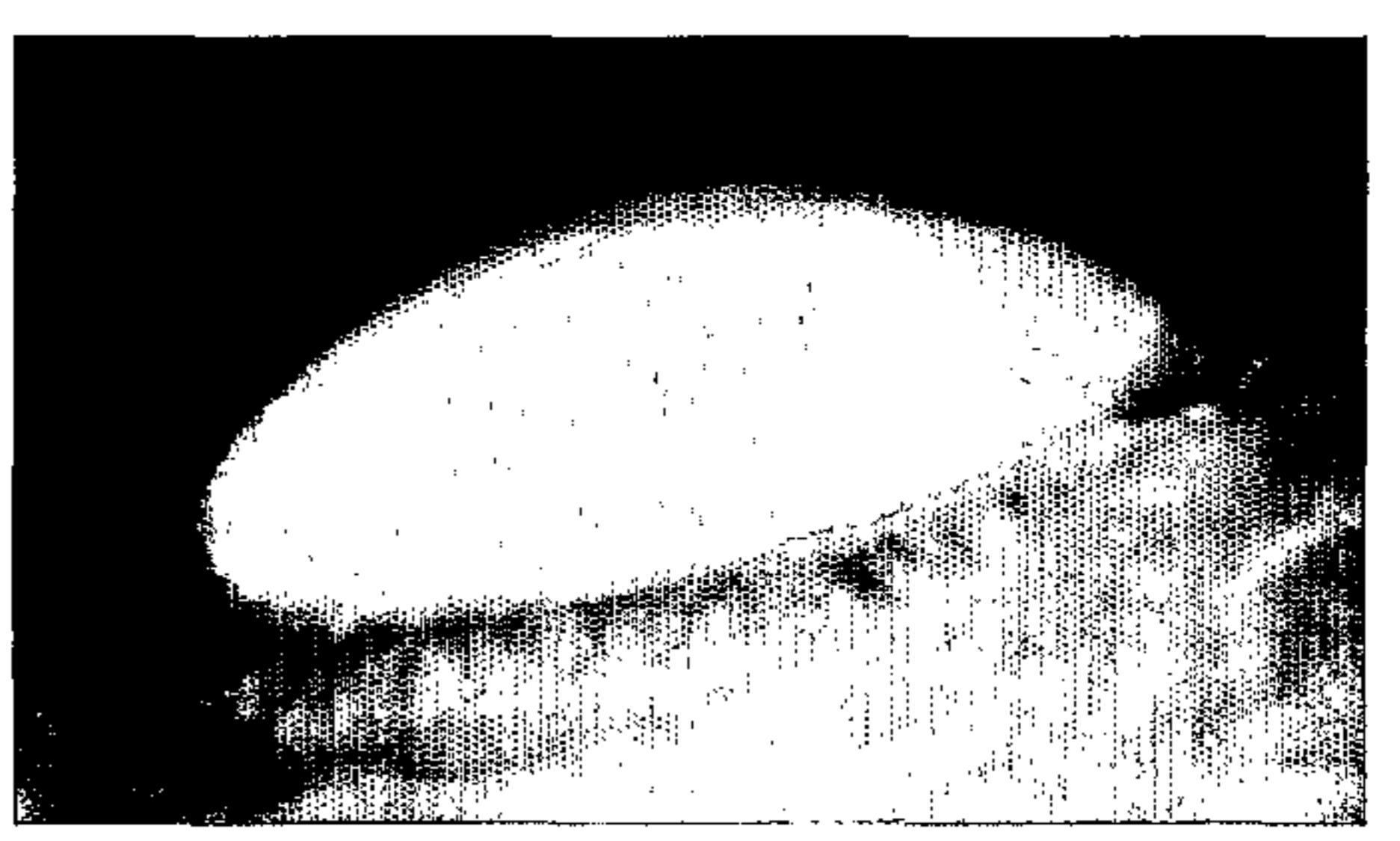


Figure 5I J9 PBS

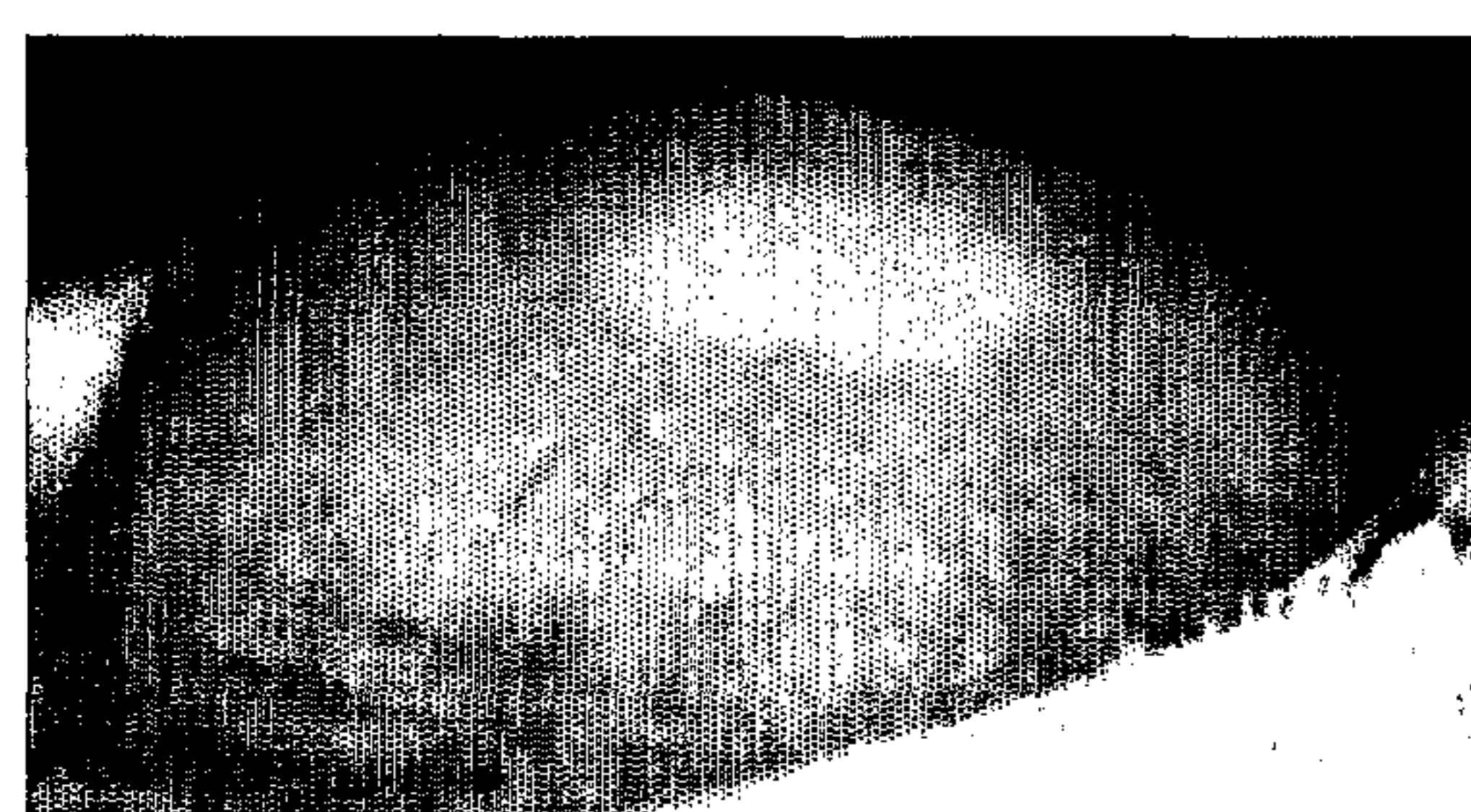


Figure 5E J4 OTt

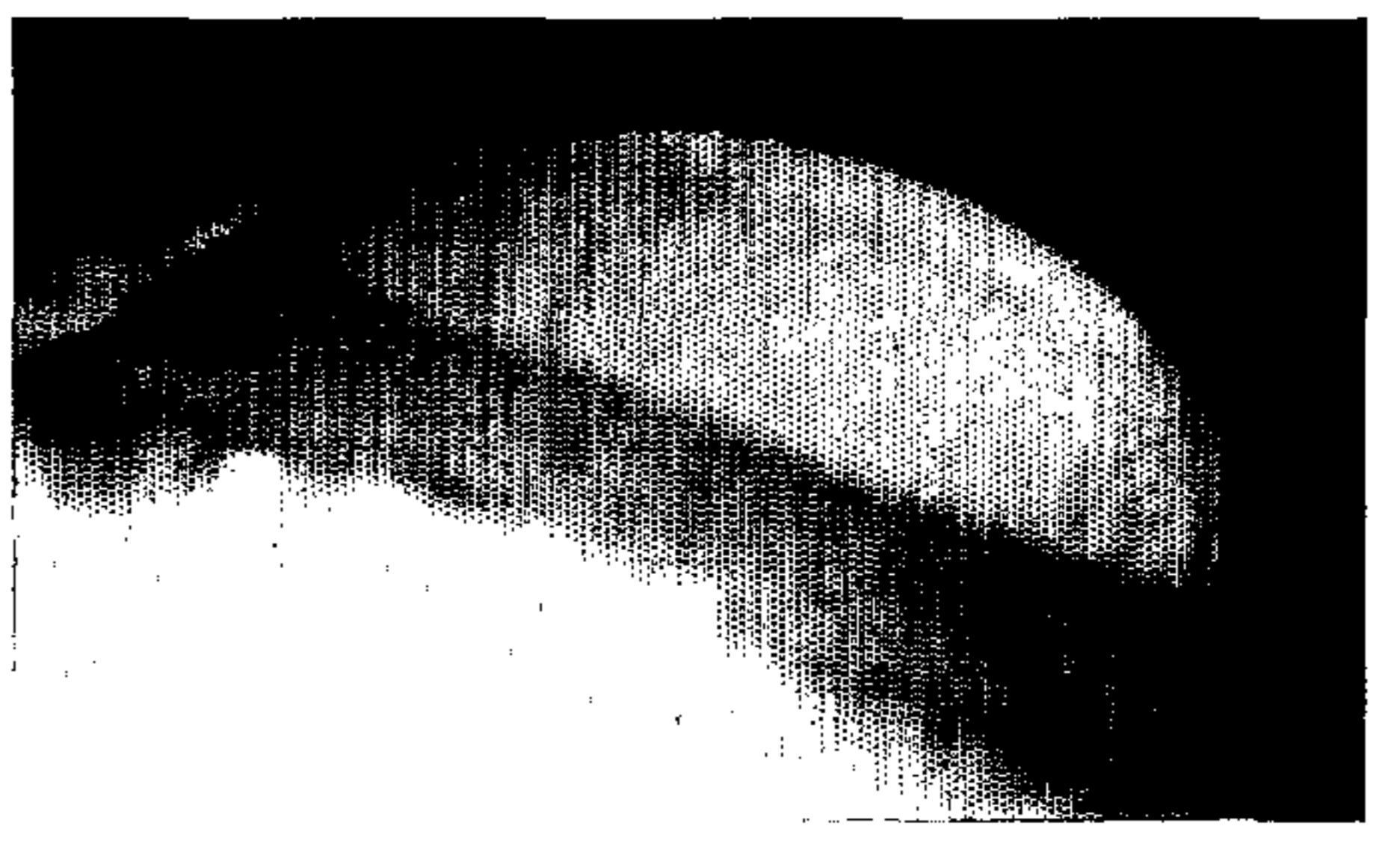


Figure 5J J9 OTt