

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4153421号
(P4153421)

(45) 発行日 平成20年9月24日(2008.9.24)

(24) 登録日 平成20年7月11日(2008.7.11)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 31/7088	(2006.01)	A 61 K 31/7088 Z N A
A 61 K 9/08	(2006.01)	A 61 K 9/08
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00
A 61 K 48/00	(2006.01)	A 61 K 48/00
A 61 P 1/04	(2006.01)	A 61 P 1/04

請求項の数 12 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-505336 (P2003-505336)
(86) (22) 出願日	平成14年6月14日 (2002.6.14)
(65) 公表番号	特表2004-538272 (P2004-538272A)
(43) 公表日	平成16年12月24日 (2004.12.24)
(86) 國際出願番号	PCT/FR2002/002067
(87) 國際公開番号	W02002/103014
(87) 國際公開日	平成14年12月27日 (2002.12.27)
審査請求日	平成16年1月6日 (2004.1.6)
(31) 優先権主張番号	0107805
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001.6.14)
(33) 優先権主張国	フランス (FR)

(73) 特許権者	506174245 ジーン シグナル インターナショナル ソシエテ アノニム スイス、ヴィティー、エバランジュ、32 、シュマン デ プランシャンプス
(74) 代理人	100092897 弁理士 大西 正悟
(72) 発明者	サルマン アルマームード フランス国、パリ エフ-75014、ス クウェア アリス、2
審査官 荒木 英則	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】内皮細胞による毛管の形成を阻害し得るアンチセンスオリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列識別番号 3 として示されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを活性作用物質として含む、血管形成に関連する疾患の治療のための薬剤組成物。

【請求項 2】

薬学的に許容できる賦形剤をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の薬剤組成物。

【請求項 3】

皮下、筋肉内、静脈内又は経皮で投与されるための形状を呈し、0.001mg から 5 0 mg の活性作用物質を含むことを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の薬剤組成物。

10

【請求項 4】

血管形成に関連する疾患は、網膜症、リウマチ様関節炎、クローン病、アテローム硬化症、卵巣過刺激、乾癬、新血管新生に関連した子宮内膜、気球の血管形成による再狭窄、癒着による組織生成過多、末梢血管症、高血圧、血管炎症、レイノー病及び現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎 (lymphangiite)、リンパ性皮膚病 (lymphedema)、組織癒着及び修復、虚血、口咬炎、心筋梗塞、慢性心臓病、鬱血性心不全又は加齢に関連した黄斑変性及び骨粗しょう症であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の薬剤組成物。

【請求項 5】

配列識別番号 3 として示されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを活性作

20

用物質として含む、血管形成に関連する疾患の診断のための薬剤組成物。

【請求項 6】

血管形成に関連する疾患は、網膜症、リウマチ様関節炎、クローン病、アテローム硬化症、卵巣過刺激、乾癬、新血管新生に関連した子宮内膜、気球の血管形成による再狭窄、癒着による組織生成过多、末梢血管症、高血圧、血管炎症、レイノー病及び現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓性静脈炎、リンパ管炎 (lymphangiite)、リンパ性皮膚病 (lymphodem)、組織癒着及び修復、虚血、口渇炎、心筋梗塞、慢性心臓病、鬱血性心不全、又は加齢に関連した黄斑変性及び骨粗しょう症であることを特徴とする、請求項5に記載の薬剤組成物。

【請求項 7】

10

配列識別番号3として示されるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項7に記載のオリゴヌクレオチドからなる薬剤。

【請求項 9】

血管形成に関連する疾患の治療のための薬剤組成物を調製するための、請求項7に記載のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 10】

血管形成に関連する疾患は、網膜疾患、リウマチ様関節炎、クローン病、アテローム性動脈硬化症、卵巣の過刺激、乾癬、血管新生に関わる子宮内膜炎、気球血管形成による再狭窄、瘢痕形成による組織超増殖、末梢血管疾患、高血圧、血管の炎症、レイノー病及び現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓性静脈炎、リンパ管炎、リンパ水腫、組織瘢痕形成及び修復、局所貧血、狭心症、心筋梗塞、慢性心臓病、鬱血性心不全、年齢による黄斑変性及び骨粗しょう症であることを特徴とする、請求項9に記載の使用。

20

【請求項 11】

血管形成に関連する疾患の診断のための薬剤組成物を調製するための、請求項7に記載のオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項 12】

30

血管形成に関連する疾患は、網膜疾患、リウマチ様関節炎、クローン病、アテローム性動脈硬化症、卵巣の過刺激、乾癬、血管新生に関連する子宮内膜炎、気球血管形成による再狭窄、瘢痕形成による組織超増殖、末梢血管疾患、高血圧、血管の炎症、レイノー病及び現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓性静脈炎、リンパ管炎、リンパ水腫、組織瘢痕形成及び修復、局所貧血、狭心症、心筋梗塞、慢性心臓病、鬱血性心不全、年齢関連の黄斑変性及び骨粗しょう症であることを特徴とする、請求項11に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IRS-1タンパク質の発現を阻害し、かつ内皮細胞による毛管の形成を阻害し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドを対象とする。従って、本発明によるオリゴヌクレオチドは、抗血管形成剤として示される。それらは、抗細胞増殖剤、特に抗腫瘍剤としても同様に示される。

40

【0002】

本発明は、前記オリゴヌクレオチドを含む薬剤組成物、及び分析試薬としての前記オリゴヌクレオチドの使用にも関する。

【0003】

血管形成は、新規な血管が形成される基本的なプロセスである。このプロセスは、生殖、発育、又は癒着のような幾つかの正常な生理学的現象において必要不可欠である。これらの正常な生物学的現象において、血管形成は、厳密に制御される。すなわち、血管形成は、短い期間（数日）中に引き起こされ、次に完全に阻害される。しかしながら、幾つかの病理は、侵襲性でありかつ制御されない血管形成に関連する；侵襲性新血管による軟骨損傷による病理である関節炎；新血管による網膜の侵襲が、患者の失明に至らせる糖尿病

50

性網膜症；視覚器官の新血管新生は、失明の主な原因を示し、かつこの新血管新生は、約20の眼の疾患に介入する；又は新血管新生に直接関連し、かつ血管形成に左右される腫瘍の増殖及び転移。腫瘍は、それ自体の増殖のために、新血管の増殖を増進する。更に、これらの新血管は、腫瘍の排出路であり、腫瘍は、このようにして血液循環に合流し、かつ肝臓、肺又は骨のような最初の腫瘍発生源から離れた部位への転移を引き起こす。

【0004】

内皮細胞による新血管の形成、血管形成は、内皮細胞の移動、増殖、及び分化を伴う。これらの生物学的現象の調節は、遺伝子発現に直接関連する。

【0005】

このようにして、本発明の枠内で行われた研究作業により、血管形成の調節に関わる核酸配列を識別し、かつ調製することが可能になった。 10

【0006】

血管形成に関する他の作業により、I型膠原布で培養され、かつbFGFのような血管形成因子によって刺激される内皮細胞によって、180kDaの細胞内タンパク質のチロシン残基のレベルでの、重要な発現及びリン酸化を明らかにすることが可能になった。180kDaの細胞内タンパク質のチロシン残基のレベルでの、重要な発現及びリン酸化は、内皮細胞による毛管の形成に付随する。

【0007】

このタンパク質は、(IRS-1と名付けられた)インシュリン受容体基質としてすでに知られている。これは、実際に糖尿病に取り組んでいる数人の著者によって部分的に識別され、かつ調査された(Quonら、J. Biol. Chem. (1994)、269(45)、27920-27924)。 20

【0008】

これらの著者は、(i)インシュリンによって刺激されたGLUT4の転座に関して、及び(ii)グルコース輸送についてラットの脂肪細胞中でIRS-1の役割を調査した。これを行うために、著者らは：

- 次の配列識別番号1:5' - T C G A T G T G A C G C T A C T G A T G A G T C C G T G A G G A C G A A A C T C T G G C C T A G - 3'

の配列のセンスオリゴヌクレオチドから得られる二本鎖オリゴヌクレオチド、及び

- ヒトIRS-1をコードするcDNA、を含むプラスミドを作り、かつ前記プラスミドによってラットの脂肪細胞をトランスフェクトした。 30

【0009】

本発明の範囲で行われた作業は、IRS-1タンパク質の発現は、内皮細胞が、bFGF血管形成因子によって刺激される時に、内皮細胞中にも同様にもたらされることを明らかにした。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

従って本発明は、(i)相補的配列又はその断片の、IRS-1タンパク質をコードする遺伝子の核酸分子又は相補的配列の断片(ii)(i)による核酸分子の発現を阻害し得る分子から選択された少なくとも1つの物質を活性作用物質として含む、血管形成現象に活性である薬剤組成物に関する。 40

【0011】

本発明の枠内で、このタンパク質をコードする遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドが、調製された。これらのオリゴヌクレオチドは、注目すべき抗血管形成及び抗腫瘍活性を示す。従ってこれらは、侵襲性であり、かつこれらのオリゴヌクレオチドの少なくとも1つを含む組成物を個体に投与することからなる遺伝子治療法によって制御されない血管形成に関連する疾患の治療に特に有用である。

【0012】

このようにして、本発明によるオリゴヌクレオチドは、次の配列識別番号2の式のヌク 50

レオチド配列：

5' - T A T C C G G A G G G G C T C G C C A T G C T G C T G C G G A G C A G A -
3'

からなり、その断片は、少なくとも 1 2 の隣接するヌクレオチド、又はその誘導体を含む。

【 0 0 1 3 】

本発明は、次の配列識別番号 3 及び 4 の式のヌクレオチド配列：

5' - T A T C C G G A G G G G C T C G C C A T G C T G C T - 3'

5' - T C G C C A T G C T G C T G C G G A G C A G A - 3'

の一方からなるオリゴヌクレオチドに特に関し、その断片は、少なくとも 1 2 の隣接する 10
ヌクレオチド、又はその誘導体を含む。

【 0 0 1 4 】

誘導体とは、配列識別番号 2、3 又は 4 の配列の 1 つ、又はその、少なくとも 1 2 の隣接するヌクレオチドの断片と、厳密な条件においてハイブリダイズすることが可能な配列を意味する。

【 0 0 1 5 】

本発明によるオリゴヌクレオチドの例として、次の配列：

配列識別番号 5 : 5' - T A T C C G G A G G G G C T G C C A T G C T G C T - 3'

配列識別番号 6 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C A T G C T G C - 3'

配列識別番号 7 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C A T G C T G - 3'

配列識別番号 8 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C A T G C T - 3'

配列識別番号 9 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C A T G C - 3'

配列識別番号 10 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C A T G - 3'

配列識別番号 11 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C A T - 3'

配列識別番号 12 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C A - 3'

配列識別番号 13 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C C - 3'

配列識別番号 14 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G C - 3'

配列識別番号 15 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T G - 3'

配列識別番号 16 : 5' - T A T C C G G A G G G C C T - 3'

配列識別番号 17 : 5' - T A T C C G G A G G G C C - 3'

配列識別番号 18 : 5' - T A T C C G G A G G G C - 3'

配列識別番号 19 : 5' - C C G G A G G G C C T G C C A T G C T G C T - 3'

配列識別番号 20 : 5' - G A G G G C C T G C C A T G C T G C T - 3'

配列識別番号 21 : 5' - G G C C T G C C A T G C T G C T - 3'

配列識別番号 22 : 5' - C T G C C A T G C T G C T - 3'

配列識別番号 23 : 5' - T G C C A T G C T G C T - 3'

のそれを挙げることができる。

【 0 0 1 6 】

好適には、本発明のオリゴヌクレオチドのホスホジエステル結合の全部又は一部は、保護される。この保護は、当業者に周知である従来の方法によって、一般的に化学的に行われる。例えば、チオール基又はアミン、又はフェニル基によってホスホジエステル結合を保護することができる。

【 0 0 1 7 】

同様に好適には、本発明のオリゴヌクレオチドの末端 5' - 及び / 又は 3' - は、例えばホスホジエステル結合を保護するために以前に示された技術を使用して、保護される。

【 0 0 1 8 】

本発明のオリゴヌクレオチドは、当業者に周知である従来技術により、例えば様々な会社から商品化されている DNA シンセサイザを用いて合成され得る。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

その作用機序が完全に解明されていないが、本発明によるオリゴヌクレオチドは、内皮細胞の中で IRS - 1 タンパク質の発現を阻害する。これらのオリゴヌクレオチドは、内皮細胞による新血管の形成を遮断することが可能であり（すなわち、血管形成を阻害し）、かつ従って、それは、マウスの腫瘍細胞の増殖を阻害する。

【 0 0 2 0 】

従って、本発明は、IRS - 1 タンパク質をコードする遺伝子の一部又は前記遺伝子の転写物の少なくとも 1 つの相補的オリゴヌクレオチドを含む前記遺伝子を阻害するための薬剤組成物も対象とする。

【 0 0 2 1 】

好ましくは、IRS - 1 タンパク質をコードする遺伝子の核酸分子の発現を阻害し得る分子は、添付の配列リスト中で配列識別番号 28 号で識別される配列のコード領域のアンチセンス配列である。10

【 0 0 2 2 】

好適には、前記アンチセンス配列は、少なくとも 12 の隣接するヌクレオチド又はその誘導体を含む。

【 0 0 2 3 】

より好ましくは、本発明の組成物の IRS - 1 タンパク質をコードする遺伝子の核酸分子の発現を阻害し得る活性作用物質は、少なくとも 12 の隣接するヌクレオチド又はその誘導体を含む、添付の配列リスト中で配列識別番号 2 から配列識別番号 23 号で識別されるヌクレオチド配列の集合から選択されるヌクレオチド配列である。20

【 0 0 2 4 】

かかる組成物は、好適には、許容できる媒介物と前記組成物中で好適には結合された、以上に定義した少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを活性作用物質として含む。

【 0 0 2 5 】

従って、本発明の枠内で行われた作業の分析により、IRS - 1 タンパク質が、血管形成プロセスにおいて必要不可欠な細胞成分に相当することを証明することが可能になった。実際、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドによる IRS - 1 タンパク質の発現阻害は、内皮細胞による毛管の形成阻害に至らせる。

【 0 0 2 6 】

従って、本発明によるオリゴヌクレオチド及びそれらを含む組成物は、抗血管形成剤として示される。それらは、抗細胞増殖剤、特に抗腫瘍剤としても同様に示され、かつ従って、腫瘍の治療に特に有用である。従って、本発明は、例えば非限定的に：腫瘍の血管新生、網膜症のような視覚器官の新血管新生に関連した眼の疾病的治療、リウマチ様関節炎、クローン病、アテローム硬化症、卵巣過刺激、乾癬、新血管新生に関連した子宮内膜、気球の血管形成による再狭窄、癒着による組織生成過多、末梢血管症、高血圧、血管炎症、レイノー病及び現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎 (lymphangiite)、リンパ性皮膚病 (lymphedema)、組織癒着及び修復、虚血、口咬炎、心筋梗塞、慢性心臓病、鬱血性心不全のような心不全、加齢に関連した黄斑変性及び骨粗しょう症のような、侵襲性であり、かつ制御されない血管形成に関連する病理の治療又は予防のための組成物を調製するための前記オリゴヌクレオチドの使用を対象とする。30

【 0 0 2 7 】

上記の薬剤組成物は、皮下、筋肉内、静脈内又は経皮で投与され得るように、特には製造される。かかる投与のために、薬学的に適合する分散剤及び / 又は湿潤剤、例えばプロピレングリコール又はブチレングリコールを含む、水性懸濁液、等張食塩水又は無菌液及び注射液が特に使用される。

【 0 0 2 8 】

投与する普通の単位分量は、0.001 mg から 50 mg の有効成分を含む。

【 0 0 2 9 】

本発明のオリゴヌクレオチドは、特に、例えば前記オリゴヌクレオチドによってトランスクフェクトされた腫瘍又は非腫瘍細胞に対する、180 kDa のタンパク質を伴う標識方50

法のインピトロ調査に、研究試薬としても有用である。それらは、本質的にキナーゼ／ホスファターゼ比からの血管形成又は発癌のような、多数の生理学的及び病理学的現象における 180 kDa のタンパク質を伴う標識方法のインピボ調査にも同様に有用である。

【0030】

このように、本発明の薬剤組成物は、血管形成現象に関連する病理の診断テストの実施、特に網膜症、リウマチ様関節炎、クローン病、アテローム硬化症、卵巣過刺激、乾癬、新血管新生に関連した子宮内膜、気球の血管形成による再狭窄、癒着による組織生成過多、末梢血管症、高血圧、血管炎症、レイノー病及び現象、動脈瘤、動脈再狭窄、血栓静脈炎、リンパ管炎 (lymphangiite)、リンパ性皮膚病 (lymphedema)、組織癒着及び修復、虚血、口咬炎、心筋梗塞、慢性心臓病、鬱血性心不全のような心不全、又は加齢に関連した黄斑変性及び骨粗しょう症の診断に特に有用である。

10

【0031】

本発明のその他の利点及び特徴は、これに続く実施例から現れるであろう。実施例中、配列識別番号 3 のオリゴヌクレオチドを「オリゴヌクレオチド」によって指示し、実施例は、添付図面を参照する。

【実施例 1】

【0032】

bFGF による内皮細胞の刺激に続く、これらの細胞中の IRS - 1 (180 kDa のタンパク質) の発現の誘導を明らかにすること

【0033】

20

180 kDa のタンパク質は、次のように明らかにされた：

内皮細胞は、(Montesanoら、J. Cell. Biol.、1983、83、1648-1652) に記載されたように、I型膠原で予め覆われた 6 つのウェルを有するマイクロタイトレーション板中で培養された。培養媒質は、10% のウシ胎児血清、4 mM のグルタミン、500 U / ml のペニシリン、及び 100 µg / ml のストレプトマイシンで濃縮された DMEM (Sigma) である。3 ~ 4 日の培養後、内皮細胞の半集密性層が得られる。6 つのウェルの培養媒質は、吸入され、かつ新しい培養媒質によって取り替えられた。3 つのウェルは、3 ng / ml の bFGF によって濃縮された。48 時間の保温後、様々なウェルは、リン酸緩衝液によって 3 回洗浄され、かつ細胞は、当業者に公知の手順により伝令 RNA (mRNA) を抽出するために使用される。mRNA は、オリゴ(dT) プライマ (T12MN) (M は、G、A 又は C でも良く；かつ N は、G、A、T 及び C である) の変性された 4 つのグループの各々を使用して重合連鎖反応 (PCR) によって逆転写される。各プライマグループは、3' (N) 位の塩基によって書き取られ、(M) 位中に変性を有する。例：N = G であるプライマセットは：

30

配列識別番号 24 : 5' - TTTTTTTTTTTTTGG - 3'

配列識別番号 25 : 5' - TTTTTTTTTTTTTAG - 3'

配列識別番号 26 : 5' - TTTTTTTTTTTTCG - 3'

からなる。

【0034】

このようにして得られた cDNA は、同位体的にマーキングされた ATP の存在下で任意の十量体により増幅され、かつマーキングされる。電気泳動によって増幅される cDNA の分析により、配列識別番号 27 号で添付の配列リスト中で識別される、bFGF によって刺激された内皮細胞に由来する試料中で増幅された 326 bp の cDNA 断片の存在が明らかになったが、しかしながら、この同じ断片は、bFGF により刺激されない内皮細胞に由来する試料中で僅かに存在するか、又は痕跡の状態で存在する。この断片の配列決定及びデータバンクのその後の調査により、この断片は、インシュリン受容体基質をコードする、すでに知られている遺伝子の一部に相当することが明らかになった (180 kDa の細胞内タンパク質)。

40

【実施例 2】

【0035】

50

I R S - 1 (1 8 0 k D a のタンパク質) の発現の誘導を明らかにすること
【 0 0 3 6 】

b F G F によって刺激された、又は刺激されない(実施例1参照)I型膠原布上で培養中の内皮細胞は、オルトバナジン酸ナトリウムを含む細胞溶解緩衝液中で溶解される。これらの溶液は、次に14000gで15分間の遠心分離によって清澄化される。等量のタンパク質を含む、刺激されない細胞及びb F G F によって刺激された細胞に由来する上澄みの試料は、2%のSDS及び15mMのジチオトレイトルを含み、100で5分間加熱され、次に(2%のSDSの存在下)変性させる条件でポリアクリルアミドのゲル(アクリルアミド4~15%の勾配)に堆積される、電気泳動溶液によって再び取られた。移動後に、タンパク質は、ニトロセルロース膜上に伝達される。膜は、P B S 緩衝液中の5%の乳液の溶液中で、外界温度での保温によって遮断される。膜は、次にP B S 緩衝液により3回洗浄され、1μg / mlの抗I R S - 1モノクローナル抗体を含むP B S 緩衝液中で2時間、外界温度で保温され、かつP B S 緩衝液により3回洗浄される。次にタンパク質が、ペルオキシダーゼに結合される抗アイソタイプ二次抗体により明らかにされる。b F G F によって刺激される内皮細胞に由来する調合物において、抗I R S - 1モノクローナル抗体によって認識される分子量180kDaのタンパク質の存在が確認される；このタンパク質は、b F G F によって刺激されない内皮細胞に由来する調合物において、僅かに存在する(図1)。

【 実施例3 】**【 0 0 3 7 】**

I R S - 1 (1 8 0 k D a のタンパク質) のチロシンのレベルでのリン酸化の誘導を明らかにすること

【 0 0 3 8 】

b F G F によって刺激された、又は刺激されないI型膠原布上で培養中のヒト内皮細胞は、オルトバナジン酸ナトリウムを含む細胞溶解緩衝液中で溶解される。これらの溶液は、次に14000gで15分間の遠心分離によって清澄化される(実施例2参照)。I R S - 1タンパク質は、抗I R S - 1モノクローナル抗体により抽出された。この抽出は、抗I R S - 1モノクローナル抗体(S i g m a)を用いた免疫沈降後に行われる。アガロースに結合された抗I R S - 1抗体の付加後に、懸濁液が、外界温度で2時間保温され、次に4000gで15分間の遠心分離される。得られた沈殿物は、2%のSDS及び15mMのジチオトレイトルを含み、100で5分間加熱され、次に(2%のSDSの存在下)変性させる条件でポリアクリルアミドのゲル(アクリルアミド4~15%の勾配)に堆積される、電気泳動溶液によって再び取られる。移動後に、タンパク質は、ニトロセルロース膜上に伝達される。膜は、P B S 緩衝液中の5%の乳液の溶液中で、外界温度での保温によって遮断される。膜は、次にP B S 緩衝液により3回洗浄され、1μg / mlの抗ホスホチロシンモノクローナル抗体を含むP B S 緩衝液中で2時間、外界温度で保温され、かつP B S 緩衝液により3回洗浄される。次にタンパク質が、ペルオキシダーゼに結合される抗アイソタイプ二次抗体により明らかにされる。分子量180kDaのI R S - 1タンパク質は、b F G F によって刺激される内皮細胞に由来する調合物において、チロシン残基のレベルでリン酸化されることが、確認される；このタンパク質は、b F G F によって刺激されない内皮細胞に由来する調合物において、チロシン残基のレベルで非常に僅かにリン酸化される(図2)。

【 実施例4 】**【 0 0 3 9 】**

オリゴヌクレオチドのインビトロでの抗血管形成活性の評価

【 0 0 4 0 】

ヒト内皮細胞は、I型膠原布上で培養される。培養の7日目に、培養ウェルは、4つのロットに分割される：

ロット1：治療を受けない内皮細胞の培養に対応するウェル。(図3A)

ロット2：3ng / mlのb F G F によって刺激された内皮細胞の培養に対応するウェル

10

20

30

40

50

ル。（図3B）

ロット3：配列識別番号3の配列の $100\mu g / ml$ のオリゴヌクレオチドによって4時間保温され、次に $3ng / ml$ のbFGFによって刺激された内皮細胞の培養に対応するウェル。（図3C）

ロット4：配列識別番号3の配列の $100\mu g / ml$ のオリゴヌクレオチドによって4時間保温された内皮細胞の培養に対応するウェル。（図3D）

【0041】

培養の3～4日後に、様々なウェルは、逆相の光学顕微鏡を用いて検査される。結果を読むと、ロット2中のヒト内皮細胞は、bFGFによる刺激に続いて、毛管を形成するよう見える。オリゴヌクレオチドは、ロット3中でbFGFによって刺激されたこれらの同じ細胞によって新血管の形成を阻害することも確認される。オリゴヌクレオチドは、内皮細胞の増殖を顕著には変更しないことが最後に観察される。実際、ロット1のウェル中の内皮細胞数及びロット4のそれは、似通っている。

【実施例5】

【0042】

オリゴヌクレオチドのインビボでの活性の評価

【0043】

ヌードマウスの3つのロットが使用された。各ロットは、5匹のマウスからなる。

【0044】

ロット1号：このロットは、比較基準の役割を果たした。各マウスは、 10^6 細胞/ m^3 の割合でPBS中に分散した（ビルジュイフのInstitut Gustave Roussyによって提供される） $200\mu l$ のB16黒色腫細胞の懸濁液を0日に皮下接種される。これらのマウスは、その後に治療をされていない。

【0045】

ロット2号：各マウスは、 10^6 細胞/ m^3 の割合でPBS中に分散した、 $200\mu l$ のB16黒色腫細胞の懸濁液を0日に皮下接種される。1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日及び10日に、各マウスは、 $500\mu g / ml$ の濃度のPBS中で希釈された $200\mu l$ のオリゴヌクレオチド溶液の皮下注射を受ける。オリゴヌクレオチド注射は、細胞注射の部位の近傍で行われる。

【0046】

ロット3号：このロットのマウスは、B16黒色腫細胞で皮下接種されない。しかしながら、これらのマウスの各々は、 $500\mu g / ml$ の濃度のPBS中の $200\mu l$ のオリゴヌクレオチド溶液の注射を受ける；注射は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日及び10日に行われる。

【0047】

結果は、次の通りである：

接種後に、ロット1号のマウスで、腫瘍塊は、非常に急速に発育する。実際、腫瘍塊は、前記ロット1号のマウス（治療を受けないマウス）で、10日後に直径1.6から2.5cmの大きさに達する。ロット2号のマウス（1日、2日及び3日にオリゴヌクレオチド注射により接種後に治療を受けたマウス）での腫瘍塊の進行は、腫瘍塊の体積の明らかに少ない増加を示している。ロット2のマウスでの腫瘍塊は、10日目に直径0.8cmを超えない。14日目には、ロット2号のマウスの腫瘍塊及びロット1号のマウスのそれの間の差は、著しい。

【0048】

ロット3号のマウス（B16黒色腫細胞を受けなかったが、3日間オリゴヌクレオチド注射によって治療を受けたマウス）で、皮膚に関する予期せぬ一般的効果に気付く。それは、オリゴヌクレオチドによって治療を受けた全てのマウス（ロット2）で気付いたものと同一である。皮膚は、老化し、皺の寄った外観を見る。治療を受けた全てのマウスで毛の出現にも気付く。皮膚の徴候の退縮及び腫瘍増殖の継続の間には、進行中に平行状態が存在する。

10

20

30

40

50

【0049】

従って、オリゴヌクレオチドがインビトロでの内皮細胞による新血管の発育及び形成を阻害することが確認される；他方、それは、ヌードマウスで注目すべきインビボでの抗腫瘍活性を有する。

【実施例6】

【0050】

ラットでの角膜の新血管新生モデルに対する抗血管形成オリゴヌクレオチドの評価

【0051】

Amanoらの作業(1998)に基づき、出願人は、上皮除去(deepithelialisation)及び辺縁切除後の、ラットでの角膜の新血管の形成モデルを繰り返し、変更し、かつ分析した(図5A～5J)。それは再生可能であり、細隙灯で新血管を直接検査すること、及びそれらを数量化することを可能にする。詳細は、以下に示す。次にこのモデルは、本発明の抗血管形成剤の効率をテストするために使用された。

10

【0052】

6.1 角膜の新血管新生の動物及びモデル

【0053】

特別な病原菌を有さない、生後5週間の雄のウィスターラット(Rattus norvegicus)(Charles River France、フランス、サン・トーバン レ ゼルブフ)は、自由に食物を与えられ、かつ水を飲まれ、かつ一定の温度及び湿度条件で、12時間明るくし／12時間暗くするサイクルで、研究所の動物飼育場で維持される。

20

【0054】

ラットは、ケタミン(Ketamine 1000、UVA、フランス、イブリ・シュル・セーヌ；128mg/kg)及びクロルプロマジン(Largactil 25mg/ml；Specia Rhone Poulenec、フランス、パリ；5mg/kg)の混合物によって麻酔をかけられ、筋肉内注射される。一滴のオキシブロカイン(Novesine、Chibret、フランス、クレルモンフェラン)が、右目に注入される。拡大システム(巨視Wild MPS 51S、LEICA、スイス、ヘアブルック)を用いて、角膜上皮は、70%のエタノールを滲みこませた「マイクロスポンジ」によって取り除かれる。辺縁の幅1.5mmの結膜の帯は、顕微手術はさみを用いて切除され、かつ瞼は、Vicryl 5.0の糸(Dacron、Alcon、フランス、リュエイユ・マルメゾン)を用いた一時的眼瞼縫合によって閉じられる。眼は次に、PBS1Xでふんだんにすすぐれ、オキシテトラサイクリン軟膏(Posicycline、Alcon、フランス)が塗布され、かつ眼瞼縫合は、4日目に開かれる(8、9)。

30

【0055】

6.2 結膜下注射による治療及び抗血管形成オリゴヌクレオチドの局所適用

【0056】

ラットの集合は、6つのグループに分割された：

Aグループ：モデル+PBS1X中の60μMのアンチセンスオリゴヌクレオチド溶液の結膜下注射、

40

Bグループ：モデル+PBS1X中の200μMのアンチセンスオリゴヌクレオチド溶液の局所適用、

Cグループ：モデル+PBS1X中の60μMのセンスオリゴヌクレオチド溶液の結膜下注射、

Dグループ：モデル+PBS1X中の200μMのセンスオリゴヌクレオチド溶液の局所適用、

Eグループ：モデル+PBS1Xの結膜下注射、

Fグループ：治療を受けないモデル。

【0057】

全てのラットは、上記のように上皮除去された；治療は、4日目から9日目まで24時

50

間毎に行われた。新血管新生は、細隙灯での検査によって、実験手順の最初、中間及び最後に検査された；写真を 0 日及び 9 日に撮影した。

【0058】

6.3 新血管新生の視覚化及び数量化

【0059】

動物は、ペントバルビタールの致死注射（腹腔内注射）によって上皮除去後の 10 日後に安樂死させられた。微小血管を満たし、かつ角膜の新血管新生を数量化するために、動物の体の上部が、フルオレセイン - デキストラン 2×1000000 によって灌流された。眼は、核が摘出され、かつパラホルムアルデヒド / PBS 1 X 4 % 中に 3 時間、次に PBS 1 X 中に一晩浸漬された。次に手術用顕微鏡で 1 mm の辺縁を有する角膜を分離抽出し、かつ 3 から 5 の放射状の切開により、それを載物ガラス及びカバーガラスの間に平らに置いた。平らな角膜は、次に検査され、かつ蛍光顕微鏡で写真撮影された。一旦、角膜全体が復元されると、それらをスキャンし、次に画像解析によって表面を測定した；ソフトウェア (NIH image) により、新血管新生の数量化が可能になる。各写真に関して、角膜表面全体を 3 回、及び新血管新生表面を 3 回測定した；新血管新生表面 / 角膜表面全体 - の平均の比により、我々が、「新血管新生率」を得ること、及び得られた阻害を測定することが可能になる。10

【0060】

6.4 統計分析

【0061】

結果は、平均 ± 標準偏差 (SD) で表現される。新血管新生表面 / 表面全体の率は、マン - ホイットニーノンパラメトリック検定法と比較された。P < 0.05 の値は、有意義であると見なされる。20

【0062】

6.5 オリゴヌクレオチドの希釈

【0063】

オリゴヌクレオチドは、pH 7.2 の PBS 1 X 中で希釈される。文献及び他のオリゴヌクレオチドによって他方で行われた実験のデータに応じて、結膜下注射に対して $60 \mu M$ の濃度、及び局所適用に対して $200 \mu M$ の濃度を使用することが選択された。

【0064】

結果

【0065】

角膜の新血管モデルに関して、添付の配列リスト中で配列識別番号 3 号で識別されるオリゴヌクレオチド 5' - T A T C C G G A G G G C T C G C C A T G C T G C T - 3' による治療が行われ、次の実験手順により、4 日から 9 日の 1 日ごとにホスホロチオエートの形状で変更された：

A グループ： $60 \mu M$ のアンチセンスオリゴヌクレオチドの結膜下注射 (AS60)

B グループ： $200 \mu M$ のアンチセンスオリゴヌクレオチドの局所適用 (AS200)

C グループ： $60 \mu M$ のセンスオリゴヌクレオチドの結膜下注射 (S60)

D グループ： $200 \mu M$ のセンスオリゴヌクレオチドの局所適用 (S200)

E グループ： PBS 1 X の結膜下注射 (PBS)

F グループ： 治療なし (O Tt)

【0066】

実験手順の 10 日目に、ラットは、FITC / デキストラン溶液によって灌流され、次に安樂死させられ、角膜は、採取され、かつ PAF 4 % の溶液中に固定され；次に角膜は、グリセロール溶液中で載物ガラス及びカバーガラスの間に平らに置かれた；蛍光新血管は、観察され、かつ蛍光顕微鏡で写真撮影され、写真は、スキャンされ、かつ各動物に関して新血管新生率を測定した。40

【0067】

観察された結果は、下記の表 1 に示す：

50

【0068】

【表1】

	Aグループ AS60	Bグループ AS200	Cグループ S60	Dグループ S200	Eグループ PBS	Fグループ OTt
平均	0.6157	0.5058	0.9431	0.9392	0.9552	0.9170
標準偏差 (SD)	0.2194	0.1172	0.0964	0.0308	0.0481	0.0751
測定数	15	15	15	12	9	9
標準誤差 (SEM)	0.0566	0.0303	0.0249	0.0089	0.0160	0.0250

【0069】

マン - ホイットニー・ノンパラメトリック検定法による結果の統計分析により、次の結果が与えられる：

60 μMのアンチセンスODNの結膜下注射（A）は、比較基準のE及びFグループに対して、新血管新生を減少させた（P < 0.0001及びP = 0.0011の非常に有意な結果）；200 μMの濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドの局所適用（B）は、比較基準のE及びFグループに対して、新血管新生を減少させた（P < 0.0001の極めて有意な結果）。

【0070】

60 μMのセンスODNの結膜下投与（C）又は200 μMのセンスODNの局所適用（D）と比較すると、60 μMのアンチセンスODNの注射（A）及び200 μMのアンチセンスODNの局所適用（B）は、新血管新生を減少させた。これらの結果は、P < 0.0001で極めて有意である（図4A～4F）。

【0071】

新血管新生の阻害は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを結膜下に（60 μM）又は局所に（200 μM）投与することに応じて著しく相違しない；それは、比較基準（E及びF）に対して約35%である。

【0072】

60 μMのセンスODNの結膜下注射（C）及び200 μMの濃度のセンスODNの局所適用（D）は、比較基準グループ（E及びF）に対して新血管新生を変更しなかった。逆に、結膜下注射のセンスオリゴヌクレオチド（C）に対して局所適用のセンスオリゴヌクレオチド（D）の小さな効果が観察される（P = 0.0117）。

【0073】

その上、アンチセンスによって治療を受けたグループ（A及びB）において、新血管の小さい直径及び低い密度が観察される。その分布は、比較基準グループに対して相違しておらず、かつ炎症のレベルのいかなる差も観察されない（図4）。

【0074】

6.7 副作用

【0075】

2つの連続する実験中に、いかなる顕著な副作用も、いかなるグループにおいても観察されなかった；上記の分量での治療の6日後に、ラットの皮膚は、皺が寄っておらず、毛並みは変わらず、動物の一般的な状態は、良好であった；動物は、最後の日まで普通に食べ、かついかなる疑わしい死亡も観察されなかった。死体解剖も血液分析も行われなかつたが、実験終了時の動物の一般的な状態は、肝障害の存在を推測させない。観察された唯一の徴候は、Aグループの60%のラット、Cグループの60%のラット、及びEグルー

10

20

30

40

50

の 10 % のラットでの、結膜下注射の場所の一時的な白っぽい膿瘍である。この膿瘍は、全ての場合において、実験終了時には散った。

【 0076 】

この実施例は、予期し得たことに反して、 $60 \mu M$ の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドの結膜下注射が、 $200 \mu M$ の濃度のアンチセンスオリゴヌクレオチドの局所投与よりも新血管新生を阻害しなかったことを示している。

【 0077 】

このことは、使用される濃度の差によって部分的に説明され得る；しかし、この結果は、辺縁よりもむしろ局所によるオリゴヌクレオチドの浸透を同様に暗示している。それは、注射部位からの生成物の長く続く放出がないことを同様に暗示している。

10

【 0078 】

6.8 結論

【 0079 】

局所による又は結膜下注射の、アンチセンスオリゴヌクレオチドの適用は、ラットでの我々の角膜の新血管モデルに関して、新血管新生を減少させる。

【 0080 】

この作業の目的は、予め調整されたラットでの角膜の新血管新生モデルに対する I R S - 1 遺伝子配列に由来するアンチセンスオリゴヌクレオチドの効率をテストすることであった。

【 0081 】

このモデルは、容易に利用でき、再生可能であり、かつ数量化可能である。更に、この調査により、新血管新生を阻害するためのインビボでの必要なオリゴヌクレオチドの濃度の最初の評価が可能になった。

20

【 0082 】

(参考文献)

1-Aiello LP. Keeping in touch with angiogenesis. *Nat Med* 2000 ; 6 : 379-381

2-D'Amore P.A. Mechanisms of Retinal and Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(12) : 3974-3979

3-Hélène C. Rational design of sequence-specific oncogene inhibitors based on antisense and antigene oligonucleotides. *Eur J Cancer* 1991 ; 27 : 1466-1471 10

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

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 20

7-Aiello LP. Vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997 ; 38 :1647-1652

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

10

【図面の簡単な説明】

【0083】

20

【図1】Aは、抗IRS-1抗体によって明らかにされる、刺激されない細胞（NS トラック）及びbFGFによって刺激された細胞（S トラック）に由来する上澄みの試料から得られるウェスタンプロット図を表す。Bは、刺激されない細胞（NS トラック）及びbFGFによって刺激された細胞（S トラック）に由来する、同一の上澄みの試料から硝酸銀での着色後に得られるウェスタンプロット図を示す。

【図2】膜が、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体によって保温され、かつ実施例3に示すように、ペルオキシダーゼでマーキングされた抗アイソタイプ抗体によって明らかにされる時に、刺激されない細胞（NS トラック）及びbFGFによって刺激された細胞（S トラック）に由来する上澄みの試料から得られるウェスタンプロット図を示す。

【図3 A】内皮細胞のロットのI型膠原布上での培養図であり、治療を受けない内皮細胞の培養を示す。

30

【図3 B】内皮細胞のロットのI型膠原布上での培養図であり、3ng/mlのbFGFによって刺激された内皮細胞の培養を示す。

【図3 C】内皮細胞のロットのI型膠原布上での培養図であり、配列識別番号3の配列の100μg/mlのオリゴヌクレオチドによって4時間保温され、次に3ng/mlのbFGFによって刺激された内皮細胞の培養を示す。

【図3 D】内皮細胞のロットのI型膠原布上での培養図であり、配列識別番号3の配列の100μg/mlのオリゴヌクレオチドによって4時間保温された内皮細胞の培養を示す。

【図4 A】ラットで得られた角膜の新血管新生の阻害試験の結果であり、60μmの濃度でアンチセンスオリゴヌクレオチドの結膜下注射によって得られた結果を示す。

40

【図4 B】ラットで得られた角膜の新血管新生の阻害試験の結果であり、60μMの濃度でセンスオリゴヌクレオチドの結膜下注射後に得られた結果を示す。

【図4 C】ラットで得られた角膜の新血管新生の阻害試験の結果であり、200μMの濃度でアンチセンスオリゴヌクレオチドの局所適用後に得られた結果を示す。

【図4 D】ラットで得られた角膜の新血管新生の阻害試験の結果であり、200μMの濃度でセンスオリゴヌクレオチドの局所適用後に得られた結果を示す。

【図4 E】ラットで得られた角膜の新血管新生の阻害試験の結果であり、いかなる治療も受けない角膜の状態を示す。

【図4 F】ラットで得られた角膜の新血管新生の阻害試験の結果であり、角膜が、PBS

50

結膜下注射によって治療を受けた時の角膜の状態を示す。

【図5】4日(図5A～5E)及び9日(図5F～5J)でラットの角膜の辺縁切除及び上皮除去(de sepi the lialisation)後の、(6.6結果の節に記載した)様々なラットのグループで得られた角膜の新血管新生の阻害の結果を示す。様々なラットのグループの血管増殖の比較を示す細隙灯写真である。倍率×10。

【配列表】

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

<400> 4
tcggccatgtc gctgcccggc aga

23

10

<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

20

<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

30

<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

40

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

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/xxxxxx
<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. 10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(48)
<223> oligonucleotide sens

<400> 1
tcgatgtgac gctactgatg agtccgtgag gacgaaaactc tggcctag 48

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> Séquence artificielle 20
<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 30
<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 40
<220>
<221> misc_feature

<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.

10

<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.

20

<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.

30

<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.

40

<400> 12
tatccggagg gcctgccca

18

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

<400> 13
tatccggagg gcctgcc

17

10
<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 14
tatccggagg gcctgc

16

20
<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

30
<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

10

<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

20

<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

30

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

<400> 20
 gagggcctgc catgctgt

19

40

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

```

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

<400> 21
ggcctgccc 16

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

<400> 22
ctgccatgct 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
ttttttttt ttgg 14

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

```

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

<400> 25
ttttttttt ttag 14

<210> 26
<211> 14
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
<220> 10
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> Oligonucleotide anti-sens.

<400> 26
ttttttttt ttcg 14

<210> 27
<211> 326
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220> 20
<221> misc_feature
<222> (1)..(326)
<223> Fragment du gène IRS-1 codant pour le substrat du récepteur de l'insuline.

<400> 27
gtgccgagct gagttcccta taagaattaa tccttaatttt gtattttttc ctgtaagaca 60
ataggccatg ttaattaaac tgaagaagga tatatttggc tgggtgtttt caaatgtcag 120
cttaaaaattg gtaattgaat ggaagcaaaa ttataagaag agggaaattaa agtcttccat 180
tgcatgtatt gtaaacagaa ggagatgggt gattccttca attcaaaagc tctcttgga 240
atgaacaatg tgggcgtttg taaattctgg aaatgtcttt ctattcataa taaactagat 300
actgttgatec ttttaaaaaa aaaaaa 326

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

40
<400> 28
cggcgccgccc gtcggagggg gcccggcgcc agagccagac gcccggccgtt gttttgggtt 60

gggctctcg	caactctccg	aggaggagga	ggaggaggga	ggaggggaga	agtaactgca	120	
gcccgcgc	cgtcccgagga	acaggcgtct	tccccgaacc	cttcccaaac	ctccccatc	180	
ccctctcgcc	cttgtccccct	ccccctctcc	ccagccgcct	ggagcgaggg	gcagggatga	240	
gtctgtcccc	ccggccggtc	cccagctgca	gtggctgccc	ggtatcgtt	cgcattggaa	300	
agccactttc	tccacccgcc	gagatgggcc	cggatggggg	ctgcagagga	cgcgcggcgc	360	
ggcggcggca	gcagcagcag	cagcagcagc	agcaacagca	acagccgcag	cgccgcggtc	420	
tctgcgactg	agctggtatt	tggcggctg	gtggcggctg	ggacgggttg	gggggtggag	480	
gaggcgaagg	aggagggaga	acccctgtca	acgttgggac	ttggcaaccc	gcctccccct	540	10
gcccaaggat	atthaatttg	cctcggaaat	cgtgcgttcc	agaggggaad	tcaggaggga	600	
aggcgcgcgc	gwgwgwgwg	tcctggaggg	gcaccgcagg	gaccccccac	tgtcgctcc	660	
ctgtgcggga	ctccagccgg	ggcgcacgaga	gatgcacatctt	cgcttcattcc	tggtggcggc	720	
ggcggctgag	aggagacttg	gctctcgag	gatcggttgc	gcccctcaaccc	cgacgcact	780	
gcctccccgc	cggcgtgaa	gcgcggaaa	actccggtcg	ggctctctcc	tgggctcage	840	
agctgcgtcc	tccttcagct	gcccctcccc	ggcgcggggg	gcccgttgaa	tttcagagtc	900	
ggggttctg	ctgcctcaag	ccctgtttgc	atgtgccggg	ccgcggcggag	gagcctccgc	960	
cccccacccg	gttgggggg	ggagccccc	tctgcgtcagc	gttgggtggtg	gcccgtggcag	1020	20
c atg gcg agc cct ccg gag agc gat ggc ttc tcc gac gtg cgc aag gtg	Met Ala Ser Pro Pro Glu Ser Asp Gly Phe Ser Asp Val Arg Lys Val	1 5 10 15				1069	
ggc tac ctg cgc aaa ccc aag agc atg cac aaa cgc ttc tcc gta ctg	Gly Tyr Leu Arg Lys Pro Lys Ser Met His Lys Arg Phe Phe Val Leu	20 25 30				1117	
cgc gcg gcc agc gag gct ggg ggc ccg cgc ctc gag tac tac gag	Arg Ala Ala Ser Glu Ala Gly Pro Ala Arg Leu Glu Tyr Tyr Glu	35 40 45				1165	
aac gag aag tgg cgg cac aag tcg agc gcc ccc aaa cgc tec atc	Asn Glu Lys Lys Trp Arg His Lys Ser Ser Ala Pro Lys Arg Ser Ile	50 55 60				1213	30
ccc ctt gag agc tgc ttc aac atc aac aag cgg gct gac tcc aag aac	Pro Leu Glu Ser Cys Phe Asn Ile Asn Lys Arg Ala Asp Ser Lys Asn	65 70 75 80				1261	
aag cac ctg gtg gct ctc tac acc cgg gac gag cac ttt gcc atc gcg	Lys His Leu Val Ala Leu Tyr Thr Arg Asp Glu His Phe Ala Ile Ala	85 90 95				1309	
gcg gac agc gag gcc gag caa gac agc tgg tac cag gct ctc cta cag	Ala Asp Ser Glu Ala Glu Gln Asp Ser Trp Tyr Gln Ala Leu Leu Gln	100 105 110				1357	
ctg cac aac cgt gct aag ggc cac cac gac gga gct gcg gcc ctc ggg	Leu His Asn Arg Ala Lys Gly His His Asp Gly Ala Ala Leu Gly	115 120 125				1405	40

gcg gga ggt ggt ggg ggc agc tgc agc ggc agc tcc ggc ctt ggt gag Ala Gly Gly Gly Ser Cys Ser Gly Ser Ser Gly Leu Gly Glu 130 135 140	1453	
gct ggg gag gac ttg agc tac ggt gac gtg ccc cca gga ccc gca ttc Ala Gly Glu Asp Leu Ser Tyr Gly Asp Val Pro Pro Gly Pro Ala Phe 145 150 155 160	1501	
aaa gag gtc tgg caa gtg atc ctg aag ccc aag ggc ctg ggt cag aca Lys Glu Val Trp Gln Val Ile Leu Lys Pro Lys Gly Leu Gly Gln Thr 165 170 175	1549	
aag aac ctg att ggt atc tac cgc ctt tgc ctg acc agc aag acc atc Lys Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg Leu Cys Leu Thr Ser Lys Thr Ile 180 185 190	1597	10
agc ttc gtg aag ctg aac tcg gag gca ggc gcc gtg gtg ctg cag ctg Ser Phe Val Lys Leu Asn Ser Glu Ala Ala Ala Val Val Leu Gln Leu 195 200 205	1645	
atg aac atc agg cgc tgt ggc cac tcg gaa aac ttc ttc ttc atc gag Met Asn Ile Arg Arg Cys Gly His Ser Glu Asn Phe Phe Ile Glu 210 215 220	1693	
gtg ggc cgt tct gcc gtg acg ggg ccc ggg gag ttc tgg atg cag gtg Val Gly Arg Ser Ala Val Thr Gly Pro Gly Glu Phe Trp Met Gln Val 225 230 235 240	1741	
gat gac tct gtg gcc cag aac atg cac gag acc atc ctg gag gcc Asp Asp Ser Val Val Ala Gln Asn Met His Glu Thr Ile Leu Glu Ala 245 250 255	1789	20
atg cgg gcc atg agt gat gag ttc cgc cct cgc agc aag agc cag tcc Met Arg Ala Met Ser Asp Glu Phe Arg Pro Arg Ser Lys Ser Gln Ser 260 265 270	1837	
tcc tcc aac tgc tct aac ccc atc agc gtc ccc ctg cgc cgg cac cat Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser Val Pro Leu Arg Arg His His 275 280 285	1885	
ctc aac aat ccc ccg ccc agc cag gtg ggg ctg acc cgc cga tca cgc Leu Asn Asn Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg Arg Ser Arg 290 295 300	1933	
act gag agc atc acc gcc acc tcc ccg gcc agc atg gtg ggc ggg aag Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val Gly Gly Lys 305 310 315 320	1981	30
cca ggc tcc ttc cgt gtc cgc gcc tcc agt gac ggc gaa ggc acc atg Pro Gly Ser Phe Arg Val Arg Ala Ser Ser Asp Gly Glu Gly Thr Met 325 330 335	2029	
tcc cgc cca gcc tcc gtg gac ggc agc cct gtg agt ccc agc acc aac Ser Arg Pro Ala Ser Val Asp Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn 340 345 350	2077	
aga acc cac gcc cac ccg cat ccg ggc agc gcc ccg ctg cac ccc ccg Arg Thr His Ala His Arg His Arg Gly Ser Ala Arg Leu His Pro Pro 355 360 365	2125	
ctc aac cac agc cgc tcc atc ccc atg ccg gct tcc cgc tgc tcc cct Leu Asn His Ser Arg Ser Ile Pro Met Pro Ala Ser Arg Cys Ser Pro	2173	40

370	375	380	
tcg gcc acc agc ccg gtc agt ctg tcg tcc agt agc acc agt ggc cat Ser Ala Thr Ser Pro Val Ser Leu Ser Ser Ser Thr Ser Gly His 385 390 395 400			2221
ggc tcc acc tcg gat tgt ctc ttc cca cgg cga tct agt gct tcg gtg Gly Ser Thr Ser Asp Cys Leu Phe Pro Arg Arg Ser Ser Ala Ser Val 405 410 415			2269
tct ggt tcc ccc agc gat ggc ggt ttc atc tcc tcg gat gag tat ggc Ser Gly Ser Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ile Ser Ser Asp Glu Tyr Gly 420 425 430			2317
tcc agt ccc tgc gat ttc cgg agt tcc ttc cgc agt gtc act ccg gat Ser Ser Pro Cys Asp Phe Arg Ser Ser Phe Arg Ser Val Thr Pro Asp 435 440 445			2365
tcc ctg ggc cac acc cca cca gcc cgc ggt gag gag gag cta agc aac Ser Leu Gly His Thr Pro Pro Ala Arg Gly Glu Glu Leu Ser Asn 450 455 460			2413
tat atc tgc atg ggt ggc aag ggg ccc tcc acc ctg acc gcc ccc aac Tyr Ile Cys Met Gly Gly Lys Pro Ser Thr Leu Thr Ala Pro Asn 465 470 475 480			2461
sgt cac tac att ttg tct cgg ggt ggc aat ggc cac cgc tgc acc cca Gly His Tyr Ile Leu Ser Arg Gly Gly Asn Gly His Arg Cys Thr Pro 485 490 495			2509
gga aca ggc ttg ggc acg agt cca gcc ttg gct ggg gat gaa gca gcc Gly Thr Gly Leu Gly Thr Ser Pro Ala Leu Ala Gly Asp Glu Ala Ala 500 505 510			2557
agt gct gca gat ctg gat aat cgg ttc cga aag aga act cac tcg gca Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn Arg Phe Arg Lys Arg Thr His Ser Ala 515 520 525			2605
ggc aca tcc cct acc att acc cac cag aag acc ccg tcc cag tcc tca Gly Thr Ser Pro Thr Ile Thr His Gln Lys Thr Pro Ser Gln Ser Ser 530 535 540			2653
gtg gct tcc att gag gag tac aca gag atg atg cct gcc tac cca cca Val Ala Ser Ile Glu Glu Tyr Thr Glu Met Met Pro Ala Tyr Pro Pro 545 550 555 560			2701
gga ggt ggc agt gga ggc cga ctg ccg gga cac agg cac tcc gcc ttc Gly Gly Ser Gly Gly Arg Leu Pro Gly His Arg His Ser Ala Phe 565 570 575			2749
gtg ccc acc cgc tcc tac cca gag gag ggt ctg gaa atg cac ccc ttg Val Pro Thr Arg Ser Tyr Pro Glu Glu Gly Ile Glu Met His Pro Leu 580 585 590			2797
gag cgt cgg ggg ggg cac cac cgc cca gac agc tcc acc ctc cac acg Glu Arg Arg Gly Gly His His Arg Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr 595 600 605			2845
gat gat ggc tac atg ccc atg tcc cca ggg gtg gcc cca gtg ccc agt Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser 610 615 620			2893
ggc cga aag ggc agt gga gac tat atg ccc atg agc ccc aag agc gta			40
			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 Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg Arg His Pro Gln Arg 645 650 655	2989
gtg gac ccc aat ggc tac atg atg tcc ccc agc ggt ggc tgc tct Val Asp Pro Asn Gly Tyr Met Met Ser Pro Ser Gly Gly Cys Ser 660 665 670	3037
cct gac att gga ggt ggc ccc agc agc agc agc agc aac gcc Pro Asp Ile Gly Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Asn Ala 675 680 685	3085
gtc cct tcc ggg acc agc tat gga aag ctg tgg aca aac ggg gta ggg Val Pro Ser Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Trp Thr Asn Gly Val Gly 690 695 700	3133
ggc cac cac tct cat gtc ttg cct cac ccc'aaa ccc cca gtg gag agc Gly His His Ser His Val Leu Pro His Pro Lys Pro Pro Val Glu Ser 705 710 715 720	3181
agc ggt ggt aag ctc tta cct tgc aca ggt gac tac atg aac atg tca Ser Gly Gly Lys Leu Leu Pro Cys Thr Gly Asp Tyr Met Asn Met Ser 725 730 735	3229
cca gtg ggg gac tcc aac acc agc agc ccc tcc gac tgc tac tac ggc Pro Val Gly Asp Ser Asn Thr Ser Ser Pro Ser Asp Cys Tyr Tyr Gly 740 745 750	3277
cct gag gac ccc cag cac aag cca gtc ctc tcc tac tac tca ttg cca Pro Glu Asp Pro Gln His Lys Pro Val Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Pro 755 760 765	3325
aga tcc ttt aag cac acc cag cgc ccc ggg gag cgc gag gag ggt gcc Arg Ser Phe Lys His Thr Gln Arg Pro Gly Glu Pro Glu Glu Gly Ala 770 775 780	3373
cgg cat cag cac ctc cgc ctt tcc act agc tot ggt cgc ctt ctc tat Arg His Gln His Leu Arg Leu Ser Thr Ser Gly Arg Leu Leu Tyr 785 790 795 800	3421
gct gca aca gca gat gat tct tcc tct tcc acc agc agc gac agc ctg Ala Ala Thr Ala Asp Asp Ser Ser Ser Thr Ser Ser Asp Ser Leu 805 810 815	3469
ggt ggg gga tac tgc ggg gct agg ctg gag ccc agc ctt cca cat ccc Gly Gly Gly Tyr Cys Gly Ala Arg Leu Glu Pro Ser Leu Pro His Pro 820 825 830	3517
cac cat cag gtt ctg cag ccc cat ctg cct cga aag gtg gac aca gct His His Gln Val Leu Gln Pro His Leu Pro Arg Lys Val Asp Thr Ala 835 840 845	3565
gct cag acc aat agc cgc ctg gcc cgg ccc acg agg ctg tcc ctg ggg Ala Gln Thr Asn Ser Arg Leu Ala Arg Pro Thr Arg Leu Ser Leu Gly 850 855 860	3613
gat ccc aag gcc agc acc tta cct cgg gcc cga gag cag cag cag cag Asp Pro Lys Ala Ser Thr Leu Pro Arg Ala Arg Glu Gln Gln Gln 865 870 875 880	3661

10

20

30

40

cag cag ccc ttg ctg cac cct cca gag ccc aag agc ccg ggg gaa tat Gln Gln Pro Leu Leu His Pro Pro Glu Pro Lys Ser Pro Gly Glu Tyr 885 890 895	3709	
gtc aat att gaa ttt ggg agt gat cag tct ggc tac ttg tct ggc ccg Val Asn Ile Glu Phe Gly Ser Asp Gln Ser Gly Tyr Leu Ser Gly Pro 900 905 910	3757	
gtg gct ttc cac agc tca cct tct gtc agg tgt cca tcc cag ctc cag Val Ala Phe His Ser Ser Pro Ser Val Arg Cys Pro Ser Gln Leu Gln 915 920 925	3805	
cca gct ccc aga gag gaa gag act ggc act gag gag tac atg aag atg Pro Ala Pro Arg Glu Glu Thr Gly Thr Glu Glu Tyr Met Lys Met 930 935 940	3853	
gac ctg ggg ccg ggc cg agg gca gcc tgg cag gag agc act ggg gtc Asp Leu Gly Pro Gly Arg Arg Ala Ala Trp Gln Glu Ser Thr Gly Val 945 950 955 960	3901	
gag atg ggc aga ctg ggc cct gca cct ccc ggg gct gct agc att tgc Glu Met Gly Arg Leu Gly Pro Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ser Ile Cys 965 970 975	3949	
agg cct acc cgg gca gtg ccc agc agc egg ggt gac tac atg acc atg Arg Pro Thr Arg Ala Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Tyr Met Thr Met 980 985 990	3997	
cag atg atg tgt ccc cgt cag agc tac gtg gac acc tcg cca gct gcc Gln Met Ser Cys Pro Arg Gln Ser Tyr Val Asp Thr Ser Pro Ala Ala 995 1000 1005	4045	
cct gta agc tat gct gac atg cga aca ggc att gct gca gag gag Pro Val Ser Tyr Ala Asp Met Arg Thr Gly Ile Ala Ala Glu Glu 1010 1015 1020	4090	20
gtg agc ctg ccc agg gcc acc atg gct gct gcc tcc tca tcc tca Val Ser Leu Pro Arg Ala Thr Met Ala Ala Ser Ser Ser Ser 1025 1030 1035	4135	
gca gcc tct gct tcc ccg act ggg cct caa ggg gca gca gag ctg Ala Ala Ser Ala Ser Pro Thr Gly Pro Gln Gly Ala Ala Glu Leu 1040 1045 1050	4180	
gct gcc cac tcg tcc ctg ctg ggg ggc cca caa gga cct ggg ggc Ala Ala His Ser Ser Leu Leu Gly Gly Pro Gln Gly Pro Gly Gly 1055 1060 1065	4225	30
atg agc gcc ttc acc cgg gtg aac ctc agt cct aac cgc aac cag Met Ser Ala Phe Thr Arg Val Asn Leu Ser Pro Asn Arg Asn Gln 1070 1075 1080	4270	
agt gcc aaa gtg atc cgt gca gac cca caa ggg tgc cgg cgg agg Ser Ala Lys Val Ile Arg Ala Asp Pro Gln Gly Cys Arg Arg Arg 1085 1090 1095	4315	
cat agc tcc gag act ttc tcc tca aca ccc agt gcc acc cgg gtg His Ser Ser Glu Thr Phe Ser Ser Thr Pro Ser Ala Thr Arg Val 1100 1105 1110	4360	
ggc aac aca gtg ccc ttt gga gcg ggg gca gca gta ggg ggc ggt Gly Asn Thr Val Pro Phe Gly Ala Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly 1115 1120 1125	4405	40

ggc ggt agc agc agc agc gag gat gtg aaa cgc cac agc tct	4450	
Gly Gly 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		
tto cag aag cag cca gag gac cgt cag tag ctcaactgga catcacagca	4770	
Phe Gln Lys Gln Pro Glu Asp Arg Gln		
1235 1240		
aatatttcat gattcacaac taggaccta tatcttctc atcagtagat ggtacgtgc	4890	
atccatttca gtttgtttac tttatccaat cctcaggatt tcattgactg aactgcacgt	4950	
tctatattgt gccaagcgaa aaaaaaaaaat gcactgtgac accagaataa tgagtctgca	5010	
taaacttcat cttcaacctt aaggacttag ctggccacag tgagctgatg tgcccaccac	5070	
cgtgtcatga gagaatgggt ttactctcaa tgcatttca agatacattt catctgctgc	5130	
tgaaaactgtg tacgacaaag catcattgta aatttttca tacaaaactg ttcacgttgg	5190	
gtggagagag tattaaatat ttaacatagg ttttgattt tatgtgtaat ttttaaatg	5250	
aaaatgtaac ttttcttaca gcacatctt ttttggatg tgggatggag gtatacaatg	5310	
ttctgttgta aagagtggag caaatgctta aaacaaggct taaaagagta gaatagggt	5370	
tgatccttgt tttaaagattg taattcagaa aacataatat aagaatcata gtgccataga	5430	
tggttctcaa ttgtatagtt atattgtcg atactatctc ttgtcatata aacctgatgt	5490	
tgagctgagt tccttataag aattaatctt aattttgtat tttttcttgt aagacaatag	5550	
gccatgttaa ttaaactgaa gaaggatata tttggctggg tggtttcaaa tgtcagctta	5610	
aaattggtaa ttgaatggaa gcaaaattat aagaagagga aattaaagtc ttccattgca	5670	

10

20

30

40

tgtattgtaa acagaaggag atgggtgatt ccttcaattc aaaagctctc tttggaatga 5730
 acaatgtggg cgtttgtaaa ttctgaaat gtctttctat tcataataaa ctagatactg 5790
 ttgatcttt 5800

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

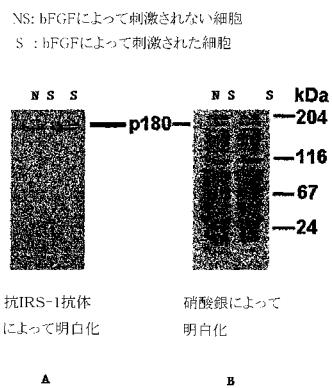
Met Ala Ser Pro Pro Glu Ser Asp Gly Phe Ser Asp Val Arg Lys Val	10
1 5 10 15	
Gly Tyr Leu Arg Lys Pro Lys Ser Met His Lys Arg Phe Phe Val Leu	
20 25 30	
Arg Ala Ala Ser Glu Ala Gly Gly Pro Ala Arg Leu Glu Tyr Tyr Glu	
35 40 45	
Asn Glu Lys Lys Trp Arg His Lys Ser Ser Ala Pro Lys Arg Ser Ile	
50 55 60	
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	20
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	30
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	40
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	320
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			10
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 Thr Ser Gly His			
385	390	395	400
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			20
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	480
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			30
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	560
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	40
Glu Arg Arg Gly Gly His His Arg Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr			

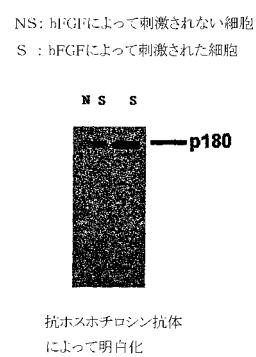
595	600	605	
Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser			
610	615	620	
Gly Arg Lys Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys Ser Val			
625	630	635	640
Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg Arg His Pro Gln Arg			
645	650	655	
Val Asp Pro Asn Gly Tyr Met Met Ser Pro Ser Gly Gly Cys Ser			
660	665	670	
Pro Asp Ile Gly Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asn Ala			10
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			20
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	30
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			
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	40
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			10
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			20
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			30
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			40
1235	1240		

【図1】

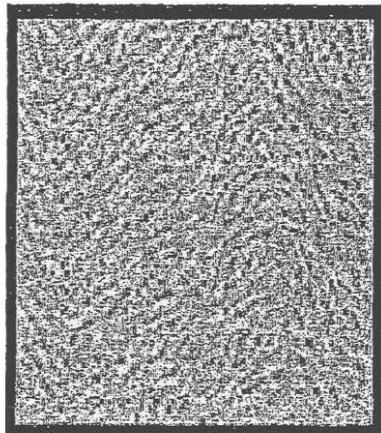


【図2】



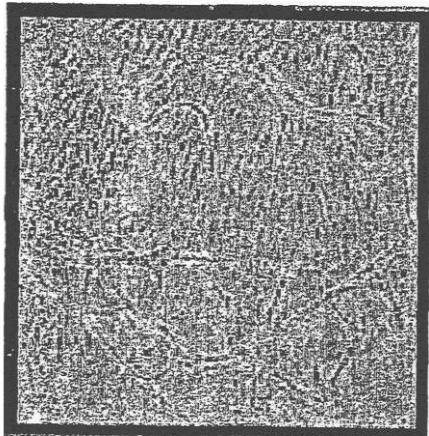
【図3 A】

ロット1



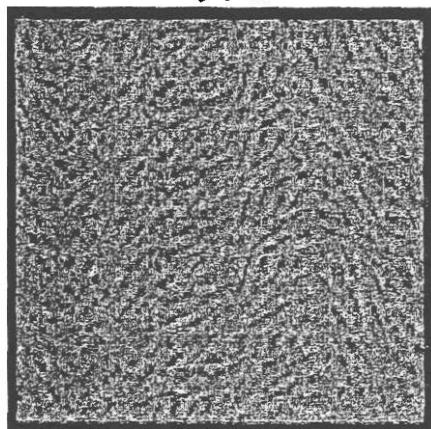
【図3B】

ロット2



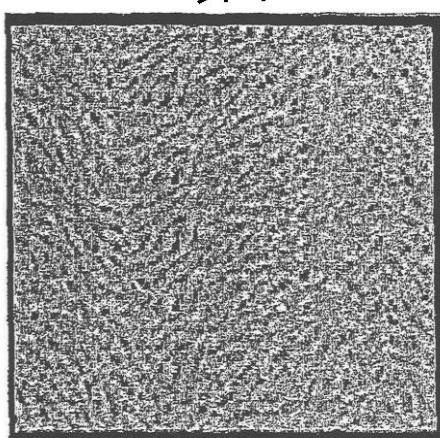
【図3C】

ロット3



【図3D】

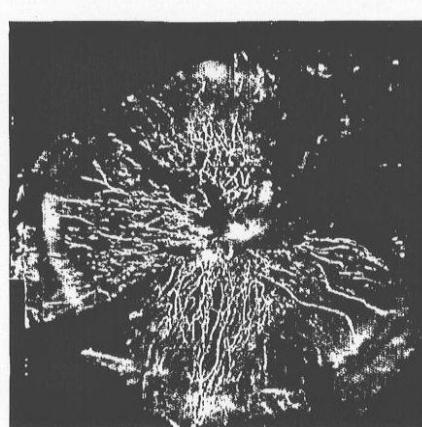
ロット4



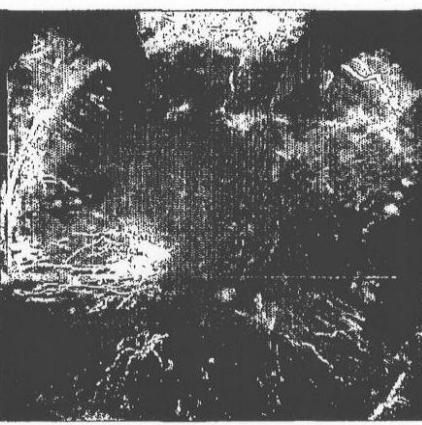
【図4A】



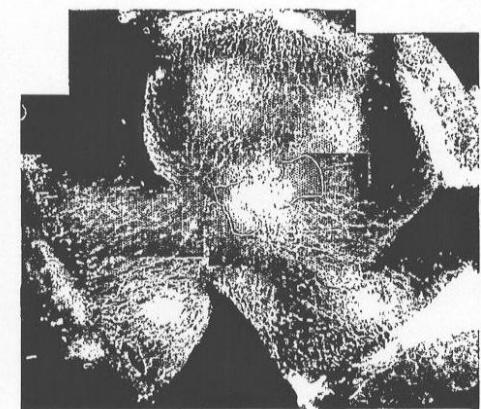
【図4B】



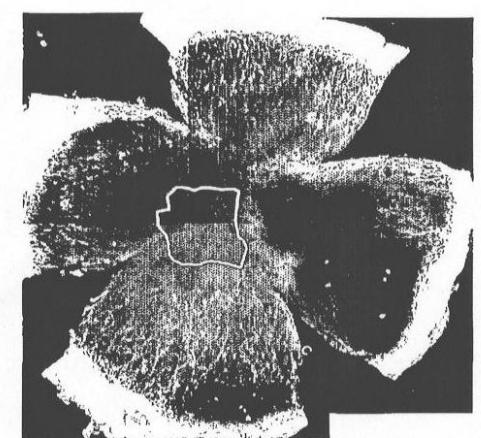
【図4C】



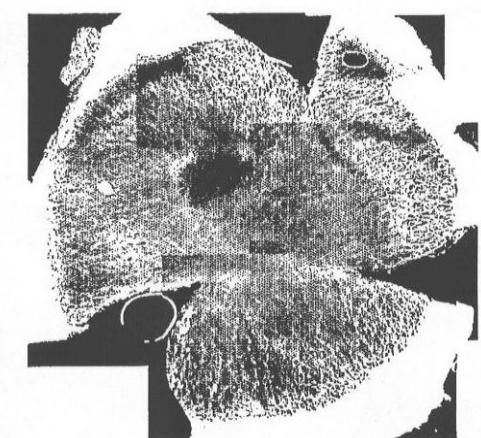
【図4D】



【図4E】



【図4F】



【図5】



Figure 5A J4 AS60

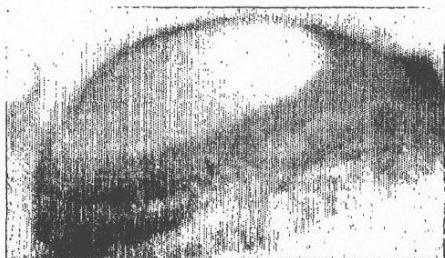


Figure 5B J4 AS200

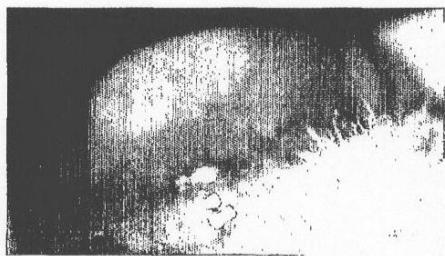


Figure 5C J4 S200

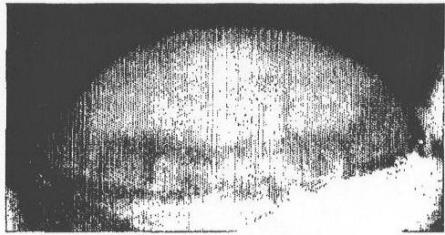


Figure 5D J4 PBS

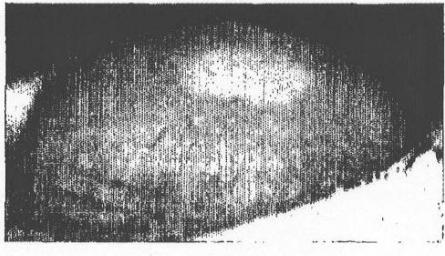


Figure 5E J4 OTt

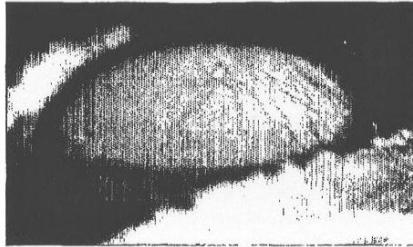


Figure 5F J9 AS60



Figure 5G J9 AS200

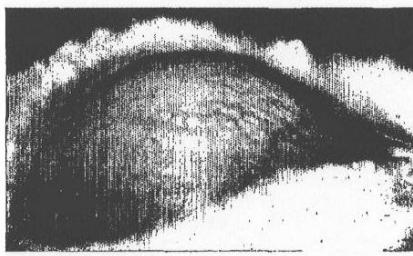


Figure 5H J9 S200

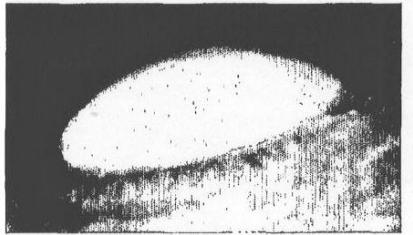


Figure 5I J9 PBS



Figure 5J J9 OTt

フロントページの続き

			F I
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A

(56)参考文献 国際公開第96/035791 (WO , A1)
 国際公開第92/013083 (WO , A1)
 国際公開第99/016462 (WO , A1)
 国際公開第00/015792 (WO , A1)
 WALLACE, W.C., et al. , Mol. Brain Res., 52 , pp.213-227 (1997)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A61K 31/00-31/80
 A61K 38/00-38/42
 A61K 45/00-45/08
 A61K 48/00
 A61P 1/00-43/00
 BIOSIS(STN)
 CA(STN)
 EMBASE(STN)
 MEDLINE(STN)
 JSTPlus(JDreamII)
 JMEDPlus(JDreamII)