

(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 I

A 6 1 K	31/7088	(2006. 01)	A 6 1 K	31/7088	Z N A
A 6 1 K	9/08	(2006. 01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	45/00	(2006. 01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	48/00	(2006. 01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	1/04	(2006. 01)	A 6 1 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) 国際出願番号	PCT/FR2002/002067
(87) 国際公開番号	W02002/103014
(87) 国際公開日	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、ヴィディール、エパランジュ、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 アルーマームード 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、0.001 mg から 50 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。

【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 (l y m p h a g y t e)、リンパ性皮膚病 (l y m p h o d e m e)、組織癒着及び修復、虚血、口峡炎、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

10

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、血栓性静脈炎、リンパ管炎 (l y m p h a g y t e)、リンパ性皮膚病 (l y m p h o d e m e)、組織癒着及び修復、虚血、口峡炎、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】

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、癒着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、組織癒着形成及び修復、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。

【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】

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、癒着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、組織癒着形成及び修復、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。

【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

10

20

30

40

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)グルコース輸送に関し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'-TCGATGTGAC GCTACTGATG AGTCCGTGAG GACGA AACTC TGGCCTAG-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 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12の隣接するヌクレオチド、又はその誘導体を含む。

【0013】

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 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12の隣接するヌクレオチド、又はその誘導体を含む。

10

【0014】

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12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。

【0015】

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 C 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'

20

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'

30

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。

【0016】

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。

40

【0017】

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。

【0018】

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。

【0019】

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。

【0020】

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。

【0021】

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

【0022】

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。

【0023】

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

【0024】

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。

【0025】

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。

【0026】

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の治療、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（lymphagyt）、リンパ性皮膚病（lymphodeme）、組織癒着及び修復、虚血、口峡炎、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

40

【0027】

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。

【0028】

投与する普通の単位分量は、0.001mgから50mgの有効成分を含む。

【0029】

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フェクトされた腫瘍又は非腫瘍細胞に対する、180kDaのタンパク質を伴う標識方

50

法のインビトロ調査に、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180kDaのタンパク質を伴う標識方法のインビ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、血栓性静脈炎、リンパ管炎(lymphagitis)、リンパ性皮膚病(lymphodema)、組織癒着及び修復、虚血、口峡炎、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」によって指し示し、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(180kDaのタンパク質)の発現の誘導を明らかにすること

【0033】

180kDa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、4mMのグルタミン、500U/mlのペニシリン、及び100µg/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、3ng/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：

配列識別番号24：5'-TTTTTTTTTTTTTTGG-3'

配列識別番号25：5'-TTTTTTTTTTTTTTAG-3'

配列識別番号26：5'-TTTTTTTTTTTTTCG-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326bp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(180kDaの細胞内タンパク質)。

40

【実施例2】

【0035】

50

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

【0036】

bFGF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bFGF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のジチオトレイトールを含み、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、PBS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PBS緩衝液により3回洗浄され、1µg/mlの抗IRS-1モノクローナル抗体を含むPBS緩衝液中で2時間、外界温度で保温され、かつPBS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。bFGF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IRS-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、bFGF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)。

10

【実施例3】

【0037】

20

IRS - 1 (180 kDa 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

【0038】

bFGF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)。IRS-1タンパク質は、抗IRS-1モノクローナル抗体により抽出された。この抽出は、抗IRS-1モノクローナル抗体(Sigma)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IRS-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のジチオトレイトールを含み、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、PBS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PBS緩衝液により3回洗浄され、1µg/mlの抗ホスチロシンモノクローナル抗体を含むPBS緩衝液中で2時間、外界温度で保温され、かつPBS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IRS-1タンパク質は、bFGF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、bFGF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)。

30

40

【実施例4】

【0039】

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

【0040】

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bFGFによって刺激された内皮細胞の培養に対応するウェ

50

ル。(図3B)

ロット3：配列識別番号3の配列の $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のオリゴヌクレオチドによって4時間保温され、次に $3\text{ng}/\text{ml}$ 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 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 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に見える。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
10
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/ ml 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) $200\mu\text{l}$ 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。
20

【0045】

ロット2号：各マウスは、 10^6 細胞/ ml の割合でPBS中に分散した、 $200\mu\text{l}$ 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、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のPBS中で希釈された $200\mu\text{l}$ 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、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のPBS中の $200\mu\text{l}$ 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。
30

【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号のマウスのその間の差は、著しい。
40

【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、皺の寄った外観を取る。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。
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(desepithelialization)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す、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。

【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-トールバン レゼルブフ)は、自由に食物を与えられ、かつ水を飲まされ、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。

【0054】

ラットは、ケタミン(Ketamine 1000、UVA、フランス、イブリ-シュル-セヌ；128mg/kg)及びクロルプロマジン(Largactil 25mg/ml；Specia Rhone Poulenc、フランス、パリ；5mg/kg)の混合物によって麻酔をかけられ、筋肉内注射をされる。一滴のオキシプロカイン(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 51 S、LEICA、スイス、ヘーアブルック)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、PBS 1Xでふんだんにすすがれ、オキシテトラサイクリン軟膏(Posi-cycline、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)。

【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+PBS 1X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、

Bグループ：モデル+PBS 1X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+PBS 1X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+PBS 1X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+PBS 1X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

10

20

30

40

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日後に安楽死させられた。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 1X 4%中に3時間、次にPBS 1X中に一晩浸漬された。次に手術用顕微鏡で1mm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。

【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。

【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 1X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60µMの濃度、及び局所適用に対して200µM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'-TATCCGGAGGGCTTCGCCATGCTGCT-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：60µm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：200µM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：60µM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：200µM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 1Xの結膜下注射(PBS)

Fグループ：治療なし(Off)

【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、次に安楽死させられ、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。

【0067】

観察された結果は、下記の表1に示す：

【 0 0 6 8 】

【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

10

【 0 0 6 9 】

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 μ M 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 $P = 0.0011$ の非常に有意義な結果)；200 μ M 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 ($P < 0.0001$ の極めて有意義な結果)。

20

【 0 0 7 0 】

60 μ M のセンス ODN の結膜下投与 (C) 又は 200 μ M のセンス ODN の局所適用 (D) と比較すると、60 μ M のアンチセンス ODN の注射 (A) 及び 200 μ M 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、 $P < 0.0001$ で極めて有意義である (図 4 A ~ 4 F)。

【 0 0 7 1 】

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 μ M) 又は局所に (200 μ M) 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。

30

【 0 0 7 2 】

60 μ M のセンス ODN の結膜下注射 (C) 及び 200 μ M 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 ($P = 0.0117$)。

【 0 0 7 3 】

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)。

40

【 0 0 7 4 】

6.7 副作用

【 0 0 7 5 】

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ったが、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

50

プの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 μ 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 μ 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IRS-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】

20

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。

【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, Bunnell 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

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（NSTラック）及びbFGFによって刺激された細胞（S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ブロット図を表す。Bは、刺激されない細胞（NSTラック）及びbFGFによって刺激された細胞（S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ブロット図を示す。

【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（NSTラック）及びbFGFによって刺激された細胞（S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ブロット図を示す。

【図3A】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3B】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3C】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3D】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4A】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4B】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4C】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4D】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4E】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4F】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(desepithelialisation)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障害の結果を示す。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

tgcgccatgct gctgcggagc 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/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 agtcctgtgag 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

<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 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 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> Ologonucleotide 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 catgctgct 19

40

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

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

<400> 21
 ggcttgccat gctgct 16

<210> 22
 <211> 13
 <212> DNA 10
 <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 20
 <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 30
 <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 40
 <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.

10

<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.

20

<400> 27

gtgcgagct gagttcctta taagaattaa tcttaatttt gtattttttc ctgtaagaca 60

ataggccatg ttaattaaac tgaagaagga tatatttggc tgggtgtttt caaatgtcag 120

cttaaaattg gtaattgaat ggaagcaaaa ttataagaag aggaaattaa agtcttccat 180

tgcattgtatt gtaaacagaa ggagatgggt gattccttca attcaaaagc tctctttgga 240

atgaacaatg tgggcgtttg taaattcttg aatgtcttt ctattcataa taaactagat 300

actgttgatc ttttaaaaaa aaaaaa 326

30

<210> 28

<211> 5800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1022)..(4750)

<223>

<400> 28

cggcggcgcg gtcggagggg gccggcgcg agagccagac gccgcccgtt gttttggttg 60

40

gggctctcgg caactctccg aggaggagga ggaggaggga ggaggggaga agtaactgca	120	
gcggcagcgc ctcccagga acaggcgtct tccccgaacc ctccccaaac ctccccatc	180	
ccctctcgcc ctltgtccct cccctctctc ccagccgcct ggagcgaggg gcagggatga	240	
gtctgtccct ccggccggtc ccagctgca gtggtgccc ggtatcgttt cgcctggaaa	300	
agccaactttc tccaccgcgc gagatgggccc cggatggggg ctgcagagga cgcgcccgcg	360	
ggcggcggca gcagcagcag cagcagcagc agcaacagca acagccgcag cgcgcgggtc	420	
tctgcgactg agctggatatt tgggcggctg gtggcggctg ggacggttgg ggggtgggag	480	
gaggcgaagg aggaggagga accccgtgca acgttgggac ttggcaaccc gcctccccct	540	10
gccaaggat atttaatttg cctcgggaat cgctgcttcc agaggggaac tcaggaggga	600	
aggcgcgcgc gcgcgcgcgc tcctggaggg gcaccgcagg gacccccgac tgtcgctctc	660	
ctgtgcggga ctccagccgg ggcgacgaga gatgcatctt cgctccttcc tgggtggcggc	720	
ggcggctgag aggagacttg gctctcggag gatcggggct gccctcacc cggacgcact	780	
gcctccccgc cgggcgtgaa gcgcccgaaa actccggctg ggetctctcc tgggctcagc	840	
agctgcgtcc tccctcagct gccctcccc ggcgcggggg gcggcgtgga tttcagagtc	900	
ggggtttctg ctgcctccag cctgttttgc atgtgccggg ccgcggcgag gacccctcgc	960	
ccccaccgc gttgttttcc ggagcctccc tctgctcagc gttggtggtg gcggtggcag	1020	20
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		30
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	40
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 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 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 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 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	

10

20

30

40

370	375	380		
tcc gcc acc agc ccg gtc agt ctg 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 coa cgg 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 cgg agt tcc ttc cgc agt gtc act ccg gat			2365	10
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 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
ggt cac tac att ttg tct cgg 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	20
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 cgg ttc cga aag aga act cac tcg gca			2605	
Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn 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	30
Gly 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	40
ggc cga aag ggc agt gga gac tat atg ccc atg agc ccc aag agc gta			2941	

Gly 625	Arg	Lys	Gly	Ser	Gly	Asp	Tyr	Met	Pro	Met	Ser	Pro	Lys	Ser	Val 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																
gtg gac ccc aat ggc tac atg atg atg tcc ccc agc ggt ggc tgc tct	3037															
Val Asp Pro Asn Gly Tyr Met Met Met Ser Pro Ser Gly Gly Cys Ser																
660																
cct gac att gga ggt ggc ccc agc agc agc agc agc agc aac gcc	3085															
Pro Asp Ile Gly Gly Gly Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asn Ala																
675																
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																
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																
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																
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 Ser Pro Ser Asp Cys Tyr Tyr Gly																
740																
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																
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																
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																
gct gca aca gca gat gat tct tcc tct tcc acc agc agc gac agc ctg	3469															
Ala Ala Thr Ala Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Asp Ser Leu																
805																
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																
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																
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																
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 Gln																
865																

10

20

30

40

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 etc 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 Glu Thr Gly Thr Glu Glu Tyr Met Lys Met	
930 935 940	
gac ctg ggg ccg ggc cgg 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 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 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 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 etc 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	

10

20

30

40

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 tcagcaaadc ctcttctaac tcatgggtac ccagactcta	4830
aatatttcat gattcacaac taggacctca tatcttcttc atcagtagat ggtacgatgc	4890
atccatttca gtttgtttac tttatccaat cctcaggatt tcattgactg aactgcacgt	4950
tctatattgt gccaaagcgaa aaaaaaaaaat gcactgtgac accagaataa tgagtctgca	5010
taaacttcat cttcaacctt aaggacttag ctggccacag tgagctgatg tgcccaccac	5070
cgtgtcatga gagaatgggt ttactctcaa tgcattttca agatacattt catctgctgc	5130
tgaaactgtg tacgacaaag catcattgta aattatttca tacaaaactg ttacagtttg	5190
gtggagagag tattaatat ttaacatagg ttttgattta tatgtgtaat tttttaatg	5250
aaaatgtaac ttttcttaca gcacatcttt tttttggatg tgggatggag gtatacaatg	5310
ttctgttgta aagagtggag caaatgctta aaacaaggct taaaagagta gaatagggta	5370
tgatccttgt ttttaagattg taattcagaa aacataatat aagaatcata gtgccataga	5430
tggtttctcaa ttgtatagtt atatttgctg atactatctc ttgtcatata aacctgatgt	5490
tgagctgagt tctttataag aattaatctt aattttgtat tttttcctgt aagacaatag	5550
gccatgttaa ttaaaactgaa gaaggatata tttggctggg tgttttcaaa tgtcagctta	5610
aaattggtaa ttgaatggaa gcaaaattat aagaagagga aattaaagtc ttccattgca	5670

10

20

30

40

```
<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	20
			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	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	30
			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	Ala	Val	Val	Leu	Gln	Leu	
	195					200					205					
Met	Asn	Ile	Arg	Arg	Cys	Gly	His	Ser	Glu	Asn	Phe	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	40
			245				250						255			
Met	Arg	Ala	Met	Ser	Asp	Glu	Phe	Arg	Pro	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Ser	

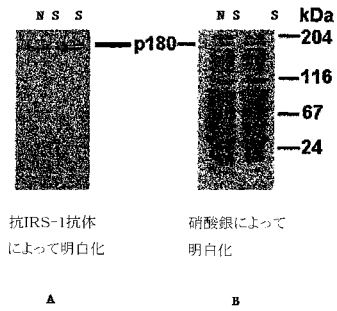
260																265																270																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Ser	Ser	Asn	Cys	Ser	Asn	Pro	Ile	Ser	Val	Pro	Leu	Arg	Arg	His	His																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	

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	Met	Ser	Pro	Ser	Gly	Gly	Cys	Ser	
			660					665					670			
Pro	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Ala	
	675						680					685				10
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				20
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	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 1010	1015	1020	10
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	20
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 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	30
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		40

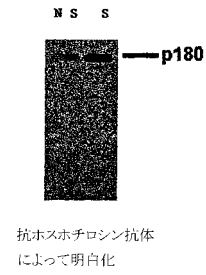
【図 1】

NS: bFGFによって刺激されない細胞
S : bFGFによって刺激された細胞



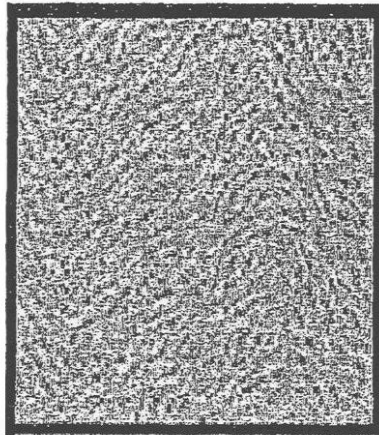
【図 2】

NS: bFGFによって刺激されない細胞
S : bFGFによって刺激された細胞



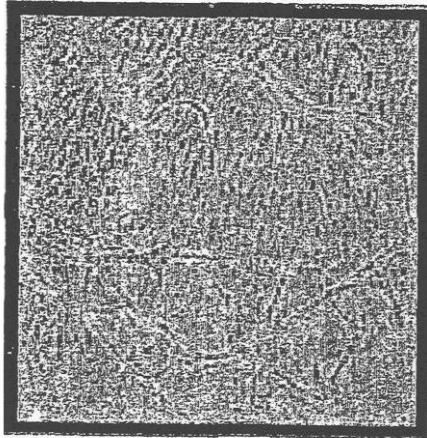
【図 3 A】

ロット1



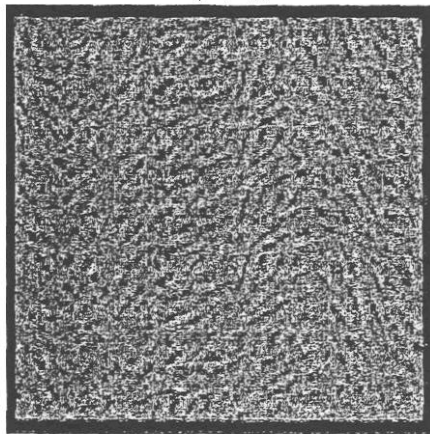
【図3B】

ロット2



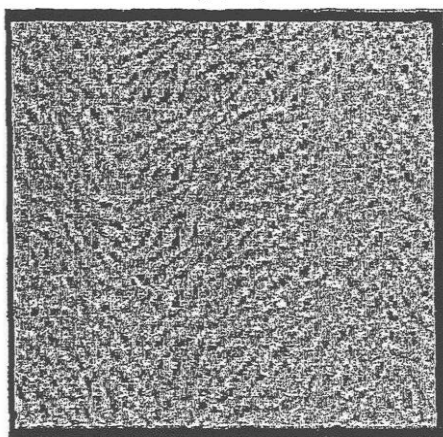
【図3C】

ロット3



【図3D】

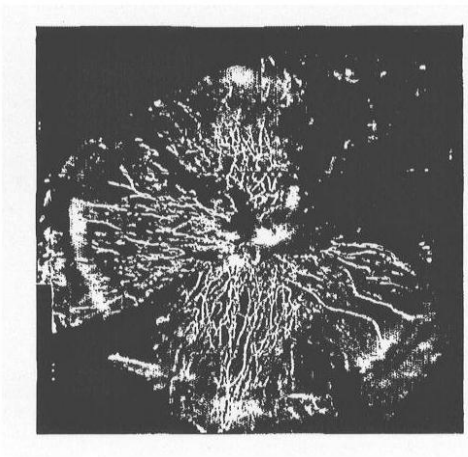
ロット4



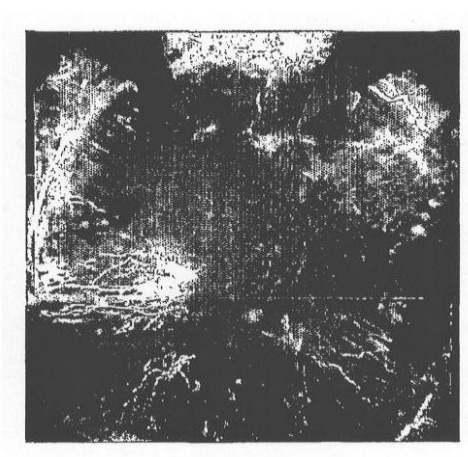
【図 4 A】



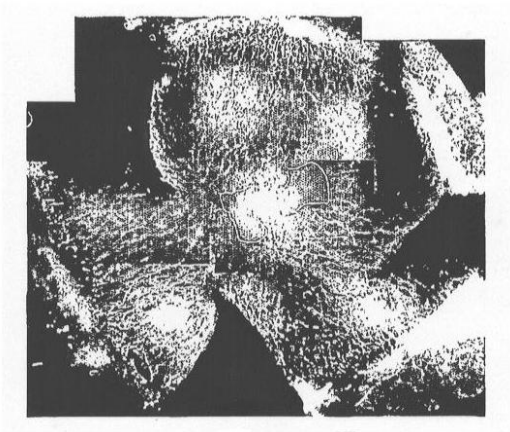
【図 4 B】



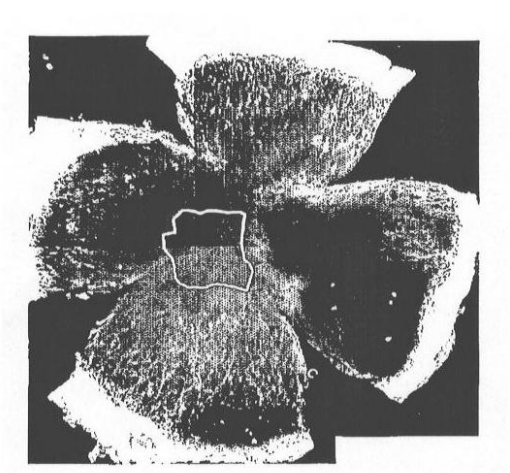
【図 4 C】



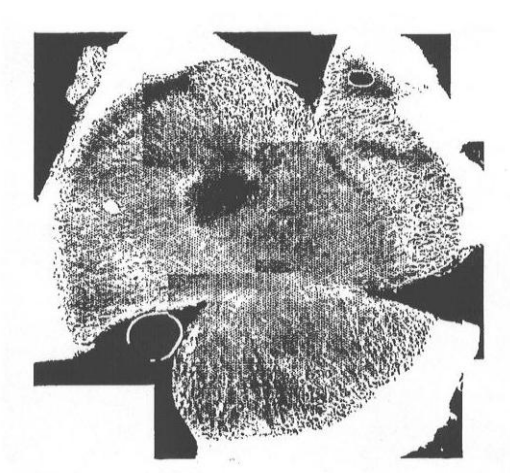
【図 4 D】



【図 4 E】



【図 4 F】



【図 5】



Figure 5A J4 AS60

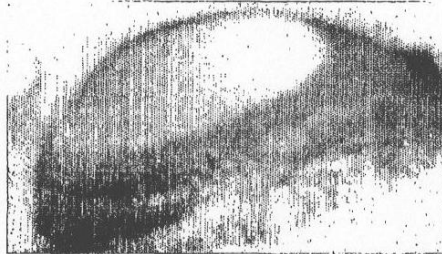


Figure 5B J4 AS200

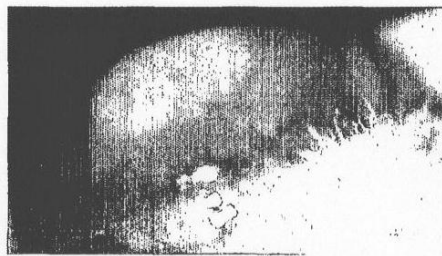


Figure 5C J4 S200

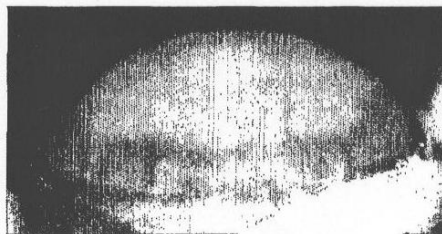


Figure 5D J4 PBS

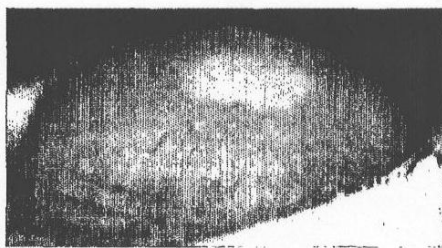


Figure 5E J4 OTt

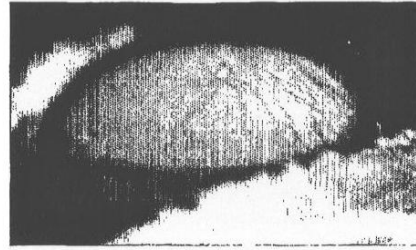


Figure 5F J9 AS60



Figure 5G J9 AS200

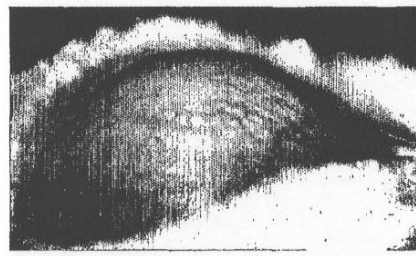


Figure 5H J9 S200

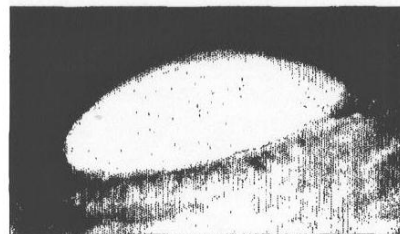


Figure 5I J9 PBS

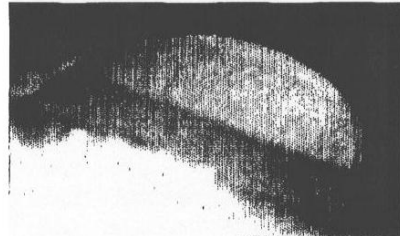


Figure 5J J9 OTt

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			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 9 6 / 0 3 5 7 9 1 (WO , A 1)
 国際公開第 9 2 / 0 1 3 0 8 3 (WO , A 1)
 国際公開第 9 9 / 0 1 6 4 6 2 (WO , A 1)
 国際公開第 0 0 / 0 1 5 7 9 2 (WO , A 1)
 WALLACE, W.C., et al., Mol. Brain Res. , 52 , pp.213-227 (1997)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 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)