

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-190020

(P2007-190020A)

(43) 公開日 平成19年8月2日(2007.8.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C O 8 7
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2007-10778 (P2007-10778)	(71) 出願人	507020565 ローン・プーラン・ロレ・ソシエテ・アノ ニム
(22) 出願日	平成19年1月19日 (2007.1.19)		
(62) 分割の表示	特願平7-510639の分割		
原出願日	平成6年9月29日 (1994.9.29)		
(31) 優先権主張番号	93/11774		
(32) 優先日	平成5年10月4日 (1993.10.4)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(72) 発明者	ジャック・マレ フランス・エフ-75013パリ・リュシ ヤルコ18
		(72) 発明者	フレデリク・レバ フランス・エフ-92160アントニイ・ リュドシヤトネ49・パテイマンフランド ル2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特に神経変性疾患の治療のための医薬組成物およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】神経変性疾患の治療に有用な組換えウイルス、該組換えウイルスを含んで成る組成物の提供。

【解決手段】組換えウイルスのゲノム中に挿入された、核タンパク質である p 5 3 の活性に拮抗できる p 5 3 タンパク質の突然変異状態をコードする核酸、および/または p 5 3 の DNA に結合する部位の全部または一部を含んでなる核酸、および/または転写または翻訳レベルで p 5 3 タンパク質の発現レベルを減少させることができるアンチセンス核酸を含んで成る、組換えウイルス。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組換えウイルスのゲノム中に挿入された、p 5 3 の活性に拮抗できる p 5 3 タンパク質の突然変異状態をコードする少なくとも 1 つの核酸、および / または p 5 3 の DNA への結合のための部位の全部または一部を含んで成る核酸、および / または転写または翻訳レベルで p 5 3 タンパク質の発現レベルを減少させることができるアンチセンス核酸を含んで成る、組換えウイルス。

## 【請求項 2】

アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ - 随伴ウイルスまたはヘルペスウイルスであることを特徴とする、請求項 1 に記載の組換えウイルス。

10

## 【請求項 3】

アデノウイルスであることを特徴とする、請求項 2 に記載の組換えウイルス。

## 【請求項 4】

核酸が配列番号 2 の全部または一部、あるいはその活性変異体を含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の組換えウイルス。

## 【請求項 5】

p 5 3 の DNA へ結合するための部位の全部または一部を含んで成る二本鎖核酸、p 5 3 の活性と拮抗することができる p 5 3 タンパク質の突然変異状態をコードする核酸、および

転写または翻訳レベルで p 5 3 タンパク質の発現レベルを減少させることができるアンチセンス核酸から成る群より選ばれる、数種の同一の、または異なる核酸を含んで成ることを特徴とする、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の組換えウイルス。

20

## 【請求項 6】

欠陥ウイルスであることを特徴とする、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の組換えウイルス。

## 【請求項 7】

請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの組換えウイルスを含んで成る組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

30

## 【0001】

本発明は、特に神経変性疾患の治療における医薬組成物およびその使用に関する。より詳細には、神経変性疾患の治療のための核酸を含む組換えウイルスまたはその使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

p 5 3 遺伝子は 53kDa の核タンパク質をコードする。天然の p 5 3 をコードする野生型遺伝子は、抗癌活性を有する [ 総説として例えば、非特許文献 1 参照 ]。特に、野生型 p 5 3 タンパク質は様々な発癌遺伝子を組み合わせることで感染させた嚙歯動物の繊維芽細胞中に、形質転換座の形成を阻害することができる。この遺伝子の欠失および / または突然変異誘発により変異させた状態は、これに反してほとんどのヒトの癌の発生に参与している [ 例えば、非特許文献 2 参照 ]。この突然変異した状態は r a s 発癌遺伝子と一緒に作用して、ネズミ繊維芽細胞を形質転換させることができる。この理由から、p 5 3 タンパク質またはその遺伝子が癌の治療のための標的として広く研究されてきた。さらに例えば、非特許文献 3 は、虚血性マウスの脳に p 5 3 発現を記載した。しかし、この発現が神経変性またはそれに平行する症状の症例を構成しているかどうかを示すこれらの結果は何ら記載されていない。さらに、この文献中には、考察、または治療的取り組みについての何ら示唆されていない。

40

【非特許文献 1】Oren、FASEB J.6(1992) 3169

【非特許文献 2】Baker et al.、Science 244(1989)217

50

【非特許文献3】Chopp et al., Biochem.Biophys.Res.Com 182(1992)1201

【発明の開示】

【0003】

本発明の一部は、p53タンパク質が神経変性のメディエーターを構成するという実証に基づき完成された。また、p53タンパク質の活性を少なくとも部分的に阻害できる化合物を使用すると、ニューロンの死の過程を遮断することができる、という証明に基づき完成された。

【0004】

神経変性の分子機構を研究するために、出願人はモデルとしてp53遺伝子の発現を不活性化したマウスを使用した[例えば、Donehowerら、Nature 356(1992) 215]。これらのマウスに不可逆的な病巣虚血性実験を行い、そして梗塞の容量を対照の野生型マウスで観察される容量と比較した(同じ系統、同じ性別、同じ年齢、同じ供給元)。得られた結果は、p53遺伝子を発現しないマウスの虚血後の梗塞の容量は、統計的に有意に減少することを示した(20%) (実施例を参照にされたい)。出願人は、抗-p53アンチセンスの使用により、皮質細胞培養物に対するグルタミン酸-誘導死を減少させることができることも実証した。これらの結果は、p53タンパク質が神経変性においてメディエーター的役割を果たすことを示しており、これは従来技術で報告されていない観察であり、そしてこのタンパク質のこの活性を制御することにより、ニューロンの死を撃退することが可能になる。したがってこのp53タンパク質、その遺伝子およびそれに相互作用できるすべての因子は、神経変性過程の治療において、新規の薬理学上の標的を構成する。

【0005】

したがって本発明は部分的には、神経変性疾患の治療のために、p53活性を少なくとも部分的に遮断することができる化合物の使用から成る。

【0006】

本発明の第一の主題は神経変性疾患の治療および/または予防を目的とする医薬組成物の調製用に、p53タンパク質の活性を少なくとも部分的に阻害する化合物の使用から成る。

【0007】

本発明の目的のために、p53タンパク質の活性を少なくとも部分的に阻害することができる化合物は、(i)転写、翻訳または翻訳後のレベルでp53の合成に、あるいは(ii)p53のDNAに対する結合に作用する化合物であることができる。

【0008】

p53タンパク質の合成に対して作用する化合物の中で、転写または翻訳レベルでp53の発現を減少または抑制することができる、アンチセンスヌクレオチド配列を挙げることができる。

【0009】

そのような配列は、まさにp53 mRNAに対するものであり、そしてそのタンパク質への翻訳に作用するものであり：それらはオリゴヌクレオチド(例えば、欧州特許出願公開第092 574号、同231 495号、国際公開第92/03568号、同91/13080号明細書に記載されたような、合成、化学修飾等)、あるいは例えば欧州特許出願公開第140 308号明細書に記載された技術に従い、p53 mRNAと選択的に相互反応することができるRNAをコードするDNA配列であってよい。

【0010】

そのような配列はp53をコードする遺伝子にも対するものであり、そしてそのRNAへの転写に作用する。より詳細には、これらの配列は遺伝子のコーディング領域(p53構造遺伝子)に対し、または非コーディング領域(転写を調節する領域、エキソン等)に対するものであってよい。そのような配列は例えば、欧州特許出願公開第558 634号、国際公開第91/06626号、同92/10590号、同93/10820号明細書等に記載されたような条件下で調製できる。

【0011】

p 5 3 の D N A への結合に作用する化合物の中で、特に p 5 3 拮抗物質、または p 5 3 と相互作用でき、かつこのように p 5 3 の D N A 結合活性をモジュレートすることができるタンパク質を挙げることができる。これに関して、本質的に不活性な突然変異した状態から成る p 5 3 の陰性優性突然変異体を挙げることができ、これは D N A と相互作用するために野生型タンパク質と競合することができる。例えばそのような突然変異体は p53Va1135 突然変異体であり、または Michalovitz ら [J. Cell. Bioch. 45(1991) 22] に記載されている他の形態のものである。これらは好ましくは、本発明の枠内でこれらの突然変異体をインビボで発現できる遺伝的構築物の状態で使用するようにできる。p 5 3 の D N A への結合を少なくとも部分的に阻害することができる他の化合物は、p 5 3 が D N A へ結合するための部位を再生する二本鎖核酸から成る [El-Deiry ら、Nature 1(1992) 45; Kern ら、Science 252, 1708; Friedman ら、PNAS 90(1993) 3319]。出願人は、そのような核酸が細胞中に存在する転写因子を複合体化でき、それらが内因性の部位に結合することを防ぐことができ、したがってその転写活性を遮断することができることをまさに示した。

10

## 【0012】

好適な態様では、本発明の枠内で使用される化合物は、p 5 3 の D N A への結合のための部位の全部または一部を含んで成る二本鎖核酸である。より詳細には、この核酸は配列番号 2 の全部または一部、あるいはその活性変異体を含んで成る。活性変異体という用語は、本発明の目的に関して、p 5 3 タンパク質への結合特性が保存された配列番号 2 の任意の変異体を言う。そのような変異体は配列番号 2 の配列の突然変異、欠失、置換および/または塩基の付加、続いてこの結合活性をインビトロで確認することにより得ることができる。

20

## 【0013】

他の好適な態様では、本発明の枠内で使用される化合物は、p 5 3 タンパク質の活性と拮抗できる p 5 3 タンパク質の突然変異した状態をコードする核酸である。

## 【0014】

さらに好適な態様では、本発明の枠内で使用される化合物は、転写または翻訳レベルで、p 5 3 タンパク質の発現レベルを減少させることができるアンチセンス核酸である。より好ましくは、これは p 5 3 細胞性 m R N A の翻訳を阻害できるアンチセンスリボ核酸をコードする D N A である。そのようなアンチセンスは配列番号 1 の配列に表されている。

## 【0015】

この核酸は、例えば、ヒトまたは動物に注射された後に、神経変性の予防を誘導する、または治療するために使用することができる。特に、これは国際公開第 90/11092 号明細書に記載された手法に従い、裸の D N A 状態で注射することができる。また、例えば D E A E - デキストラン [Pagano ら、J. Virol. 1(1967) 891] と、核タンパク質 [カナダら、Science 243(1989) 375] と、脂質 [Felgner ら、PNAS 84(1987) 7413] との複合体の状態で、リポソーム [Fraley ら、J. Biol. Chem. 255(1980) 10431] 等の状態で投与することができる。

30

## 【0016】

好ましくは、本発明の枠内で使用される核酸はベクターの一部を形成する。そのようなベクターの使用は、まさに処理する細胞中への核酸の投与を増大することができ、そしてまた該細胞中でのベクターの安定性を上昇させ、持続性の阻害効果を得ることを可能にする。さらに、同じベクター中に数種の核酸配列を導入することも可能であり、これはまたは治療の効力を増大させる。

40

## 【0017】

使用するベクターは、動物細胞、好ましくはヒト神経細胞を形質転換することができるかぎり、様々な起源であってよい。本発明の好適な態様では、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ-随伴ウイルス (A A V)、ヘルペスウイルス等から選択できるウイルスが使用される。

## 【0018】

これに関して、本発明の主題はそのゲノム中に挿入される、p 5 3 タンパク質の活性と拮抗することができる p 5 3 タンパク質の突然変異した状態をコードする核酸、ならびに

50

ノまたは p 5 3 の D N A への結合部位の全部または一部を含んで成る核酸、ならびにノまたは p 5 3 タンパク質の発現レベルを転写または翻訳レベルで減少させることができるアンチセンス核酸を含んで成る任意の組換えウイルスである。

【 0 0 1 9 】

本発明の組換えウイルスは、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ - 随伴ウイルス等から選択できる。好ましくは組換えウイルスは、特にアデノウイルスのような神経細胞を感染できるウイルスである。ヘテロロガスな核酸配列を組み込んだアデノウイルス、レトロウイルスまたは A A V に由来するベクターは、文献に記載されている [ Akli ら、Nature Genetics 3(1993) 224; Stratford-Perricaudet ら、Human Gene Therapy 1(1990) 241; 欧州特許出願公開第 185 573 号明細書、Levero ら、Gene 101(1991)195; Le Gal la Salle ら、Science 259(1993)988; Roemer および Friedmann, Eur. J. Biochem. 208(1992)211; Dobson ら、Neuron 5(1990)353; Chiocci ら、New Biol. 2(1990) 739; ミヤノハラ ら、New Biol. 4(1992) 238; 国際特許出願公開第 91/18088 号明細書 ]。

10

【 0 0 2 0 】

有利には、本発明の組換えウイルスは欠陥ウイルスである。“欠陥ウイルス”という用語は、標的細胞中で複製できないウイルスを言う。したがって一般的に、本発明の枠組み中で使用される欠陥ウイルスのゲノムは、感染細胞中で少なくとも該ウイルスの複製に必要な配列が欠けている。これらの領域は除去される（完全に、または部分的に）か、あるいは非機能的にされるか、あるいは他の配列、特に核酸に置き換えられることができる。これにもかかわらず欠陥ウイルスは好ましくはそのゲノム中にウイルス粒子の被包化に必要な配列を保存している。

20

【 0 0 2 1 】

本発明の核酸配列を欠陥組換えアデノウイルスに組み込んだ状態で使用することが特に有利である。

【 0 0 2 2 】

実際、構造および特性がかなり変化した様々な血清型が存在するが、これらはヒト、そして特に免疫抑制個体に対して病原性ではない。さらに、これらのウイルスは感染した細胞のゲノムに組み込まれず、そして外因性 D N A の巨大な断片を組み込むことができる。様々な血清型の中でも、2 または 5 型アデノウイルス ( A d 2 または A d 5 ) が、本発明の枠組み内で好ましい。A d 5 アデノウイルスの場合には、複製に必要な配列は E 1 A および E 1 B 領域である。

30

【 0 0 2 3 】

本発明の特別な態様は、少なくとも上記の 2 つの核酸を含んで成るベクター、特にウイルスベクターから成る。

【 0 0 2 4 】

本発明の欠陥組換えウイルスは、欠陥ウイルスととりわけ上記定義の核酸配列を持つプラスミドとの間の相同組換えにより調製できる [ Levrero ら、Gene 101(1991) 195; Graham EMBO J. 3(12)(1984) 2917 ]。相同組換えは、該ウイルスおよびプラスミドを適当な細胞系中に同時 - トランスフェクションした後に生成される。使用する細胞系は組換えの危険性を回避するように、好ましくは組換え状態で ( i ) 該要素により形質転換できるべきであり、そして ( ii ) 欠陥ウイルスのゲノムの部分を相補できる配列を含むべきである。欠陥組換えアデノウイルスの調製に使用できる系の例として、特にそのゲノム中に Ad5 アデノウイルスのゲノムの左部を組み込んだ ( 12% ) ヒト胚腎臓系 293 [ Graham ら、J. Gen. Virol. 36(1977) 59 ] を挙げることができる。欠陥組換えレトロウイルスの調製に使用できる系の例として、C R I P 系を挙げることができる [ Danos および Mulligan, PNAS 85(1988) 64 60 ]。

40

【 0 0 2 5 】

次に操作したウイルスを従来の分子生物学的技術により回収し、そして精製する。

【 0 0 2 6 】

また本発明の主題は、少なくとも 1 つの上記定義の組換えウイルスを含んで成る医薬組

50

成物に関する。

【0027】

本発明の医薬組成物は局所、経口、非経口、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下または目内投与等のために配合できる。

【0028】

好ましくは、医薬組成物は、注射することができる配合物のために医薬的に許容できる賦形剤を含む。これらは特に塩溶液（リン酸ナトリウムまたは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはマグネシウム等、あるいはそのような塩の混合物）、滅菌水、等張液または乾燥組成物、特に凍結乾燥した組成物であってよく、これらは場合に依りて滅菌水または生理塩溶液の添加により、注射溶液が構成されてもよい。

10

【0029】

投与に使用される核酸（配列またはベクター）の用量は、様々なパラメーター、そして特に使用する投与様式、関連する病因、発現する核酸、あるいは所望する治療期間に従い調整できる。一般的に本発明の組換えウイルスに関して、これらは $10^4 - 10^{14}$  pfu/ml、好ましくは $10^6 - 10^{10}$  pfu/mlの用量の状態に配合され、そして投与される。pfuという用語は（"plaque forming unit: プラーク形成単位"）は、ウイルス溶液の感染力に相当し、そして適当な細胞培養物を感染させ、そして一般的に48時間後に感染細胞のプラーク数を測定することにより決定される。ウイルス溶液のpfu力価を決定するための技術は文献に詳細に記載されている。

【0030】

そのような医薬組成物は神経変性疾患の治療および/または予防のために、そして特に虚血症、低酸素症、無酸素症、低血糖症、てんかん性の発作あるいは大脳および脊髄外傷に合併する神経変性の治療および/または予防のために、またはハンチントン病、アルツハイマー病、パーキンソン病または筋萎縮性側索硬化症の治療および/または予防のために、ヒトに使用することができる。

20

【0031】

本発明は以下の説明をするものであって制限するものではない実施例によりより完全に記載されている。

【0032】

一般的なクローニング技法

プラスミドDNAの調製的抽出、プラスミドDNAの塩化セシウム勾配遠心、アガロースおよびアクリルアミドゲル電気泳動、電気溶出によるDNA断片の精製、タンパク質のフェノールまたはフェノール-クロロホルム抽出、生理的媒質中でのDNAのエタノールまたはイソプロパノール沈殿、大腸菌の形質転換等の分子生物学で従来から使用されている方法は、当業者に周知であり、文献に豊富に記載されている [Maniatisら、"モレキュラークローニング、ア ラボラトリーマニユアル: Molecular Cloning, a Laboratory Manual" コールドスプリングハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、コールドスプリングハーバー、N.Y., 1982; Ausubel F.M.ら、(編集)、"分子生物学の最新の方法: Current Protocols in Molecular Biology"、ジョン ウィリー アンド サン (John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1987]。

30

40

【0033】

pBR322型およびpUC型のプラスミドならびにM13シリーズのファージは、市販されているものである（ベセスダリサーチラボラトリーズ: Bethesda Research Laboratories）。

【0034】

ライゲーションのために、DNA断片をその大きさに従いアガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、フェノールまたはフェノール/クロロホルム混合物で抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてファージT4 DNAリガーゼ（バイオラボズ: Biolabs）の存在下で、供給元の推奨に従いインキュベーションすることができる。

【0035】

5'粘着末端のファイリングは、大腸菌DNAポリメラーゼI（バイオラボズ）のクレノ

50

一断片で、供給元の仕様に従い行うことができる。3'粘着末端の破壊は、ファージT4 DNAポリメラーゼ(バイオラボズ)の存在下で、製造元の推奨に従い行う。5'粘着末端の破壊は、S1ヌクレアーゼで制御された処理により行う。

【0036】

合成オリゴデオキシヌクレオチドによるインビトロ部位特異的突然変異誘発法は、Taylorらにより開発された方法[Nucleic Acids Res.13(1985)8749-8764]に従い、アマルシャム(Amersham)により販売されているキットを使用して行うことができる。

【0037】

DNA断片の酵素的増幅、いわゆるPCR[Polymerase-catalysed Chain Reaction:ポリメラーゼ-触媒連鎖反応、Saiki R.K.ら、Science 230(1985)1350-1354; Mullis K.B.およびFaloona F.A., Meth.Enzym.155(1987)335-350]法は、“DNAサーマルサイクラー”(パーキンエルマーシートス:Perkin Elmer Cetus)を使用して、製造元の仕様に従い行うことができる。

【0038】

ヌクレオチド配列の確認はSangerらにより開発された方法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74(1977)5463-5467]により、アマルシャムが市販しているキットを使用して行うことができる。

【0039】

<実施例>

【実施例1】

【0040】

p53遺伝子抑制による、虚血性にされたマウス中の梗塞容量の減少。

【0041】

この実施例は、p53遺伝子の抑制が虚血性となったマウス中の梗塞の容量に対して及ぼす効果を記載する。そのために、中大動脈を閉鎖することによりマウスに虚血を誘発し、そして梗塞の容量を測定し、そして次に比較した。

【0042】

手順:動物(C57/Blc 9から12週齢のオスマウス、ゲンファーム、デンマーク;野生型ホモ接合体またはp53)を、酸素、亜酸化窒素および1.8%ハロタンの混合物で麻酔をかけ、全手術工程中、この条件下に維持した。直腸の温度を $37 \pm 0.5$ に、加熱カバーで維持した。左中大脳動脈を、二極性クリップで電気凝固法により麻痺させた。傷を縫い合わせ、そして動物を30度の部屋に24時間置き、餌と水は自由に摂取させた。24時間後、動物を頸部切断により屠殺した。脳を取り出し、 $-30$ 度のイソペンタン浴に浸し、そして次に $-80$ 度に保存した。40 $\mu$ mの組織片を $-20$ 度の低温保持装置中で、500 $\mu$ m毎の割合で、梗塞が現れたところからそれが消失するように作成した。これらの切片を次にCresylバイオレットで染色した。梗塞の容量は画像分析により測定する。統計的分析は、様々な値の同質性を確認した後、独立した群について学生t試験により行う。様々な値が同質ではなかった場合、Wilcoxonの非パラメーター試験を使用した。

【0043】

結果:得られた結果を以下の表に表す。

【0044】

10

20

30

40

【表 1】

	P 5 3 マウス	対照、マウス
試験した全動物数	45	46
平均体重 (g)	25.73	25.44
平均温度 (°C)	36.80	37.01
梗塞の平均容量(mm <sup>3</sup> )	24.95+/-1.81	31.54+/-1.86

10

## 【0045】

これらの結果は、p 5 3 遺伝子を発現していないマウス中の虚血後の梗塞容量が、20%のオーダーで減少したことを示す。したがってこれらの結果は、p 5 3 活性の抑制が神経変性を減少させることができることを示している。

## 【実施例 2】

## 【0046】

皮質ニューロンの初期培養物のグルタミン酸塩により誘導される細胞死の、抗 - p 5 3 アンチセンス核酸による抑制

この実施例は、初期培養物中の胚性ラット皮質ニューロンについて、グルタミン酸塩により誘導される細胞死に対する、抗 - p 5 3 アンチセンス核酸の効果を記載する。

20

## 【0047】

グルタミン酸塩は中枢神経系を刺激する主要な神経伝達物質である。しかし、異常に長時間、または生理的濃度よりも高濃度のグルタミン酸塩にさらされると、エキシサイトトキシティー (excitotoxicity) と呼ばれる神経毒性を起こすことがある [Olney Adv. Exp. Med. Biol. 203(1986) 631]。多くの実験に関する論争は、この種の毒性が虚血、低酸素症、低血糖症、てんかん性発作、あるいは大脳外傷に伴う神経変性の原因であることを示唆している [Choi, J. Neurobiol. 23(1992) 1261]。このエキシサイトトキシティーは、ハンチントン舞蹈病 [Youngら、Science 241(1988) 981]、およびアルツハイマー疾患 [Kohら、Brain Res. 533(1990) 315; Mattsonら; J. Neurosci. 12(1992) 376] のような疾患の病因にも

30

## 【0048】

アンチセンス核酸の調製および配列：アンチセンスオリゴヌクレオチドは、全自動ヌクレオチド合成器により合成した (Maniatis)。オリゴヌクレオチドの配列は次のとおりである：5' - CGACTGTGAATCCTCCAT - 3' (配列番号 1)。

## 【0049】

抑制の研究：胎児性のウイスター ラット皮質細胞 (E17) を、Dichter の方法に従い単離し [Brain Res. 149(1978) 279]、6-ウェル Costar プレートで、10 μg/ml のインスリン、10 μg/ml のトランスフェリン、10ng/ml の亜セレン酸ナトリウム、10nM のプロゲステロン、1nM のトリヨードサイロニンを含む DMEM 培地中 (ダルベッコの改良イーグル培地) で培養し (35 分間、6 × 10<sup>5</sup> 細胞 / プレート)、そしてオープン中 (37 °C、5% CO<sub>2</sub>) で保存した。2 μM の上記抗 - p 5 3 アンチセンス核酸を、接種中、および次に 1 日および 2 日目に培養物へ加えた。グルタミン酸塩 (5mM) を 2 日目に投与し、同時に抗 - p 5 3 アンチセンス核酸を投与した。グルタミン酸塩により誘導された毒性を培養 24 時間後に、Manthorpe により記載された方法 [Dev Brain. res 25(1986) 191] に従い、ミトコンドリア活性を測定することにより決定した。

40

## 【0050】

得られた結果を図 1 に表す。これらは、抗 - p 5 3 アンチセンス核酸がグルタミン酸塩

50

に誘導された毒性を約25%まで減少できることを明らかに示している。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】皮質ニューロンの初期培養物に対する、抗-p53アンチセンス核酸による、グルタミン酸により誘導された細胞死の阻害を示すグラフである。

【図1】

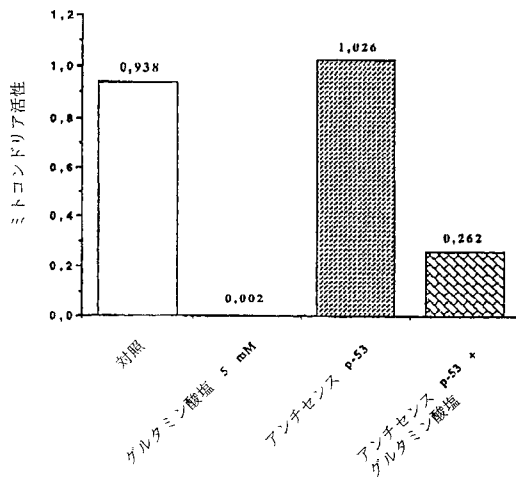


FIGURE 1

【配列表】

2007190020000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 ジャン・マリー・ステュツマン

フランス・エフ - 9 4 4 4 0 ビルクレスヌ・リュドラルシユ 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 EA02 GA11 HA01 HA11  
HA17

4B065 AA90Y AA95X AA97X AB01 AC14 BA01 CA23 CA24 CA44

4C084 AA02 AA13 BA44 CA53 NA14 ZA01

4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZA01