



(22) **Date de dépôt/Filing Date:** 2002/11/08
(41) **Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.:** 2003/05/15
(45) **Date de délivrance/Issue Date:** 2017/10/31
(62) **Demande originale/Original Application:** 2 466 773
(30) **Priorités/Priorities:** 2001/11/09 (FR01/14549);
2002/04/10 (FR02/04474)

(51) **Cl.Int./Int.Cl. C12N 15/113** (2010.01),
A61K 31/713 (2006.01), **C07H 21/00** (2006.01)

(72) **Inventeurs/Inventors:**
HAREL-BELLAN, ANNICK, FR;
AIT-SI-ALI, SLIMANE, FR;
CABON-GEORGET, FLORENCE, FR;
CHAUCHEREAU, ANNE, FR;
DAUTRY, FRANCOIS, FR;
MARTINEZ, LUIS, FR

(73) **Propriétaire/Owner:**
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS), FR

(74) **Agent:** GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) **Titre : OLIGONUCLEOTIDES INHIBITEURS ET LEUR UTILISATION POUR REPRIMER SPECIFIQUEMENT UN GENE**
(54) **Title: INHIBITOR OLIGONUCLEOTIDES AND THEIR USE FOR SPECIFIC REPRESSION OF A GENE**

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention a pour objet un oligonucléotide double brin caractérisé en ce qu'il est constitué de deux séquences oligonucléotidiques complémentaires formant un hybride comprenant chacune à l'une de leurs extrémités 3' ou 5' un à cinq nucléotides non appariés formant des bouts simples brins débordant de l'hybride, l'une desdites séquences oligonucléotidiques étant substantiellement complémentaire d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN à réprimer spécifiquement. L'invention se rapporte aussi à l'utilisation desdits oligonucléotides dans des compositions pharmaceutiques notamment pour le traitement des cancers.



ABRÉGÉ

L'invention a pour objet un oligonucléotide double brin caractérisé en ce qu'il est constitué de deux séquences oligonucléotidiques complémentaires formant un hybride comprenant chacune à l'une de leurs extrémités 3' ou 5' un à cinq nucléotides non appariés formant des bouts simples brins débordant de l'hybride, l'une desdites séquences oligonucléotidiques étant substantiellement complémentaire d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN à réprimer spécifiquement. L'invention se rapporte aussi à l'utilisation desdits oligonucléotides dans des compositions pharmaceutiques notamment pour le traitement des cancers.

OLIGONUCLEOTIDES INHIBITEURS ET LEUR
UTILISATION POUR REPRIMER SPECIFIQUEMENT UN GENE.

La présente invention concerne le domaine de
5 l'investigation et du traitement génétiques de pathologies
humaines, notamment les cancers ou les maladies
infectieuses. Plus particulièrement, l'invention vise à
offrir des moyens pour déterminer la fonction d'un gène ou
d'une famille de gènes impliqués dans un processus
10 cellulaire, et pour réprimer un gène nocif responsable
d'une pathologie chez l'homme ou l'animal. L'invention se
rapporte aux agents actifs pour la mise en œuvre de ces
méthodes et les compositions les contenant.

15 On connaît dans l'art antérieur, des techniques
d'oligonucléotides anti-sens permettant d'inhiber
spécifiquement un gène dans les cellules de mammifères. Ces
techniques sont basées sur l'introduction dans les cellules
d'un court oligonucléotide d'ADN complémentaire du gène
20 cible. Cet oligonucléotide induit la dégradation de l'ARN
messager transcrit par le gène cible. Un autre mode
d'action des anti-sens consiste à introduire dans la
cellule un oligonucléotide d'ADN qui va former une triple
hélice avec le gène cible. La formation de cette triple
25 hélice réprime le gène soit en bloquant l'accès pour des
protéines activatrices, soit dans des approches plus
sophistiquées, en induisant la dégradation du gène. Aucune
de ces approches ne semble s'appuyer sur un mécanisme
cellulaire existant dans les cellules de mammifères, et
30 elles se sont avérées peu efficaces. En effet, l'utilisation
des anti-sens en clinique est réduite à quelques cas très
rares, et il n'y a aucune utilisation possible des
oligonucléotides formant triple hélice.

La méthode de l'invention est basée sur
35 l'interférence ARN désigné aussi « RNA'inh » ou « RNAi » ou

encore co-suppression, qui a été mise en évidence dans les plantes. Chez les plantes, il a été observé que l'introduction d'un long ARN double brin, correspondant à un gène, induit la répression spécifique et efficace du gène ciblé. Le mécanisme de cette interférence comporte la dégradation de l'ARN double brin en courts duplex d'oligonucléotides de 20 à 22 nucléotides.

Les Inventeurs ont maintenant montré que ce principe peut s'appliquer à des gènes de mammifères qui jouent un rôle important dans le contrôle du destin cellulaire.

L'approche « RNA'inh » plus généralement dénommée selon l'invention oligonucléotides inhibiteurs ou ARNi s'appuie sur un mécanisme cellulaire dont l'importance est soulignée par son grand degré de conservation puisque ce mécanisme est conservé à travers les règnes et les espèces et a été montré non seulement chez la plante, mais aussi chez le vers *Caenorhabditis Elegans* et la levure et les mammifères, homme et souris.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de l'invention ont montré que cette approche est beaucoup plus efficace pour réprimer spécifiquement les gènes que les techniques envisagées dans l'art antérieur. En outre, elle réunit potentiellement les avantages des anti-sens et des anti-gènes. En effet, chez la plante, la co-suppression s'effectue au niveau post-transcriptionnel, sur l'ARN mature, mais aussi au niveau transcriptionnel, donc sur le gène lui-même. En effet, la répression se transmet de génération en génération et permettrait donc de réprimer un gène de façon prolongée voire définitive.

L'invention a donc pour objet un oligonucléotide double brin pour être utilisé dans un processus d'interférence ARN (RNAi) caractérisé en ce qu'il est constitué de deux séquences oligonucléotidiques complémentaires comprenant chacune à l'une de leurs

extrémités 3' ou 5' un à cinq nucléotides non appariés formant des bouts simples brins débordant de l'hybride, l'une desdites séquences oligonucléotidiques étant substantiellement complémentaire d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN cible que l'on souhaite réprimer spécifiquement. Cet ADN ou ARN peut être de toute nature, il peut s'agir par exemple d'ARN messenger ou ribosomique ou encore de préférence d'un gène.

Avantageusement, chacune des deux séquences oligonucléotidiques complémentaires comprend à la même extrémité 3' ou 5' un à cinq nucléotides non appariés formant des bouts simples brins débordant de l'hybride.

Avantageusement les deux séquences oligonucléotidiques ont la même taille.

Du fait de la loi d'appariement des bases, on désignera aussi indistinctement ci-après par oligonucléotide de l'invention, l'une ou l'autre des séquences de l'oligonucléotide double brin de l'invention qui est complémentaire d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN que l'on souhaite réprimer spécifiquement et qui peut donc être aussi simple ou double brin(s).

Les oligonucléotides de l'invention peuvent être de nature ribonucléotidique, désoxy ribonucléotidique ou mixte. On préfère toutefois que l'oligonucléotide complémentaire de la séquence cible, aussi désigné brin antisens, soit majoritairement de nature ribonucléotidique. Le brin sens peut être de nature ribonucléotidique désoxy ribonucléotidique ou mixte. Des exemples d'oligonucléotides de l'invention de type ARN/ARN ou ADN/ARN sont donnés dans la partie expérimentale ci-après.

En effet, les hybrides ARN/ARN sont plus stables que les hybrides ADN/ADN ou ADN/ARN et beaucoup plus stables que les acides nucléiques simples brins utilisés dans des stratégies anti-sens.

On entend aussi par oligonucléotide, un polynucléotide de 2 à 100, et plus généralement de 5 à 50, nucléotides de type ribo-, désoxyribo- ou mixte.

La partie de la séquence oligonucléotidique qui est hybridée et complémentaire de la séquence cible a de préférence une taille comprise entre 15 et 25 nucléotides et tout préférentiellement de 20 à 23 nucléotides.

Les oligonucléotides doubles brins de l'invention comprennent, de préférence à l'extrémité 3' de chaque brin, de 1 à 5 nucléotides de préférence de 2 à 3 et tout préférentiellement 2 nucléotides débordant de l'hybride. Ces nucléotides débordant de l'hybride peuvent être ou non complémentaire de la séquence cible. Ainsi, dans une forme de réalisation particulière de l'invention, les nucléotides débordant de l'hybride sont des nucléotides quelconque par exemple des Thymines.

On peut représenter un oligonucléotide double brin de l'invention de la façon suivante, où chaque tiret correspond à un nucléotide et où chaque brin comprend à son extrémité 3' deux thymines débordant de l'hybride :

```

      5'-----TT3'
      3'TT-----5'

```

La séquence des oligonucléotides de l'invention est substantiellement complémentaire d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN messenger d'un gène que l'on souhaite réprimer spécifiquement. Bien que l'on préfère des oligonucléotides parfaitement complémentaires de la séquence cible, on entend par substantiellement complémentaire, le fait que la séquence oligonucléotidique peut comprendre quelques nucléotides mutés par rapport à la séquence cible dès lors que les propriétés de répression du gène visé ne sont pas altérées. Ainsi, une séquence oligonucléotidique de l'invention peut comprendre de 1 à 3 nucléotides mutés.

Ces nucléotides mutés peuvent donc être ceux débordant de l'hybride ou des nucléotides à l'intérieur de la séquence oligonucléotide.

5 Ainsi un oligonucléotide de l'invention peut être un hybride parfait ou comprendre un ou plusieurs mismatch au sein du double brin. On préfère toutefois que la partie de la séquence oligonucléotidique qui est hybridée soit parfaitement complémentaire de la séquence cible alors que les nucléotides débordant de l'hybride
10 peuvent être quelconques et notamment des thymines. On entend ainsi également par parfaitement complémentaire le fait que l'oligonucléotide de l'invention soit complémentaire d'une séquence qui appartient à un ADN ou ARN d'un gène muté. Les oligonucléotides de l'invention
15 peuvent permettre ainsi de discriminer entre la séquence du gène sauvage et du gène muté ce qui peut présenter un intérêt particulier tant dans l'analyse des gènes que dans les utilisations thérapeutiques des oligonucléotides de l'invention.

20

Les oligonucléotides de l'invention sont généralement constitués de bases nucléotidiques naturelles (A, T, G, C, U), mais peuvent aussi comprendre des nucléotides modifiés ou des nucléotides portant des
25 groupements réactifs ou des agents de pontage ou agents intercalant pouvant réagir avec la séquence cible complémentaire à l'oligonucléotide.

Les oligonucléotides de l'invention peuvent être préparés par les méthodes conventionnelles de synthèse
30 chimique ou biologique des oligonucléotides.

L'invention envisage aussi les oligonucléotides couplés à des substances favorisant ou permettant leur pénétration, le ciblage ou l'adressage dans les cellules, il peut s'agit de lipides, de protéines, polypeptides ou
35 peptides ou de toute autre substance naturelle ou

synthétique. En effet, les oligonucléotides de l'invention sont destinés à être internalisés dans les cellules et avantageusement dans certains cas, jusque dans le noyau des cellules, où ils vont interagir avec des molécules d'acide nucléiques portant la séquence cible de l'oligonucléotide. De même, il peut être intéressant de favoriser leur pénétration dans un tissu particulier comme une tumeur, l'os, etc.

Les oligonucléotides de l'invention sont utiles pour réprimer de manière très efficace et très spécifique un gène ou un ensemble de gènes et donc pour le traitement de nombreuses pathologies humaines. Ils constituent aussi un outil de recherche pour l'investigation et la compréhension de la fonction de gènes. L'invention a donc pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant un oligonucléotide ou un ensemble de nucléotides différents et l'utilisation de ces oligonucléotides, seuls ou couplés à des substances de transport, comme médicament.

Les oligonucléotides de l'invention peuvent être mis en œuvre dans des applications ex vivo par exemple lors de greffe. Ainsi, les oligonucléotides peuvent être soit transfectés dans des cellules, notamment tumorales, qui seront ensuite injectées soit injectés dans les tissus par exemple des tumeurs déjà développées, par exemple par voie locale, systémique ou aérosols etc, avec agents de vectorisation éventuellement nécessaires.

Les oligonucléotides seront utilisés à des concentrations suffisantes en fonction de l'application et de la forme d'administration utilisée avec des excipients pharmaceutiques appropriés. Suivant la nature des oligonucléotides (ADN/ARN ou ARN/ARN) des doses différentes pourront être utilisées pour obtenir l'effet biologique recherché.

Les oligonucléotides de l'invention sont également utiles comme outils de diagnostic permettant d'établir in vitro le profil génétique d'un patient à partir d'un échantillon cellulaire de celui-ci. La mise en œuvre des oligonucléotides de l'invention dans un tel procédé d'analyse permet de connaître ou d'anticiper la réponse des cellules cancéreuses de ce patient et d'établir un traitement personnalisé ou encore d'ajuster le traitement d'un patient.

Les oligonucléotides de l'invention présentent plusieurs avantages par rapport aux agents chimiothérapeutiques classiques :

- Les hybrides ARN-ARN sont plus stables que les hybrides ADN-ADN ou ADN-ARN et beaucoup plus stables que les acides nucléiques simples brins utilisés dans des stratégies anti-sens.

- Ils constituent des composés naturels, aucune réaction immunologique ou d'intolérance médicamenteuse n'est a priori à craindre.

- Les expériences de transfections réalisées dans le cadre de l'invention montrent une bien meilleure pénétration des RNAi dans les cellules tumorales que celle obtenue avec des plasmides. Ce point est essentiel dans le cas de cellules tumorales qui sont généralement très difficiles à transfecter.

- Les expériences d'injection systémique de siRNA in vivo montrent une très bonne pénétration de ces molécules dans les tissus.

- Il est aisé de mélanger plusieurs RNAi entre eux afin de prendre pour cibles plusieurs gènes cellulaires en même temps.

Les oligonucléotides de l'invention et les compositions les contenant sont utiles pour le traitement ou la prévention des maladies infectieuses ou virales, en

particulier le SIDA, les maladies infectieuses non conventionnelles, en particulier ESB et Kreutzfeld Jacob. Ils sont tout particulièrement indiqués pour traiter des maladies virales à l'origine de cancers. Le tableau ci-dessous rapporte des exemples de virus impliqués dans des pathologies cancéreuses chez l'homme.

Tableau 1

Virus	Type de cancer humain associé
Virus de l'hépatite B (VHB)	Carcinome du foie
Virus d'Epstein-Barr (EBV)	Lymphome de Burkitt, cancer nasopharyngé, maladie de Hodgkin, lymphomes non hodgkiniens, cancer gastrique, cancer du sein.
Herpèsvirus humain 8 ou HHV-8/KSHV	Sarcome de Kaposi (SK), lymphomes primitif des séreuses (PEL), maladie de Castelman multifocale (MCD)
VPH	Col de l'utérus, tête, cou, peau, nasopharynx
Virus des lymphocytes T (HTLV)	Leucémie de type T
Virus de l'hépatite C (VHC)	Carcinome du foie

Les oligonucléotides de l'invention et les compositions les contenant sont encore utiles pour le traitement ou la prévention des maladies liées à une hypervascularisation comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge, l'angiogénèse tumorale, les rétinopathies diabétiques, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de l'invention ont permis de montrer que ces oligonucléotides sont particulièrement adaptés pour réprimer des gènes nocifs impliqués dans la cancérisation et sont donc tout particulièrement utiles pour le traitement ou la prévention des cancers et plus généralement des maladies oncologiques.

Un traitement anti-cancéreux idéal doit entraîner la mort de la cellule tumorale tout en évitant

les phénomènes de résistance. La mort cellulaire peut être obtenue par :

- Inhibition de la division cellulaire, blocage du cycle cellulaire,

5 - Induction de l'apoptose des cellules tumorales,

- Induction de la sénescence,

- Induction de la nécrose,

- Induction de la différenciation. Dans ce cas,

10 les traitements conduisent la cellule à redevenir normale.

 Ainsi, l'invention s'intéresse tout particulièrement à un oligonucléotide ou un ensemble d'oligonucléotides différents, comportant chacun une séquence oligonucléotidique complémentaire d'une séquence
15 cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN messager d'un gène dont la répression induit l'apoptose, ou la sénescence, ou la nécrose, ou la différenciation des cellules tumorales ou empêche leur division ou plusieurs de ces phénomènes.

20

 L'induction de l'apoptose des cellules tumorales est basée sur le fait que la fonction de nombreux gènes cellulaires (par exemple membres de la famille BCL2, BCL XL) est de protéger les cellules de l'apoptose. La
25 perte d'expression de ces gènes induite par RNAi permet donc le passage en apoptose.

 La mort cellulaire peut également être provoquée par la perte d'adhésion des cellules à la matrice (anoïkis). Cet effet peut être obtenu en perturbant la
30 balance entre protéases et inhibiteurs de protéases dans les tumeurs et leur environnement stromal. Cette perturbation a par ailleurs pour effet de diminuer les capacités des cellules tumorales à envahir les tissus sains et à se métastaser. Les siRNA peuvent donc être utilisés
35 pour empêcher la synthèse de protéines des familles des

métallo protéases matricielles (MMP), des métallo protéases matricielles membranaires, de leurs inhibiteurs (TIMPs), ainsi que celle des activateurs des inhibiteurs des protéases comme par exemple PAI-1 et des protéases elles-mêmes comme par exemple l'urokinase.

L'induction de la sénescence repose sur le fait que les cellules normales ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois. Ce nombre est programmé, environ 50 divisions par exemple pour des fibroblastes embryonnaires, et "mesuré" par la longueur des télomères qui se raccourcit au fur et à mesure des divisions cellulaires. En deçà d'une certaine taille, les télomères ne sont plus fonctionnels et la cellule, incapable de se diviser, entre en sénescence. Dans les cellules germinales cependant, cette longueur est maintenue constante par l'action d'une enzyme, la télomérase. La télomérase est ré-exprimée dans de nombreux cancers, ce qui permet aux cellules tumorales de se multiplier indéfiniment. Un RNAi bloquant l'expression de la télomérase serait sans conséquence sur les cellules somatiques normales et devrait conduire les cellules tumorales vers la sénescence.

Le blocage de la division cellulaire conduit également les cellules à la sénescence. Ce blocage peut être obtenu en inhibant des récepteurs cellulaires essentiels. Ces récepteurs peuvent appartenir suivant la nature de la cellule soit à la classe des récepteurs des facteurs de croissance (EGF, SST2, PDGF, FGF notamment), que ceux-ci soient ou non mutés, soit à celle des récepteurs nucléaires d'hormones (androgènes, œstrogènes, glucocorticoïdes notamment).

Les récepteurs d'hormones sont fréquemment mutés dans les cancers, et l'invention concerne dans ce cas l'utilisation d'oligonucléotides reconnaissant les formes mutées de ces récepteurs et qui n'inhibent pas la synthèse

des formes sauvages. Ceci permet par exemple dans le cas des carcinomes prostatiques devenus résistants par mutation du récepteur des androgènes de traiter par voie systémique les patients avec des siRNA qui bloquent la synthèse du récepteur muté sans induire d'effets de castration liés à l'inhibition des formes sauvage du récepteur dans d'autres organes. Un exemple d'utilisation d'oligonucléotides reconnaissant des formes mutées du récepteur est présenté.

Le cycle cellulaire peut également être arrêté en inhibant la synthèse de protéines indispensables à son déroulement comme par exemple les cyclines, kinases dépendantes des cyclines, enzymes de réplication de l'ADN, facteurs de transcription tels que E2F.

L'induction de la nécrose résulte du besoin des cellules tumorales en oxygène et en nutriments. Initialement une tumeur assure son développement à partir des vaisseaux préexistants de l'hôte. Au-delà de 1 à 2 mm de diamètre, les cellules situées au centre de la tumeur se trouvent en hypoxie. Cette hypoxie, par l'intermédiaire d'une proline hydroxylase, entraîne la stabilisation du facteur de transcription Hif1 α , dont la séquence SEQ ID NO. 59 est donnée en annexe, qui, en se fixant sur des séquences HRE dans les promoteurs de ses gènes cibles, déclenche la réaction hypoxique. Cette réaction conduit à l'activation d'une centaine de gènes permettant d'activer notamment la voie de la glycolyse anaérobie, la réponse au stress et l'angiogénèse. Ce dernier mécanisme active en particulier le gène du VEGF, dont la séquence SEQ ID NO. 60 est donnée en annexe, principal facteur angiogénique tumoral.

Ainsi des oligonucléotides selon l'invention bloquant par exemple l'expression du facteur de transcription Hif1 α ou par exemple celle du VEGF mettent les cellules tumorales dans l'incapacité à monter une

réponse hypoxique ou angiogénique. L'angiogénèse est un mécanisme normalement réprimé chez l'adulte à l'exception du cycle menstruel (utérus oviaires). L'inhibition de ce mécanisme a donc peu de conséquences pour les tissus normaux.

En conséquence, l'invention se rapporte à un oligonucléotide dont l'une desdites séquences oligonucléotidiques est substantiellement complémentaire d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN messenger du gène codant :

- le facteur de transcription Hif1 α ;
- une ou plusieurs des isoformes du VEGF A ou d'un membre de la famille de ce facteur de croissance.

Dans certains cancers, le phénotype tumoral résulte de, ou est maintenu par, l'expression d'une protéine normalement absente des cellules normales. Cette protéine peut résulter de l'expression actuelle ou ancienne d'un génome viral dans la cellule comme celui du virus du papillome, HPV, ou du virus de l'hépatite B. Cette protéine peut également résulter de la mutation (ponctuelle, délétion, insertion) d'un gène cellulaire normal. Dans ce cas, il est fréquent que la protéine mutée ainsi produite possède des propriétés transdominantes négatives par rapport à la protéine normale. La spécificité des siRNA permet d'inhiber la synthèse de la protéine mutante sans bloquer la synthèse des protéines sauvages. Deux exemples concernant des formes mutées de la protéine p53 et du récepteur des androgènes sont rapportés dans la partie expérimentale ci-après.

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de l'invention ont permis de montrer que ces oligonucléotides sont particulièrement adaptés pour réprimer des gènes nocifs impliqués dans la cancérisation et tout particulièrement à ceux conduisant à la formation

de protéine de fusion dans les cellules cancéreuses, comme la protéine de fusion PML-RAR alfa.

En conséquence, l'invention se rapporte tout particulièrement à des oligonucléotides dont la séquence est complémentaire d'une séquence cible appartenant à un gène résultant d'une translocation chromosomique de façon à inhiber les effets de la protéine de fusion exprimée par ce gène. Ainsi, la séquence cible est celle correspondant à la séquence de la jonction de la protéine de fusion.

Le tableau 2 de l'annexe A à la fin de la présente description est une liste non exhaustive des protéines de fusion représentant des cibles thérapeutiques ou diagnostiques pour les oligonucléotides de l'invention.

Le fait de cibler avec un oligonucléotide de l'invention, la jonction entre deux gènes, par exemple les deux gènes *pml* et *rar α* , permet d'aboutir à l'inhibition spécifique de la protéine de fusion sans affecter le rôle biologique des protéines naturelles qui peuvent être codées par le second allèle. Cette forme de mise en œuvre de l'invention englobe donc toutes les protéines de fusion impliquées dans la cancérogénèse, particulièrement les leucémies. Les formes réciproques si elles existent, ainsi que tous les variants des protéines de fusion citées en annexe constituent également des cibles de l'invention.

L'invention concerne donc tout particulièrement, l'utilisation des oligonucléotides comme défini ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies résultant de l'expression d'une protéine de fusion, tout particulièrement dans les cancers.

Les thérapies anti-cancéreuses actuelles prennent pour cible les cellules cancéreuses, par différentes approches, prises isolément ou combinées entre elles (chimiothérapie, chirurgie, radiothérapie, immunothérapie). Les échecs thérapeutiques sont massivement

5 dus soit à des cellules n'ayant pas été atteintes par le
traitement soit, et majoritairement, à des cellules ayant
muté en réponse au traitement. Cette capacité de mutation
est grandement facilitée par l'instabilité génétique des
cellules tumorales. L'inhibition de la vascularisation
10 tumorale, privant les cellules d'oxygène et de nutriments,
a depuis quelques années ouvert de nouvelles perspectives
thérapeutiques en cancérologie. Cette stratégie,
complémentaire des précédentes, prend pour cible la cellule
endothéliale normale de l'hôte, génétiquement stable, et
15 donc théoriquement peu susceptible de muter. De nombreux
essais cliniques visant à inhiber l'angiogénèse tumorale
par différentes approches sont en cours dans le monde.
Cependant, les premiers résultats rapportés semblent assez
décevants.

Les Inventeurs ont démontré que des tumeurs
sont capables de compenser les effets d'inhibiteurs de
l'angiogénèse, en sélectionnant des sous-populations de
cellules sécrétant de fortes concentrations de facteurs pro
20 angiogéniques.

Les tumeurs ne sont pas constituées de cellules
homogènes quant à leur expression génique. Ceci est attesté
par de très nombreuses études dans lesquelles des
immunomarquages ont été réalisés pour une grande variété
25 d'antigènes dans les tumeurs. Macroscopiquement, une tumeur
est fréquemment composée de régions hautement vascularisées
côtoyant des zones de nécrose ou au contraire avasculaires.

Cette hétérogénéité tumorale favorise
l'échappement des tumeurs aux traitements appliqués, quelle
30 qu'en soit la nature. Plus la diversité de l'expression
génique dans une tumeur est grande plus la probabilité
qu'il existe au moins une cellule capable de résister à un
agent anti-tumoral est en effet élevée. Il apparaît dès
lors essentiel d'associer différentes stratégies afin de

réduire tout d'abord l'hétérogénéité tumorale et d'éviter les phénomènes d'échappement.

5 L'invention s'intéresse tout particulièrement à des siRNAs inhibiteurs de l'expression de gènes responsables de l'inactivation de la p53 et à leur utilisation dans le traitement des cancers. La p53 est le produit d'un gène suppresseur de tumeurs ou anti-oncogène, muté dans plus de 50% des tumeurs chez l'homme. La p53 est
10 ainsi considérée comme un « gardien du génome ». Elle est activée dans les cellules en cas de stress génotoxique et participe à divers processus dont l'induction du processus de mort programmée.

Dans 74% des cas de mutation monoallélique,
15 l'inactivation de la p53 est due à une mutation ponctuelle aboutissant à l'expression d'une protéine de taille normale, mais mutée. On considère généralement que la forme mutée forme des hétéromères avec le produit de l'allèle sauvage sur lequel elle agit comme un « transdominant négatif » et bloque son activité. La forme mutante semble
20 également avoir une activité oncogénique en elle-même. Ainsi, des formes mutées de la p53 sont capables d'activer le gène MDR, qui facilite la résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies. De plus, l'expression de mutants de la p53 est associée à une plus forte angiogenèse tumorale, sans doute en raison du fait que les formes
25 mutantes de la p53 ne sont plus capables de stimuler la transcription du gène de la thrombospondine, l'un des plus puissants répresseurs de l'angiogénèse, et activent le VEGF et le bFGF, deux puissants activateurs de l'angiogénèse. De plus, les cellules dans lesquelles une forme mutée de la p53 s'exprime perdent divers niveaux de régulation. En particulier elles ne sont plus capables d'entamer un processus de mort programmée, qui constitue l'un des
30 processus majeurs de protection contre la tumorigénèse. La
35

restauration d'une activité p53 sauvage entraîne, dans des cellules tumorales en culture, la restauration de cette réponse cellulaire. Ainsi, l'inhibition de l'expression des formes mutées de la p53 représente potentiellement un outil puissant en thérapie anti-cancéreuse.

Il n'y a, à l'heure actuelle, aucun moyen efficace de restaurer une activité p53 dans les cellules cancéreuses humaines. En ce qui concerne les cancers dans lesquels les deux allèles sont inactivés, des tentatives de restauration de l'activité p53 par thérapie génique sont envisagées. Ces approches sont compliquées par l'utilisation de vecteurs viraux et se montrent pour le moment peu efficaces.

Par ailleurs, il a été observé spécifiquement dans les cancers cervicaux liés à l'infection par le virus HPV des cellules du col de l'utérus, que la p53 peut-être inactivée par la surexpression d'une protéine virale. En effet, ce virus code pour une protéine, la protéine E6, qui inactive la p53. Dans ce type de cancers, c'est l'inhibition de la protéine E6 qui pourra restaurer une activité p53 sauvage.

L'invention vise à offrir de nouveaux moyens permettant d'activer la p53 en inhibant l'expression de gènes responsables de son inactivation. Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont permis de mettre en évidence qu'il était ainsi possible de réprimer de manière très efficace et très spécifique l'expression d'une forme mutante de la p53.

L'invention concerne des oligonucléotides présentant une séquence complémentaire d'une séquence polynucléotidique spécifique du gène de la p53 mutée. Il s'agit donc d'oligonucléotides dont la séquence porte une mutation par rapport à la séquence de la p53 sauvage. La séquence du gène sauvage de la p53 est indiquée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO.1.

Les différentes mutations pouvant intervenir sur la séquence de la p53 sont indiquées dans le tableau 3 de l'annexe B à la fin de la présente description.

5 Les mutations les plus fréquemment observées dans les pathologies cancéreuses sont reportées dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4

Position	P53 sauvage	SEQ ID No.
R273H	GAGGTGCGTGTTTGTGC	SEQ ID No. 61
R248Q	gcaTgaaccggaggcccaT	SEQ ID No. 62
R248W	gcaTgaaccggaggcccaT	SEQ ID No. 63
R249S	gcaTgaaccggaggcccaT	SEQ ID No. 64
G245S	CTGCATGGGCGGCATGAAC	SEQ ID No. 65
R282W	TGGGAGAGACCGGCGCACA	SEQ ID No. 66
R175H	TGTGAGGCACTGCCCCCAC	SEQ ID No. 67
C242S	TAACAGTTCCTGCATGGGCG	SEQ ID No. 68
Position	P53 mutée	
R273H	GAGGTGCATGTTTGTGC	SEQ ID No. 69
R248Q	gcaTgaacCAgaggcccaT	SEQ ID No. 70
R248W	GCATGAACTGGAGGC CAT	SEQ ID No. 71
R249S	gcaTgaaccggagTcccaT	SEQ ID No. 72
G245S	CTGCATGGGCGGCATGAAC	SEQ ID No. 73
R282W	TGGGAGAGACTGGCGCACA	SEQ ID No. 74
R175H	TGTGAGGCGCTGCCCCCAC	SEQ ID No. 75
C242S	TAACAGTTCCTCCATGGGCG	SEQ ID No. 76

10 Ainsi, des oligonucléotides selon l'invention sont complémentaires d'une séquence cible appartenant au gène de la p53 muté portant l'une au moins des mutations données dans le tableau 3 et tout particulièrement l'une au moins des mutations du tableau 4 ci-dessus.

15 Ces oligonucléotides sont capables de discriminer de manière efficace entre la forme sauvage et la forme mutée de la p53. En effet, la stratégie est de bloquer l'expression de la forme mutée pour réactiver la

forme sauvage et induire dans les cellules un processus de mort programmée pour lequel la forme sauvage est indispensable, et/ou bloquer tout autre processus induit par la forme mutée de la p53. En outre, cette capacité de discrimination des oligonucléotides de l'invention permet de ne toucher que les cellules cancéreuses et d'épargner les cellules normales, qui n'expriment pas cette forme mutée de la p53.

L'invention a donc aussi pour objet le traitement ou la prévention des maladies induites par une inactivation de la protéine p53 et tout particulièrement les cancers résultant de l'expression de la protéine p53 mutée et les cancers résultant de l'expression de gènes inhibiteurs de la p53. L'invention a encore pour objet de prévenir l'apparition de cancers chez les sujets exprimant une forme mutée de la p53, comme dans le cas du syndrome de Li Fraumeni.

La P53 peut être inactivée à travers plusieurs mécanismes distincts. En particulier, dans la majorité des cancers cervicaux, la P53 est inactivée par une protéine codée par le virus du papillome humain, la protéine E6. E6 entraîne l'ubiquitinylation de la P53 ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. Dans ce cas, l'expression de la P53 peut être restaurée par l'inhibition de l'expression de la protéine E6. L'invention concerne également des oligonucléotides présentant une séquence complémentaire d'une séquence polynucléotidique spécifique du gène de la protéine E6 de HPV. La séquence du gène de la protéine E6 de HPV est donnée à la figure 6A ainsi que dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO 2.

Comme indiqué précédemment, une stratégie selon l'invention a pour but de bloquer à l'aide de RNAi l'expression du récepteur des androgènes dans les carcinomes. La séquence du récepteur des androgènes est

donnée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO. 77. Pour traiter les carcinomes avant qu'ils ne soient devenus résistants ou ceux qui le sont devenus par amplification du récepteur sans mutation, des siRNA homologues d'une région pour laquelle aucune mutation n'a été décrite dans les banques de données des mutations du récepteur des androgènes (notés siRNA AR) ont été utilisés. Pour traiter spécifiquement les carcinomes prostatiques devenus androgéno résistants par mutation, un séquençage de l'ARNm codant pour le récepteur sera effectué dans les cellules du patient afin de concevoir une séquence spécifique de la mutation, permettant de traiter le patient sans conséquence pour les cellules normales. Un exemple est présenté par l'utilisation de siRNA reconnaissant spécifiquement la mutation du récepteur des androgènes présente dans la lignée cellulaire LNCaP (siRNA LNCaP).

En conséquence, l'invention se rapporte à des oligonucléotides substantiellement complémentaires d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN messenger codant le récepteur aux androgènes muté ou non muté. Il s'agit par exemple du récepteur aux androgènes portant l'une au moins des mutations données dans le tableau 5 de l'annexe C. Ces oligonucléotides de l'invention spécifiques du récepteur aux androgènes sont utiles pour traiter ou prévenir les maladies androgéno-dépendantes, comme par exemple le cancer de la prostate.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant :

- Exemple 1 : Inhibition de la protéine PML-RAR α associée à la leucémie aiguë promyélocytaire (APL).
- Exemple 2 : Inhibition de l'angiogénèse tumorale induite par le VEGF.

- Exemple 3 : Inhibition de la réponse hypoxique induite par HIF1 α .

- Exemple 4 : Inhibition des formes sauvages ou mutantes des récepteurs des androgènes dans les cellules de

- Exemple 5 : Inhibition des formes sauvages ou mutantes de la protéine p53.

- Exemple 6 : Inhibition de la protéine virale E6.

- Exemple 7 : Utilisation des hybrides ADN/ARN pour inhiber l'expression de différentes protéines.

- Exemple 8 : Administration *in vivo* de siRNA par différentes voies.

Il est fait référence dans les exemples aux figures dans lesquelles :

- La figure 1A est une représentation schématique des protéines RAR α , PML et de la protéine de fusion associée, PML-RAR α . La figure 1B représente les résultats de transfections avec un siRNA dirigé contre PML-RAR α .

- La figure 2 concerne l'inhibition de l'expression du VEGF par des siRNA dirigés contre cette protéine et les conséquences de cette inhibition. La figure 2A représente l'immunodétection du VEGF dans des cellules cJ4 ou LNCaP transfectées par le siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre le VEGF. La figure 2B représente la quantification par ELISA du VEGF dans le milieu conditionné des cellules cJ4 transfectées par le siRNA contrôle ou le siRNA VEGF en fonction du temps après la transfection. La figure 2C représente la courbe de croissance chez des souris nudes de tumeurs provenant de l'injection sous cutanée de 10^6 cellules cJ4 non transfectées, transfectées par le siRNA contrôle ou le siRNA VEGF. La figure 2D représente l'aspect des tumeurs au jour 7 après injection des cellules. La figure 2E représente l'immunodétection du

VEGF dans des tumeurs provenant de l'injection de cellules cj4 transfectées avec le siRNA contrôle ou le siRNA VEGF après 12 jours de développement in vivo.

- La figure 3 concerne l'effet de l'inhibition par un siRNA spécifique de l'expression d'un facteur de transcription, HIF1alpha, sur la réponse transcriptionnelle à l'hypoxie. La figure représente la mesure de l'activité d'un reporter VEGF luciférase en réponse à l'hypoxie dans des cellules cJ4 non transfectées, transfectées par le siRNA contrôle ou par le siRNA dirigé contre HIF1alpha.

- La figure 4 concerne l'inhibition par des siRNA spécifiques de l'expression du récepteur des androgènes dans des cellules et les conséquences fonctionnelles de ces inhibitions. La figure 4A représente la détection par immunoblot de l'expression du récepteur des androgènes 48h après transfection des cellules LNCaP par un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre le récepteur des androgènes (AR). La figure 4B représente la mesure de l'activité d'un reporter 4xARE luciférase au R1881 dans divers clones de la lignée LNCaP non transfectée, ou transfectée par le siRNA contrôle ou le siRNA AR. La figure 4C représente la comparaison de la réponse au R1881 de cellules LNCaP non transfectées (100%), et des cellules LNCaP transfectées par un siRNA contrôle, un siRNA dirigé contre le récepteur des androgènes (AR) ou un siRNA reconnaissant spécifiquement une mutation ponctuelle présente dans le récepteur des androgènes de la lignée LNCaP. La figure 4D représente la croissance chez des souris nudes de tumeurs résultant de l'injection sous cutanée de cellules LNCaP transfectées par un siRNA contrôle ou par un siRNA dirigé contre le récepteur des androgènes. La figure 4E représente la croissance de tumeurs LNCaP chez des souris ayant reçu au 40e jour après implantation des cellules une injection intraveineuse dans la veine de la queue de 2µg de siRNA dirigés contre le VEGF

ou de siRNA contrôle. La figure 4F représente la croissance de tumeurs LNCaP chez des souris ayant reçu au 34e et au 40e jour après implantation des cellules tumorales une injection intrapéritonéale de 2µg de siRNA dirigé contre le récepteur des androgènes ou de siRNA contrôle.

- La figure 5 concerne l'inhibition de l'expression de formes sauvages ou mutantes de la p53 par des siRNA et des conséquences fonctionnelles de ces inhibitions. La figure 5A représente la séquence de protéine p53 humaine. La figure 5B représente l'inhibition spécifique et dépendante de la dose par des siRNA de l'expression de formes sauvages ou mutantes de la p53 transfectées dans des cellules ne l'exprimant pas initialement. La figure 5C représente l'inhibition spécifique par des siRNA de l'expression simultanée ou non de formes sauvages ou mutantes de la p53 transfectées dans des cellules ne l'exprimant pas initialement. La figure 5D représente l'inhibition de l'expression de la p53 endogène sauvage ou d'une forme mutante transfectée de p53 par des siRNA. La figure 5E représente l'effet de l'inhibition de la p53 par des siRNA sur la résistance à un stress génotoxique. Les figures 5 F, G, H et I montrent l'inhibition de l'expression d'une forme mutante de la p53 dans les cellules d'un patient atteint du syndrome de Li Fraumeni sur le niveau de l'ARNm (5G), et l'expression de la protéine par immunoblot (GF) ou en immunofluorescence indirecte (5H) et les conséquences sur la résistance de ces cellules à un stress génotoxique. La figure 5J montre l'inhibition par les siRNA spécifiques de la transcription dépendante de la p53 dans des cellules exprimant par transfection des formes sauvages ou mutantes de la p53. La figure 5K montre l'inhibition de l'expression d'un des gènes cibles de la p53, la p21, protéine inhibitrice de la prolifération cellulaire, par la coexpression de formes mutantes de la p53 et la restauration de cette expression

par traitement des cellules avec un siRNA inhibant la synthèse de la forme mutante de la p53.

- La figure 6 concerne l'inhibition de l'expression de la protéine E6 du virus du papillome humain HPV par des siRNA spécifiques et les conséquences de cette inhibition. La figure 6 A représente la séquence de la protéine HPV. La figure 6B représente l'effet de l'inhibition par des siRNA spécifiques de l'expression de la protéine E6 de HPV dans des cellules qui expriment ce virus, sur l'expression de la p53 et de la p21. Les figures 6C et 6D représentent l'effet de l'inhibition de l'expression de la protéine E6 de HPV sur le cycle cellulaire.

- La figure 7 concerne l'utilisation de siRNA hybrides, comportant des bases ADN et des bases ARN. Les figures 7A et 7B représentent l'effet de siRNA hybrides ADN/ARN sur l'expression de la GFP exprimée par transfection dans des cellules. La figure 7C compare l'effet de siRNA ARN/ARN, ADN/ARN ou ARN/ADN à dose constante sur l'inhibition de la transcription induite par le récepteur des androgènes. Les figures 7D et 7E représentent les effets d'une substitution de bases ARN par des bases ADN dans la séquence de siRNA inhibant la synthèse de la p53.

- La figure 8 concerne l'inhibition de la luciférase dans des tumeurs exprimant cette enzyme par injection de siRNA par voie sous cutanée, ou intra-tumorale ou intra-péritonéale ou intra-veineuse

EXEMPLE 1 : INHIBITION DE LA PROTEINE PML-RAR α ASSOCIEE A LA LEUCEMIE AIGUË PROMYELOCYTAIRE (APL).

I - Introduction.

La leucémie aiguë promyélocytaire (APL) est due à la translocation t(15 ;17) sur le chromosome 15. Chez les patients atteints, le récepteur de l'acide rétinoïque RAR α

(RAR α) est fusionné à la protéine PML (*promyelocytic leukemia protein*) générant ainsi la protéine de fusion PML-RAR α . Jusqu'à ce jour, cinq protéines de fusion mettant en jeu le RAR α ont été identifiées. Tous ces types de leucémies impliquent le récepteur RAR α et sont cliniquement similaires, ce qui suggère que la rupture de la voie de transduction de l'acide rétinoïque est cruciale dans la pathogenèse des leucémies APL.

La protéine de fusion PML-RAR α a gardé les domaines de liaison à l'ADN et à l'acide rétinoïque du RAR α . Il a été montré que la protéine de fusion PML-RAR α réprime l'expression des gènes cibles de l'acide rétinoïque et provoque ainsi le blocage de la différenciation des cellules promyélocytaires. Seule l'administration de doses pharmacologiques d'acide rétinoïque permet la levée de la répression transcriptionnelle exercée par PML-RAR α et la reprise de la différenciation cellulaire. En outre, la portion protéique PML de la protéine de fusion pourrait également intervenir dans le mécanisme du blocage de la voie de transduction par l'acide rétinoïque. Dans la mesure où PML fonctionne comme un inhibiteur de croissance et un agent apoptotique et qu'elle est nécessaire pour l'expression de certains gènes induit par l'acide rétinoïque, l'effet dominant négatif de PML-RAR α sur PML pourrait permettre aux cellules d'acquérir une capacité de croissance, une résistance à l'apoptose et un arrêt de la différenciation.

Des études de biologie cellulaire sur PML ont montré que cette protéine possède une localisation particulière dans le noyau, dans des structures particulières appelées corps nucléaires. Il semble que le rôle de ces structures soit en relation directe avec le rôle antioncogène de PML. Dans les cellules malignes APL, la protéine PML-RAR α provoque, par hétérodimérisation avec PML, la délocalisation de PML des corps nucléaires vers des

structures microponctuées pouvant correspondre à des sites d'ancrage de PML-RAR α sur la chromatine. Cette délocalisation pourrait bloquer la fonction pro-apoptotique de PML et son rôle dans la différenciation myéloïde. Plusieurs équipes ont montré que le traitement combiné à l'acide rétinoïque et à l'AS₂O₃ sur des lignées cellulaires qui expriment la protéine de fusion PML-RAR α permet la dégradation des protéines de fusion en même temps qu'une relocalisation de PML sur les corps nucléaires. Cette réorganisation des corps nucléaires restaure les fonctions de PML et contribue à la reprise de la différenciation.

Finalement, la protéine chimère PML-RAR α aurait donc un double effet dominant négatif, sur RAR α et sur PML, en permettant à la fois aux cellules d'échapper à l'apoptose et de bloquer la différenciation des promyélocytes ainsi transformés.

Plus de 98% des patients atteints par la leucémie APL présentent la translocation t(15 ;17)(q22 ;q21) qui conduit à la formation de gènes fusionnés PML-RAR α et RAR α -PML. Il existe deux sous-types de protéines de fusion PML-RAR α , les fusions S (short) et L (Long). La forme longue de la protéine de fusion PML-RAR α correspondant à une protéine de 955 acides aminés représente la forme majoritairement exprimée et a donc été prise comme modèle dans cette étude (Annexes A, B et C). Cette protéine comporte les acides aminés 1 à 552 de la protéine PML fusionnés avec les acides aminés 59 à 462 du récepteur α de l'acide rétinoïque (RAR α).

II - Préparation et administration des oligonucléotides.

Des oligonucléotides RNA complémentaires correspondant à la séquence de la jonction du gène de la protéine de fusion, soit 10 nucléotides du gène PML et 10 nucléotides du gène RAR α ont été synthétisés avec adjonction de deux déoxythymidines en 3' (Figure 1). Ces

oligonucléotides ont été hybridés et l'obtention de l'oligonucléotide double-brin a été vérifiée sur gel d'acrylamide.

Les séquences des siRNA PML-RAR et contrôle utilisés (5'-3') sont données ci-dessous.

Contrôle :

FW :

[CAUGUCAUGUGUCACAUCUC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.3)

REV :

[GAGAUGUGACACAUGACAUG]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.4)

PR :

Sens :

[GGGGAGGCAGCCAUUGAGAC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.5)

Antisens :

[GUCUCA AUGGCUGCCUCCCC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.6)

III - Résultats.

Des fibroblastes NIH3T3 ont été cotransfectés avec de la lipofectamine par un vecteur d'expression de la protéine PML-RAR α (100ng) et par 500ng de siRNA contrôle (C) ou dirigés contre PML-RAR α (PR). 48 h après transfection, un western blot (Figure 1B) a été réalisé sur des extraits cellulaires totaux en utilisant un anticorps qui reconnaît la protéine RAR α , entière ou sous forme de protéine de fusion.

La figure 1B montre que la transfection du siRNA PR inhibe très fortement l'expression de la protéine de fusion PML-RAR α par rapport aux cellules transfectées avec le siRNA contrôle (C), sans modifier l'expression de la protéine RAR α .

EXEMPLE 2 : INHIBITION DE L'ANGIOGENESE TUMORALE PAR LE VEGF.

I - Introduction.

Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est l'un des plus puissants facteurs angiogéniques

identifiés. Ces facteurs sont surexprimés dans de nombreuses situations d'hypervascularisation pathologiques et notamment dans le développement tumoral. L'inhibition de cette angiogénèse permet de bloquer la croissance tumorale. Notre procédé a pour but d'inhiber l'angiogénèse tumorale en bloquant l'expression de l'un de ces facteurs angiogéniques et dans cet exemple celui du VEGF par les cellules tumorales.

II - Préparation et administration des oligonucléotides.

Deux oligonucléotides RNA, complémentaires d'une région de la séquence codante du VEGF humain, conservée chez le rat et la souris ont été synthétisés. Deux déoxynucléotides (TT) ont été ajoutés en 3'

- Séquence des RNAi VEGF :

5' [AUGUGAAUGCAGACCAAAGAA]RNA-TT[DNA] (SEQ ID NO. 7)

5' [UUCUUUGGUCUGCAUUCACAU]RNA-TT[DNA] (SEQ ID NO. 8)

- Séquence des RNAi contrôle :

5' [CAUGUCAUGUGUCACAUCUC]RNA-TT[DNA] (SEQ ID NO. 9)

5' [GAGAUGUGACACAUGACAUG]RNA-TT[DNA] (SEQ ID NO. 10)

Ces oligonucléotides ou des oligonucléotides contrôle, dont la séquence ne présente aucune homologie avec les séquences répertoriées dans les bases de données, ont été hybridés et transfectés en utilisant le kit polyfect (Qiagen) dans des cellules d'un fibrosarcome de rat (cJ4) ou dans les cellules humaines du carcinome prostatique LNCaP.

III - Résultats.

48h après transfection, une immunofluorescence indirecte a été réalisée pour détecter l'expression de la protéine dans les cellules. La figure 2A montre une inhibition massive de l'expression du VEGF.

Pour quantifier cet effet, un dosage du VEGF dans des cellules cJ4 transfectées en parallèle avec le RNAi contrôle ou avec le RNAi VEGF a été effectué par ELISA

(quantikine, R&D). Les cellules ont été incubées 48h avant le dosage dans un milieu contenant 1% de sérum. Le dosage a été réalisé 4 jours et 6 jours après la transfection. Dans ces conditions, la figure 2B montre une inhibition de la sécrétion de VEGF de 85% à 4 jours et de 75% à 6 jours et de 60% à 13 jours dans les cellules transfectées avec le RNAi VEGF comparé à celles transfectées avec le RNAi contrôle (figure 2B).

L'effet de l'inhibition de l'expression de VEGF par les cellules tumorales a été testé *in vivo* : 3 jours après transfection, trois groupes de 4 souris nudes femelles de 4 semaines ont été injectés en sous cutané à raison de un million de cellules par souris : Le premier groupe a été injecté avec des cellules non transfectées, le second avec des cellules transfectées par le RNAi contrôle, le troisième par des cellules transfectées avec le RNAi VEGF. Aucune sélection des cellules transfectées n'a été effectuée avant l'injection.

La croissance tumorale a été suivie en mesurant le volume des tumeurs à intervalles réguliers (figure 2C).

Les figures 2C et 2D ne montrent aucune différence significative entre les tailles des tumeurs des groupes A et B. Une très forte réduction du volume tumoral est observée dans le groupe C. L'aspect des tumeurs, beaucoup plus blanches dans le groupe C (Fig 2D) traduit une diminution marquée de la vascularisation tumorale. Après sacrifice des animaux, au jour 12 après l'injection, les tumeurs ont été disséquées, fixées et une immunodétection du VEGF réalisée sur des coupes de ces tumeurs. On observe une très forte réduction de l'expression du VEGF dans les tumeurs du groupe C en comparaison avec celles du groupe B (Figure 2E).

Dans une autre expérience, des tumeurs ont été induites chez des souris nudes males par injection de cellules du carcinome prostatique LNCaP. 40 jours après

injection, le volume des tumeurs ayant atteint 1 à 1,5cm³, les souris ont été divisées en deux groupes. Le premier groupe (4 souris) a reçu une injection intraveineuse dans la veine de la queue de 2 microgrammes de siRNA contrôle dans 100µl de PBS. Le second groupe a reçu une dose équivalente de siRNA VEGF dans les mêmes conditions. On observe que le siRNA VEGF, mais pas le siRNA contrôle, induit un arrêt transitoire de la croissance tumorale. (figure 4D).

EXEMPLE 3: INHIBITION DE LA REPONSE HYPOXIQUE.

I - Introduction.

Certaines tumeurs sont capables de se développer dans des conditions de forte anoxie. On observe très fréquemment dans les tumeurs des régions très peu vascularisées. Cette faible sensibilité à l'hypoxie a deux conséquences : d'une part un traitement anti-angiogénique a peu de chances d'être efficace sur ces tumeurs ou ces sous populations tumorales. D'autre part, cette faible vascularisation rend difficile la délivrance de molécules thérapeutiques. Le facteur de transcription Hif1α régule l'activité de plus de 100 gènes permettant la réponse hypoxique. L'inhibition de ce facteur de transcription dans les tumeurs hypoxiques a pour but de bloquer leur croissance.

II - Préparation des oligonucléotides.

- RNAi Hif1α

5' [CAUGUGACCAUGAGGAAAUGA] RNA-TT [DNA] (SEQ ID NO. 11)

5' [UCAUUUCCUCAUGGUCACAUG] RNA-TT [DNA] (SEQ ID NO. 12)

- RNAi contrôle

5' [GAUAGCAAUGACGAAUGCGUA] RNA-TT [DNA] (SEQ ID NO. 13)

5' [UACGCAUUCGUCAUUGCUAUC] RNA-TT [DNA] (SEQ ID NO. 14)

III - Résultats.

Le promoteur du VEGF contient un élément de réponse au facteur de transcription Hif1α. Pour tester in

vitro l'effet d'un RNAi dirigé contre Hif1 α , nous avons transfecté des cellules cJ4 avec un vecteur reporter VEGF-luciférase, seul ou en association avec un RNAi Hif1 α ou contrôle.

5 24h après transfection, les cellules ont été incubées pendant 18h en milieu sans sérum, additionné ou non de chlorure de Cobalt 100 μ M afin de produire des conditions hypoxiques puis l'activité luciférase a été mesurée.

10 La figure 3 montre une inhibition complète de l'induction de la réponse du promoteur VEGF à l'hypoxie a été observée lorsque les cellules sont transfectées avec le RNAi Hif1 α mais pas avec le RNAi contrôle.

15 EXEMPLE 4 : inhibition des formes sauvages ou
mutantes des récepteurs des androgènes dans les carcinomes
prostatiques.

I - Introduction.

20 Les carcinomes prostatiques sont la deuxième cause de mortalité par cancer pour les hommes dans les pays industrialisés. En France, ils sont la cause de plus de 9500 morts par an. Les cellules épithéliales prostatiques sont dépendantes des androgènes pour leur croissance. Les carcinomes prostatiques sont initialement androgéno-dépendants. Une castration chimique permet dans un premier temps de bloquer la croissance du carcinome. Cependant dans tous les cas, ces carcinomes deviennent androgéno-indépendants et leur pronostic est alors très pessimiste. Cette androgéno-indépendance est due suivant les individus
25 le plus souvent à une mutation du récepteur (lui conférant par exemple une réponse aux oestrogènes ou aux glucocorticoïdes) ou à une amplification du récepteur.
30

II - Préparation des oligonucléotides.

35 Deux oligonucléotides ARN, complémentaires d'une région de la séquence codante du récepteur androgène

(AR) non muté humain, ont été synthétisés. Deux déoxynucléotides (TT) ont été ajoutés en 3'. Dans d'autres expériences, des siRNA, dénommés LNCaP, reconnaissant spécifiquement la mutation du récepteur des androgènes (T877A) dans les cellules de carcinome prostatique humain LNCaP ont été utilisés.

- AR :

5' [GACUCAGCUGCCCCAUCCACG]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.15)

5' [CGUGGAUGGGGCAGCUGAGUC]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.16)

- Contrôle :

5' [GAUAGCAAUGACGAAUGCGUA]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.17)

5' [UACGCAUUCGUCAUUGCUAUC]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.18)

- LNCap :

5' [GCAUCAGUUCGCUUUUGAC]ARN -TT[ADN] (SEQ ID NO.19)

5' [GUCAAAAGCGAACUGAUGC]ARN -TT[ADN] (SEQ ID NO.20)

Plusieurs sous-clones de la lignée de carcinome prostatique humaine LNCaP ont été utilisés dans cette étude. La lignée originale, LNCaP, est androgéno-dépendante. Les cellules LN70, obtenues par passages répétés de la lignée LNCaP in vitro, ont une diminution de leur réponse aux androgènes. Le clone LNS5, obtenu après passage des cellules chez l'animal, est androgéno-résistant.

III - Résultats.

Des cellules LNCaP ont été transfectées in vitro avec des siRNA AR ou des siRNA contrôle en utilisant l'agent de transfection polyfect (qiagen). 48h après transfection, les cellules ont été détachées de leur support. La moitié des cellules a été utilisée pour réaliser une détection par western blot du récepteur des androgènes, l'autre moitié a été remise en culture. Le récepteur des androgènes (bande à 110 kDa) n'est plus détectable par western dans les cellules transfectées par le siRNA AR (Figure 4A). Les cellules transfectées par le

siRNA remises en culture se sont avérées incapables de poursuivre leur croissance, contrairement aux cellules transfectées par le siRNA contrôle.

Le niveau de réponse aux androgènes a été mesuré en transfectant différents clones cellulaires de la lignée LNCaP avec un vecteur rapporteur plaçant la séquence codante de la luciférase en aval d'un promoteur minimal flanqué de 4 répétitions de l'élément de réponse aux androgènes (4xARE). Après transfection, les cellules ont été incubées pendant 18h en absence de sérum et en présence ou en absence d'un analogue métaboliquement stable de la dihydro testostérone, le R1881 (NEN). Le rapport des activités luciférases dans ces deux conditions permet de mesurer le niveau de réponse aux androgènes du vecteur reporter.

Nous avons mesuré l'effet de la cotransfection dans ces cellules du RNAi contrôle ou du RNAi AR sur la réponse aux androgènes des différents clones de la lignée LNCaP.

La figure 4B montre une inhibition complète de la réponse aux androgènes dans les deux clones sensibles aux androgènes : LNCaP et LNCaP p70. Cette méthode ne permet pas de mesurer la réponse du clone LNS5, androgéno-résistant, au traitement par le RNAi AR.

Le récepteur des androgènes présent dans la lignée LNCaP est porteur d'une mutation. Nous avons utilisé deux siRNA différents pour inhiber sa synthèse, le siRNA AR précédemment utilisé et le siRNA LNCaP reconnaissant spécifiquement la mutation LNCaP. La réponse aux androgènes a été mesurée comme dans l'expérience 4B (Figure 4C).

Pour étudier l'effet de l'inhibition de l'expression du récepteur des androgènes sur la croissance tumorale in vivo des cellules de carcinome prostatique, des cellules du carcinome LNCaP, transfectées par un siRNA contrôle (groupe A) ou AR (groupe B) ont été injectées en

sous cutané à des souris nudes males. La croissance tumorale a été suivie à intervalles réguliers. On observe que les tumeurs des animaux du groupe B ont démarré plus tardivement que celles du groupe A et que le volume des tumeurs du groupe B au 48e jour est nettement plus petit que celui des tumeurs du groupe A (Figure 4D).

Dans une autre expérience, des cellules LNCaP ont été injectées chez des souris nudes males. Lorsque, au 34e jour, les tumeurs ont atteint un volume compris entre 1,2 et 1,5 cm³, les souris ont reçu par voie intrapéritonéale une injection de 2µg de siRNA contrôle ou AR dans 100µl de PBS. Cette injection a été répétée au 40e jour. On observe que l'administration de siRNA AR entraîne un ralentissement de la croissance tumorale (Figure 4E).

EXEMPLE 5 : Inhibition des formes sauvages ou mutantes de la protéine p53.

I - Préparation des oligonucléotides.

Les trois siRNAs dont la séquence est indiquée ci-dessous ont été préparés, l'un dirigé contre la forme sauvage de la p53, et l'autre dirigé contre la forme mutée exprimée chez un patient et ayant donné lieu à l'établissement d'une lignée.

Cette mutation correspond à l'une des trois observées le plus fréquemment dans les tumeurs humaines.

- p53 sauvage :

Sense: [GCAUGAACCGGAGGCCCAU] ARN [TT] ADN (SEQ ID NO.21)

Anti: [AUGGGCCUCCGGUUCAUGC] ARN [TT] ADN (SEQ ID NO.22)

- p53 MT1 (r248w) :

Sense: [GCAUGAACUGGAGGCCCAU] ARN [TT] ADN (SEQ ID NO.23)

Anti: [AUGGGCCUCCAGUUCAUGC] ARN [TT] ADN (SEQ ID NO.24)

- p53 MT2 (r248w) :

Sense: [UCAUGAACUGGAGGCCCAU] ARN [TT] ADN (SEQ ID NO.25)

Anti: [AUGGGCCUCCAGUUCAUGA] ARN [TT] ADN (SEQ ID NO.26)

Les nucléotides soulignés dans la p53 sauvage sont ceux qui sont mutés dans la forme mutante et qui sont en italique dans les séquences des formes mutées de la p53 mutée (p53 MT1 et MT2). Les bases en gras ci-dessus sont des mutations qui ont été introduites pour augmenter la spécificité.

II - Résultats.

Comme montré sur la figure 5B, les cellules H1299-NCI, qui n'expriment pas la p53, ont été transfectées (en utilisant la lipofectamine) par des vecteurs d'expression (400 ng) de la p53 sauvage (WT) ou mutée (mt). Les siRNAs (en dose croissante : 0, 125 ng, 250 ng, 500 ng et 1000 ng) dirigés contre la forme sauvage (WT), la forme mutée (MT1 et MT2), ou un siRNA irrelevante (C) ont été transfectés en même temps. Les cellules ont été collectées 24 heures après, et analysées par Western blot avec un anticorps dirigé contre la p53.

Comme montré sur la figure 5C, les cellules H1299-NCI, qui n'expriment pas la p53, ont été transfectées (en utilisant la lipofectamine) par des vecteurs d'expression (400 ng) de la p53 sauvage (WT), mutée (mt) ou un mélange des deux (WT+MT), comme indiqué. Les siRNAs (400 ng) dirigés contre la forme sauvage (WT), la forme mutée (MT1), ou un siRNA irrelevante (C) ont été transfectés en même temps. Les cellules ont été collectées 24 heures après, et analysées par Western blot (ib : immunoblot) avec un anticorps dirigé contre la p53 (DO1, Santa Cruz), ou l'actine cellulaire (Sigma) pour contrôler la quantité de protéines utilisée dans le test.

Comme montré sur la figure 5D, des cellules U2OS (ostéosarcome humain exprimant une forme sauvage de la p53) ont été transfectées de façon stable soit par un vecteur exprimant une forme mutante de la P53 (R248W) soit par le vecteur vide correspondant (pCDNA3). Ces lignées ont

été transfectées par les siRNA indiqués et l'expression des protéines indiquées a été détectée par western blot.

Dans tous les cas, le siRNA dirigé contre la forme mutée de la protéine inhibe la forme mutée et le siRNA dirigé contre la forme sauvage inhibe la forme sauvage. De plus, il n'y a pas de « réaction croisée », puisque le siRNA dirigé contre la forme sauvage n'a pas d'effet sur la forme mutée et réciproquement. Il faut noter que l'expression du mutant stabilise la protéine sauvage lorsqu'elle est co-exprimée. En conséquence, l'inhibition du mutant ramène, par cet effet indirect, la forme sauvage à son niveau de base, sans qu'il n'y ait inhibition de l'expression de la protéine.

Comme montré sur la figure 5E, les cellules utilisées dans la figure 5D ont été transfectées par les siRNA indiqués. Les cellules ont ensuite été soumises à un stress génotoxique par traitement à la doxorubicine (200 ng/ml) pendant 24h. La Figure 5E montre l'analyse du cycle cellulaire de ces cellules par incorporation de Iodure de propidium et analyse au FACS. Les cellules non transfectées avec la forme mutante, et donc n'exprimant que la forme sauvage (cellules PCDNA) montrent un fort pourcentage d'arrêt en G1 en présence de doxorubicine. Le traitement de ces cellules par le siRNA sauvage, en diminuant la p53 sauvage, réduit cet arrêt en G1. Les cellules qui expriment la forme mutée et sauvage (R248W) s'arrêtent peu en G1 en présence de doxorubicine, montrant que la forme mutée inhibe l'activité de la forme sauvage. Quand ces cellules sont traitées avec le siRNA mt1, elles récupèrent une capacité normale (à comparer avec les contrôles PCDNA non traitées) de s'arrêter en G1, montrant la restauration de l'activité p53 sauvage dans ces cellules.

Comme montré sur les figures 5 F, G, H, les cellules MDA 087 (provenant d'un patient atteint d'un syndrome de Li Fraumeni et exprimant le mutant R248W) ont

été transfectées avec un siRNA dirigé contre la forme mutante (MT1) de la p53, ou encore avec un siRNA irrelevant (C) (1,6 µg). L'expression de la P53 a été détectée dans ces cellules par western blot (Figure 5F), les ARN messagers ont été mesurés par PCR quantitative (Light cyclers, Roche) (Figure 5G) ou immunofluorescence (Figure 5H).

Les cellules MDA 087 ont été transfectées avec un siRNA reconnaissant la forme sauvage (WT) ou la forme mutée de la p53 (mt1) ou encore par un siRNA contrôle puis soumises à un stress génotoxique par traitement à la doxorubicine (200 ng/ml) pendant 24h. L'expression de la forme mutante de la p53 a été détectée par western blot dans les cellules. On observe que les cellules ayant reçu le siRNA mt1 ne sont pas capables de stabiliser la p53 en réponse à la doxorubicine (Figure 5I).

La figure 5J montre l'effet des siRNA mt1 et mt2 dans des cellules qui expriment les formes sauvages et mutées de la p53. Les cellules H1299-NCI, qui n'expriment pas la p53, ont été transfectées (en utilisant la lipofectamine) par un vecteur reporter comportant le gène de la luciférase sous contrôle d'un élément de réponse à la p53 et des vecteurs d'expression (400 ng) de la p53 sauvage (WT), mutée (MT) ou un mélange des deux (WT+MT), comme indiqué. Les siRNAs (400 ng) dirigés contre la forme sauvage (WT), la forme mutée (mt1, mt2), ou un siRNA irrelevant (C) ont été transfectés en même temps. Les cellules ont été collectées 24 heures après et analysées pour l'expression de la luciférase. La p53 sauvage seule active le vecteur reporter, et la co-expression de la forme mutante inhibe cette activité. La co-transfection du siRNA sauvage inhibe l'expression de la protéine sauvage et donc l'activation résiduelle du gène reporter. La co-transfection des siRNAs mt1 ou mt2, au contraire, restaure cette activation en bloquant sélectivement l'expression de

la forme mutée et en empêchant l'effet de transdominant négatif qu'elle exerce sur la forme p53 sauvage.

La figure 5K montre un résultat similaire sur l'expression d'une des cibles de la p53, la protéine inhibitrice de la prolifération cellulaire p21, dans des cellules traitées comme dans la figure 5F. L'expression de la p21, détectée par western blot est activée par la p53 sauvage et inhibée lorsque le mutant est co-exprimé. Cette inhibition est levée en présence du siRNA mt1.

EXEMPLE 6 : Inhibition de la protéine virale E6.

I - Préparation des oligonucléotides.

Un siRNA dirigé contre la protéine E6 de HPV a également été préparé. Il répond à la séquence suivante :

- HPV-16-S2

Sens: 5' [CCACAGUUAUGCACAGAGC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.27)

Anti: 5' [GCUCUGUGCAUAACUUGG]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.28)

II - Résultats.

Comme montré sur la figure 6B, des cellules CasKi et SiHA, exprimant toutes deux la protéine E6 de HPV ont été transfectées avec les siRNA indiqués, traitées ou non comme indiqué par la doxorubicine et analysées par western blot en utilisant les anticorps indiqués. Le traitement des cellules par le siRNA E6 induit une augmentation de l'expression de P53. Cette expression de p53 se traduit par une augmentation de l'expression de la protéine p21.

Comme montré sur la figure 6C, le cycle cellulaire de cellules SiHA traitées comme dans la figure 6B a été analysé par FACS. La figure représente une expérience caractéristique. On observe une augmentation de cellules en phase G1 (Figure 6D) dans les cellules traitées par le siRNA E6, augmentation qui est également observée dans ces cellules lorsqu'elles sont traitées par la doxorubicine.

EXEMPLE 7 : Effet des oligonucléotides ARN/ARN
et des hybrides ADN/ARN.

I - Introduction.

5 L'invention envisage l'utilisation
d'oligonucléotides hybrides ADN/ARN comme alternative aux
oligonucléotides ARN/ARN pour inhiber spécifiquement
l'expression d'un gène. Dans le cas des hybrides ADN/ARN,
le brin sens est préférentiellement de nature ADN et le
10 brin anti-sens de nature ARN. Les autres aspects ayant
trait notamment à la taille des oligonucléotides, à la
nature des extrémités 3' et au mode de synthèse sont les
mêmes que pour les oligonucléotides ARN/ARN. Les
applications de ces hybrides ADN/ARN sont identiques à
15 celles précédemment décrites pour les siRNA ARN/ARN,
notamment en ce qui concerne les applications
thérapeutiques, à visées diagnostic ou de validation de
gènes. Les doses d'oligonucléotides employées pour obtenir
les mêmes effets avec les hybrides ADN/ARN et les ARN/ARN
20 peuvent cependant être différentes

II - Préparation des oligonucléotides.

Le brin sens est celui dont la séquence est
identique à celle de l'ARN messager. Le brin antisens est
le brin complémentaire du brin sens. Par convention, dans
25 un duplexe, la nature des brins est indiquée dans l'ordre
sens/antisens. Ainsi par exemple, un hybride ADN/ARN, noté
D/R est un oligonucléotide dont le brin sens est de nature
ADN et le brin antisens, est de nature ARN et de séquence
complémentaire de l'ARN messager.

30 Dans les expériences décrites, les
oligonucléotides dont la séquence est indiquée ci-dessous
ont été utilisés.

- Pour la GFP :

GFP :

35 Sens : [GCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT]ADN (SEQ ID NO.29)

Antisens : [GAACUUCAGGGUCAGCUUGCCG]ARN (SEQ ID NO.30)

Contrôle GFP :

Sens : [CAUGUCAUGUGUCACAUCUC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.31)

Antisens : [GAGAUGUGACACAUGACAUG]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.32)

5 - Pour le LNCaP : Les bases soulignées ci-dessous correspondant à la mutation du récepteur des androgènes exprimée dans les cellules du carcinome prostatique humain (LNCaP).

LNCaP :

10 Sens :

[GCATCAGTTCGCTTTTGACTT]ADN (SEQ ID NO.33)

[GCAUCAGUUCGCUUUUGAC]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.34)

Antisens :

[GTCAAAGCGAACTGATGCTT]ADN (SEQ ID NO.35)

15 [GUCAAAGCGAACUGAUGC]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.36)

Contrôle LNCaP :

Sens :

[GUUCGGUCUGCUUACACUA]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.37)

Antisens :

20 [UAGUGUAAGCAGACCGAAC]ARN-TT[ADN] (SEQ ID NO.38)

- Pour la P53 :

Les brins ADN des hybrides notés H1 comportent des bases ARN (U, soulignées).

25 La mutation présente dans les oligonucléotides MT1 est indiquée en italique.

WT :

Sens: 5' [GCAUGAACCGGAGGCCCAU]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.39)

Anti: 5' [AUGGGCCUCCGGUUCAUGC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.40)

wt H1 D/R :

30 Sens: 5' [GCAUGAAACCGGAGGCCCAUTT]ADN (SEQ ID NO.41)

Anti: 5' [AUGGGCCUCCGGUUCAUGC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.42)

wt H1 R/D :

Sens: 5' [GCAUGAACCGGAGGCCCAU]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.43)

Anti: 5' [AUGGGCCUCCGGUUCAUGCTT]ADN (SEQ ID NO.44)

35 wt H2 D/R :

Sens: 5' [GCATGAACCGGAGGCCCATTT]ADN (SEQ ID NO.45)

Anti: 5' [AUGGGCCUCCGGUUCAUGC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.46)

wt H2 R/D :

Sens: 5' [GCAUGAACCGGAGGCCCAU]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.47)

5 Anti: 5' ATGGGCCUTCCGGTTCATGCTT]ADN (SEQ ID NO.48)

Mt1 (r248w) ** :

Sens: 5' [GCAUGAACUGGAGGCCCAU]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.49)

Anti: 5' [AUGGGCCUCCAGUUCAUGC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.50)

Mt1 H1 D/R :

10 Sens : 5' [GCAUGAACUGGAGGCCCAUTT]ADN (SEQ ID NO.51)

Anti : 5' [AUGGGCCUCCAGUUCAUGC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.52)

Mt1 H1 R/D :

Sens: 5' [GCAUGAACUGGAGGCCCAU]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.53)

Anti: 5' AUGGGCCUCCAGUUCAUGCTT]ADN (SEQ ID NO.54)

15 Mt1 H2 D/R :

Sens: 5' [GCATGAAC TGGAGGCCCATTT] ADN (SEQ ID NO.55)

Anti: 5' [AUGGGCCUCCAGUUCAUGC]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.56)

Mt1 H2 R/D :

Sens: 5' [GCATGAAC TGGAGGCCCAT]ARN[TT]ADN (SEQ ID NO.57)

20 Anti: 5' [AUGGGCCUCCAGUUCAUGCTT]ADN (SEQ ID NO.58)

II - Résultats.

1) Inhibition de la GFP (Green Fluorescent Protein) par les hybrides ADN/ARN.

25 Les siRNAs contrôle (R/R) ou GFP (D/R) en doses croissantes ont été introduits par transfection en utilisant le kit Polyfect dans les myoblastes de souris C2C12, en même temps qu'un vecteur d'expression de la GFP. Le niveau de GFP a été suivi par Western Blot (Figure 7A) et par mesure directe de la fluorescence émise par la GFP à

30 l'aide d'un fluorimètre (Figure 7B). On observe une forte inhibition (jusqu'à 80%) de l'expression de la GFP par les siRNA hybrides ADN/ARN.

2) Inhibition du récepteur des androgènes par les hybrides ADN/ARN.

Les cellules LNCaP ont été transfectées avec un vecteur reporteur mettant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant 4 éléments de réponse au récepteur des androgènes. 24h plus tard, Les siRNA R/R, D/R ou R/D indiqués sur la figure ont été transfectés par l'agent de transfection Transit-tKO (Mirus) à raison de 250ng de chaque double brin pour 80000 cellules. Les cellules ont été incubées en milieu complet contenant des androgènes et l'activité luciférase, normalisée par rapport à la quantité de protéines de chaque échantillon, a été mesurée 24h plus tard (Figure 7C). Les hybrides R/D n'ont pas montré d'activité inhibitrice dans cette expérience. Les hybrides LNCaP D/R inhibent aussi efficacement que les siRNA R/R le récepteur des androgènes.

3) Inhibition de la p53 par les hybrides ADN/ARN.

La figure 7D montre que les hybrides H1 D/R sont aussi efficaces que les R/R pour inhiber l'expression des gènes. Les cellules H1299-NCI, qui n'expriment pas la p53, ont été transfectées (en utilisant la lipofectamine) par des vecteurs d'expression (400 ng) de la p53 sauvage (WT), mutée (MT) ou un mélange des deux (WT+MT), comme indiqué. Un vecteur CMV-GFP a été transfecté également comme contrôle interne. Les siRNAs (400 ng) dirigés contre la forme sauvage (WT), la forme mutée (MT), ou un siRNA irrelevant (CTRL) ont été transfectés en même temps. Les cellules ont été collectées 24 heures après, et analysées par Western blot avec un anticorps dirigé contre la p53 (DO1, Santa Cruz), ou la GFP (Santa-Cruz) pour contrôler l'efficacité de transfection. Note : l'expression de la forme mutée de la protéine stabilise la forme sauvage.

La figure 7E montre que les hybrides H2 D/R sont aussi efficaces que les R/R pour inhiber l'expression des gènes. Les cellules H1299-NCI, qui n'expriment pas la p53, ont été transfectées (en utilisant la lipofectamine)

par des vecteurs d'expression (400 ng) de la p53 sauvage (WT), mutée (MT) ou un mélange des deux (WT+MT), comme indiqué. Les siRNAs (400 ng) dirigés contre la forme sauvage (WT), la forme mutée (MT), ou un siRNA irrelevante (C) ont été transfectées en même temps. Les cellules ont été collectées 24 heures après, et analysées par Western blot avec un anticorps dirigé contre la p53 (DO1, Santa Cruz).

10 EXEMPLE 8 : Administration in vivo de siRNA par différentes voies.

Des cellules tumorales exprimant la luciférase de façon stable ont été injectées en sous cutané à des souris nues (1 million de cellules dans le flanc droit).
15 Au 8e jour de la croissance tumorale, les tumeurs ayant un volume moyen de 200 mm³ ont été injectées soit avec des siRNA contrôles (séquence mélangée de HIF1 alpha, voir exemple 3) soit avec un siRNA dirigé contre la luciférase. Les siRNA contrôles (3 µg/souris) ont été injectés dans un
20 volume de 50µl de PBS par voie sous cutanée dans le flanc de l'animal.

Les siRNA Luciférase ont été injectés à raison de 3µg/souris (3 animaux dans chaque groupe) dans 50 µl de PBS par voie sous cutanée (sc), ou par voie
25 intrapéritonéale (ip) ou par voie intra-veineuse(iv) (veine de la queue) ou par voie intratumorale (it). Dans ce dernier cas, les siRNA luciferase (3µg/souris) ont été dilués dans 20µl de PBS seulement.

Trois jours après l'injection des siRNA, les
30 animaux ont été sacrifiés, les tumeurs ont été prélevées, homogénéisées à l'aide d'un broyeur polytron. Sur les homogénats, un dosage de protéines et une mesure de l'activité luciférase dans un luminimètre ont été réalisés.

WO 03/040366

43

PCT/FR02/03843

Les résultats représentés à la figure 8 montrent l'activité luciférase rapportée à la quantité de protéine.

Annexe A(1)

Tableau 2

Maladie	Protéine de fusion	Translocation chromosomique	références
APL (acute promyelocytic leukaemia)	PML-RARalpha	t(15;17)(q22;q21)	De The et al. <i>Cell</i> 1991, 66:675
	PLZF-RARalpha	t(11;17)(q23;q21)	Chen Z et al. <i>EMBO J</i> 1993, 12:1161
	NPM-RARalpha	t(5;17)(q32;q12)	Redner RL et al. <i>Blood</i> 1996, 87:882
	NuMA-RARalpha	t(5;17)(q13;q21)	Wells RA et al. <i>Leukemia</i> 1996, 10:735
	STAT5beta/RARalpha		Arnould C et al. <i>Hum. Mol. Genet.</i> 1999, 8:1741
ALL (acute lymphoblastic leukaemia)	TEL-AML1	t(12;21)(p13;q22)	Domer PH et al. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1993, 90:7884-8
	BCR/ABL	t(9;22)(q34;q11)	
	MLL/AF4	t(4;11)(q21;q23)	
	ALL-translocation	t(12;21)(q12;q22)	
	CALM/AF10	t(10;11)(p12-p13;q14-q21)	
AML (acute myeloid leukemia)	ALL1/AF4	t(4;11)	Dreyling MH et al. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1996, 93:4804
	E2A/HLF	t(17;19)(q22;p13)	Janssen JW et al. <i>Blood</i> 1994, 84:3835
			Hunger SP et al. <i>Genes Dev</i> 1992, 6:1608
	TLS/FUS-ERG	t(16;21)(p11;q22) AML(M7)	Ichikawa H et al. <i>Cancer Res</i> 1994, 54:2865
	MLL-AF10	t(10;11)(p12-p13;q23);	Borkhardt A et al. <i>Leukemia</i> 1995, 9:1796
	MLL-ABI1	t(10;11)	Shibuya et al. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> 2001, 32:1
	HLXB9-ETV6	t(7;12)(q36;p13)	Beverloo et al. <i>Cancer Res</i> 2001, 61:5374
	MLL-ELL	t(11;19)(q23;p13.1)	Rubnitz JE et al. <i>Blood</i> 1996, 87:4804
	CBFbeta/MYH11	inv[16]	Tobal K et al. <i>Br J Haematol</i> 1995, 91:104
	AML1-MTG8	t(8;21)	Miyoshi et al. <i>EMBO J</i> 1993, 12:2715
	TEL-TRKC	t(12;15)(p13;q25)	Eguchi et al. <i>Blood</i> , 1999, 93:1355
	AML1/ETO	t(8;21)	Kusac R et al. <i>Leukemia</i> , 1994, 8:735
	CALM/AF10	t(10;11)(p12-p13;q14-q21)	Dreyling MH et al. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1996, 93:4804
	ETV6-BTL	t(4;12)(q11-q12;p13).	Cools et al. <i>Blood</i> 1999, 94:1820
	CBFbeta-SMMHC	inv(16) (p13;q22)	Wijmenga C et al. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1996, 93:1630
	FUS/ERG	t(16;21)(p11;q22)	Panagopoulos I et al. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> , 1994, 11:256
	DEK/CAN	t(6;9) (p23; q34).	on Lindern M et al. <i>Mol Cell Biol</i> , 1992, 12:1687
	MLL-AF9	t(9;11)(p22;q23)	Super HJ et al. <i>Blood</i> , 1995, 85:855
	MLL-ENL	(11q23)	Schreiner SA et al. <i>Leukemia</i> 1999, 13:1525
	MLL-AF4	t(4;11)(q21;q23)	Domer PH et al. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1993, 90:7884
	MLL-AF6	t(6;11)(q27;q23)	Tanabe S et al. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> 1996, 15:206
	MLL-AF17	t(11;17)(q23;q21)	Prasad R et al. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1994, 91:8107
	MLL-AFX	t(X;11)(q13;q23).	
	MLL-AF1p		
	MLL-AF1q	t(1;11) (q21;q23)	

Tableau 2
Annexe A(2)

Maladie	Protéine de fusion	Translocation chromosomique	références
	MLL self MLL-CBP AML1-ETO	t(11;16)(q23;p13) t(8;21)	Borkhardt A et al. <i>Oncogene</i> 1997, 14:195 So CW et al. <i>Leukemia</i> 2000, 14:594 Busson-Le Coniat M et al. <i>Leukemia</i> 1999, 13:302 So CW et al. <i>Cancer Res</i> 1997, 57:117 Taki T et al. <i>Blood</i> 1997, 89:3945 Erickson P et al. <i>Blood</i> 1992, 80:1825 Yoneda-Kato N et al. <i>Oncogene</i> 1996, 12:265
MDS/AML (myelodysplasia/acute myeloid leukemia)	NPM-MLF1	t(3;5)(q25.1;q34)	
CML (chronic myelogenous leukemia)	Bcr-Abl/p210 AML1-MDS1-EV11 (AME)	t(3;21)(q26;q22)	Ben-Neriah Y et al. <i>Science</i> 1986, 233:212 Fears S et al. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1996, 93:1642
BpALL (cell acute lymphoblastic leukemia)	TEL-AML1	t(12;21) (p13;q22)	Golub TR et al. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1995, 92:4917
MPD (myeloproliferative disease)	TEL-JAK2 TEL-PDGFbetaR TEL-TRKC	t(9;12)(p24;q13) t(5;12)(q33;p13) t(12;15)(p13;q25)	Lacronique et al. <i>Science</i> 1997, 278 :1309 Jousset C et al. <i>EMBO J</i> , 1997, 16 :69 Eguch et al. <i>Blood</i> , 1999, 93:1355
CMML (chronic myelomonocytic leukemia)	involving PDGFbetaR HIP1/PDGFbetaR TEL/PDGFbetaR	t(5;17)(q33;p13) t(5;7)(q33;q11.2) t(5;12)(q33;p13)	Magnusson et al. <i>Blood</i> 2001 98:2518 Ross TS et al. <i>Blood</i> 1998, 91:4419 Tomasson MH et al. <i>Blood</i> 1999, 93:1707
MALT (gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma)	API2-MALT1	t(11;18)(q21;q21)	Motegi M et al. <i>Am J Pathol</i> 2000, 156:807
ALCL (anaplastic large cell lymphoma)	NPM-ALK SU-DHL-1 AT1C-ALK ALK-related translocation	t(2;5)(p23;q35) t(2;5) inv(2)(p23q35) t(2;17)(p23;q25)	Waggott W et al. <i>Br J Haematol</i> 1995, 89:905 Siminovitch KA et al. <i>Blood</i> 1986, 67:391 Colleoni GW et al. <i>Am J Pathol</i> 2000, 156:781 Maes et al. <i>Am J Pathol</i> 2001, 158:2185
MPD (myeloproliferative disease)	NUP98-HOXA9	t(7;11)(p15;p15)	Nakamura T et al. <i>Nat Genet</i> 1996, 12:154

Tableau 2
Annexe A(3)

APP (amyloid precursor protein) in sporadic Alzheimer's disease (AD) or Down's syndrome	APP+1 (38-kDa)			Hersberger et al. <i>J Neurochem</i> 2001 76(5):1308-14
primary pleural monophasic synovial sarcomas (SS)	SYT-SSX1 SYT-SSX2	t(X;18)(p11.2;q11.2) t(X;18)(p11.2;q11.2)		Crew AJ et al. <i>EMBO J</i> 1995,14:2333 Crew AJ et al. <i>EMBO J</i> 1995,14:2333
Dermatofibrosarcoma protuberans (DP)	COL1A1/PDGFRB rearrangement	t(17;22)		O'Brien KP et al. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> 1998, 23:187
ARMS (pediatric alveolar rhabdomyosarcoma)	EWS-FLI1	t(11;22)(q24;q12)		Athale et al. <i>J Pediatr Hematol Oncol</i> 2001, 23:99
ESFT (Ewing sarcoma family of tumors)	EWS-ERG PAX3-FKHR PAX7-FKHR	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)		Sorensen PH et al. <i>Nat Genet</i> 1994, 6:146 Fredericks WJ et al. <i>Mol Cell Biol</i> 1995,15:1522
DSRCT (desmoplastic small round cell tumors)	EWS-WTI EWS/FLI-1	t(11;22)(p13;q12) t(11-22)(q24;q12)		Barr FG et al. <i>Hum Mol Genet</i> 1996, 5:15 Benjamin et al. <i>Med Pediatr Oncol</i> 1996 27(5):434-9 Fidella-Lambert et al. <i>Hum Pathol</i> 1999, 30:78
MM (multiple myeloma)	IGH-MMSET	t(4;14)(p16.3;q32)		Malgeri et al. <i>Cancer Res</i> 2000 60:4058
MPD (stem cell myeloproliferative disorder)	FGFR1-CEP110	t(8;9)(p12;q33)		Guasch et al. <i>Blood</i> 2000 95:1788
Ewing sarcoma (ES)-peripheral primitive neuroectodermal tumor (pPNET)	EWS-FEV EWS-FLI1 EWS-ERG	t(2;22)(q13;q22,q3;18)(p21;q23) t(11;22;14)(q24;q12;q11) t(21;22)(q22;q12)		Llombart-Bosch et al. <i>Diagn Mol Pathol</i> 2000, 9:137 Bonin G et al. <i>Cancer Res</i> 1993, 53:3655 Sorensen PH et al. <i>Nat Genet.</i> 1994, 6:146
MLS (myxoid liposarcomas)	ETV6/CBFA2 FUS/CHOP EWS/CHOP	t(12;21)(p12;q22) t(12;16)(q13;p11) t(12;22;20)(q13;q12;q11)		Fears S et al. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> 1996, 17:127 Rabbitts TH et al. <i>Nat Genet</i> 1993, 4:175 Zinszner H et al. <i>Genes Dev</i> 1994, 8:2513

WO 03/040366

47

PCT/FR02/03843

Annexe B(1)

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
248	G->A	129	C->A	189	C->G	217	Stop at 219	202	Ins
248	C->T	281	A->G	290	G->T	239	Stop at 259	247	Ins
282	C->T	293	Fr.	136	Stop at 169	187	G->C	171	Ins
175	G->A	157	DEL	201	Stop at 208	273	Stop at 343	203	Ins
196	C->T	161	C->A	275	Stop at 344	182	C->T	290	Stop at 303
213	G->A	195	A->T	132	Stop at 148	263	Stop at 344	233	del
234	T->C	197	G->C	176	Stop at 180	307	Stop at 344	210	Stop at 244
237	T->G	342	Fr.	191	del	261	Stop at 344	201	G->A
244	G->T	135	G->C	218	G->A	285	Stop at 344	92	Ins
256	A->G	145	T->A	234	T->A	159	G->A	44	Fr.
259	A->G	276	G->C	136	C->A	168	C->T	109	ins
					G->C/G-				G->A/G-
260	T->G	173	G->T	245	>A	230	C->T	279	>A
245	G->T	270	T->G	126	Stop at 148	228	A->C	168	Stop at 170
278	C->T	158	G->C	259	G->C	230	C->A	153	Stop at 178
134	T->A	152	Fr.	171	G->C	287	Stop at 300	247	C->A
194	C->T	132	G->T	197	T->A	269	Stop at 343	272	Stop at 305
273	G->A	288	A->C	236	T->G	227	Stop at 227	137	Stop at 169
309	C->T	247	A->T	239	C->A	231	Stop at 238	148	Stop at 180
274	T->A	273	G->C	288	A->T	275	G->C	157	Stop at 180
156	G->C	283	G->C	161	Fr.	142	T->C	191	Stop at 208
245	G->A	109	Fr.	164	Fr.	312	C->G	243	Stop at 260
193	A->G	174	G->C	142	Stop at 148	282	C->G/G->C	251	C->A
229	T->A	300	C->G	240	A->C	235	Stop at 244	242	C->A
237	G->A	205	A->G	137	T->C	156	Stop at 179	244	C->A
277	G->T	224	G->T	100	G->A	207	A->G	239	C->G
194	T->G	168	A->T	106	C->G	179	Stop at 246	142	T->A
242	G->C	167	Fr.	215	A->G	210	Stop at 214	248	C->A
246	G->C	136	C->G	246	Fr.	315	T->C	177	Stop at 246
68	G->T	164	A->C	117	G->A	229	Stop at 229	296	Fr.
147	T->A	179	C->G	271	Stop at 344	167	A->C	303	C->T
151	C->A	187	G->T	324	T->G	256	Stop at 343	140	C->A
209	A->T	201	Stop at 246	346	Fr.	176	Stop at 176	268	C->T
213	C->T	213	C->A	174	Stop at 246	309	Stop at 336	254	A->C
214	A->G	238	G->T	170	Stop at 177	270	Stop at 344	291	G->A
			T->G/C-						
248	G->T	113	>T	234	T->G	129	G->A	139	Stop at 148
266	G->T	143	G->T	354	A->G	46	Stop at 50	251	A->G
273	C->T	160	G->T	259	Stop at 344	160	T->G	221	Stop at 224
273	G->T	198	G->T	319	Stop at 344	56	A->T	237	A->T/G->T
282	C->G	203	G->T	332	Ins	74	Stop at 144	234	Stop at 234
334	G->T	238	T->A	340	Ins	118	A->G	215	T->A
342	C->T	272	G->C	177	del	257	del	191	T->A
132	A->C	276	Ins	179	T->A	192	G->T	290	C->A
249	G->C	277	T->G	190	Stop at 246	294	G->T/G->C	60	A->T
280	G->A	302	G->T	254	Ins	240	del	93	C->A
285	G->A	131	C->G	194	C->A	306	G->T	143	T->C/G->C
							C->G/G-		
241	C->T	168	A->G	172	T->A	175	>A	319	G->T
					G->T/T-				
249	G->T	258	G->T	173	>G	246	Stop at 261	110	Stop at 122
158	G->A	278	C->A	261	T->C	279	Stop at 305	190	T->G
163	T->C	285	G->C	266	A->G	146	T->G/G->T	192	C->G
176	G->A	287	G->A	199	Fr.	154	Stop at 169	126	T->G/A->G

WO 03/040366

48

PCT/FR02/03843

Annexe B(2)

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
206	Fr.	294	Fr.	236	C->G	132	del	273	Stop at 305
234	A->G	236	Fr.	168	C->G	175	Stop at 175	266	Stop at 344
238	G->A	301	Ins	201	G->C	152	Stop at 165	64	Stop at 122
254	A->G/T->A	228	A->G	203	Stop at 208 C->A/C->G	260	Stop at 262	103	C->A
287	G->T	175	Fr.	250	>G	194	Stop at 246	343	A->G
143	Fr.	282	G->T	283	G->T	170	C->A	317	Stop at 344
205	A->T	152	Stop at 180	256	C->A	213	C->G	125	Stop at 148
262	Fr.	177	C->G	245	C->T	213	A->C	239	A->G/C->T
171	G->T	216	T->A	342	G->C	232	A->G	119	Fr.
126	C->G	232	T->G	243	G->A	294	G->C	162	T->G/C->G
138	Fr.	275	Stop at 305	296	A->G	240	T->A	12	C->A/C->G
223	C->T	216	G->T	68	G->C	223	C->G	247	C->G
274	G->T	137	Fr.	102	C->T	171	A->C	190	T->A
218	Fr.	251	T->G	104	G->C	328	T->G	240	T->C
246	A->G	252	Ins	117	G->C	150	C->T	315	C->T
250	Fr.	254	T->A	175	Stop at 246	252	C->A	313	C->T
143	T->C	49	G->C	138	Stop at 169	256	Stop at 342	42	G->T
173	G->A	53	G->T	215	T->G	200	Stop at 246	73	G->T
242	G->T	60	C->T	247	Stop at 262	239	del	231	C->A
190	Fr.	202	G->T	104	C->T	215	A->T	172	Stop at 173
246	T->C	204	A->G	297	A->C	147	Stop at 169	211	Stop at 214
157	G->T	265	T->A	252	T->C	276	G->A	150	Stop at 180
239	Fr.	135	T->C	276	C->T	210	A->C	145	C->A
240	A->T	147	G->A	349	A->C	182	T->C	335	C->G
238	T->C	153	C->T	173	G->A/T->G/G->T	161	G->A/C->T	285	G->A/A->G
35	Stop at 42	170	G->T	225	G->C	83	C->A	85	Stop at 122
47	C->T	260	C->T	250	del	304	Stop at 344	98	C->T
89	Fr.	255	Stop at 263	224	A->G	225	ins	113	C->T
102	Fr.	139	G->C	166	T->A	314	Stop at 344	87	Stop at 148
141	C->G	234	A->C	156	C->A	301	A->G	97	C->T
144	C->T	152	C->A	291	A->G	224	G->A	217	Stop at 246
146	G->A	170	C->T	305	A->G	112	C->G	226	G->T
158	G->T	175	G->C	306	A->T	163	C->A	278	T->A
161	G->A	240	A->G	296	C->T	299	T->A	145	C->T
164	G->T	259	G->T	267	del	251	del	133	Stop at 148
165	Ins	87	Fr.	151	Stop at 169	162	Stop at 180	136	A->C
176	C->G	142	Fr.	228	Stop at 238	44	G->T	239	A->T/C->A
191	Fr.	175	C->G	165	Stop at 180	177	C->A/C->T	245	G->A/C->A
215	G->T	126	A->G	176	C->A	236	A->C	252	T->A
217	G->T	128	T->G	192	A->G	243	T->C	244	G->A/C->A
220	A->G	128	C->T	167	Ins	137	G->A	299	Stop at 305
224	G->C	134	T->C	166	T->C	218	G->C	305	A->T/G->A
242	C->G	172	Fr.	120	A->G	277	G->C	310	A->C
259	A->T	237	T->A	150	C->A	54	Fr.	322	C->G
267	G->C	193	A->C	155	A->C	40	Ins	323	Stop at 344
291	A->T	213	Fr.	203	Stop at 246	156	Stop at 166	315	C->G
298	G->T	246	G->A	221	A->G	168	C->G/A->T	308	G->C
182	C->A	235	Fr.	50	Stop at 109	249	G->T/G->T	323	T->G
233	Stop at 239	329	Fr.	191	Stop at 243	158	C->A	201	T->A

WO 03/040366

49

PCT/FR02/03843

Annexe B(3)

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
173	T->C	155	A->G	205	T->C	209	G->T	190	T->C
251	A->C	7	G->C	210	Stop at 246	184	Stop at 207	278	T->C
219	Fr.	56	G->T	110	C->G	146	G->T	305	G->C
280	A->T	104	Fr.	166	C->A	250	C->A	176	del
			G->A/G->A						
126	T->A	245	>A	269	G->T	74	Stop at 122	217	T->G
132	G->C	317	C->T	155	Stop at 179	225	del	174	A->C
181	C->T	125	G->A	155	Stop at 169	253	C->A	289	C->G
184	G->T	214	Fr.	156	Stop at 169	269	INS	234	C->G
220	T->C	248	G->C	162	C->T	184	T->C	232	A->C
266	G->A	307	Ins	196	A->G	304	T->G	317	A->T
279	G->A	152	G->T	213	Stop at 246	204	A->C	132	Fr.
305	Ins	178	C->G	214	C->T	66	Stop at 145	299	Fr.
220	A->C	253	C->T	269	C->T	259	Stop at 263	158	C->G/G->T
284	A->C	270	T->C	287	A->G	263	Stop at 271	142	Stop at 169
280	G->C	281	C->A	313	C->G	280	Stop at 344	203	Stop at 207
	Stop at 231								
172	231	216	Fr.	108	Stop at 144	237	Stop at 246	248	G->C/G->C
	Stop at 176								
174	176	131	Fr.	321	A->G	289	C->A	256	A->C
224	Ins	141	Ins	244	C->T	315	Stop at 344	262	Stop at 343
	Stop at 344								
251	344	140	Fr.	198	Stop at 246	312	C->T	301	Stop at 343
261	del	163	T->A	135	Ins	145	C->G	335	G->A
181	G->A	178	A->C	187	Stop at 246	169	G->T	179	Fr.
265	C->T	186	G->T	264	del	184	G->A	341	Stop at 344
272	T->C	208	A->T	52	C->T	364	G->A	103	C->G
136	C->T	255	Fr.	141	G->C	144	del	159	Stop at 179
281	G->T	307	G->A	167	A->G	146	Stop at 169	189	Stop at 246
316	C->T	130	T->G	84	C->T	190	C->A	274	Stop at 304
130	C->G	356	G->T	122	Stop at 169	249	A->C	149	Fr.
234	C->A	43	T->C	140	A->T	214	T->A	183	Stop at 183
368	Fr.	159	G->C	153	Ins	204	G->A	227	Stop at 245
							G->A/C->G		
301	Fr.	280	Ins	173	Fr.	242	>G	292	Stop at 343
148	Fr.	327	Fr.	186	Fr.	208	Stop at 241	178	A->G
176	G->T	87	C->A	152	C->G	158	Stop at 180	251	Stop at 343
152	C->T	156	G->T	171	A->G	217	Stop at 221	252	Stop at 263
248	C->G	158	C->G	180	G->T	262	Stop at 344	64	Fr.
255	T->G	161	G->T	202	G->A	239	Stop at 246	89	Stop at 122
271	Fr.	173	Stop at 180	227	T->G	205	Stop at 246	108	Stop at 122
274	Fr.	199	G->T	298	G->A	214	T->C	110	Ins
225	G->A	144	Fr.	303	G->A	297	ins	124	Stop at 124
176	T->A	233	Fr.	261	Ins	268	Fr.	285	del
135	Fr.	275	T->G	276	C->G	256	A->T	342	del
135	C->G	162	T->G	305	Fr.	223	C->A	313	A->T
151	C->T	178	Fr.	117	Stop at 122	26	Stop at 43	217	T->A
159	C->T	256	Fr.	155	Stop at 177	186	A->T	167	Stop at 169
179	A->G	225	Fr.	277	T->A	214	Stop at 246	278	C->T/T->C
306	C->T	148	T->A	298	A->C	245	C->A	290	Stop at 304
174	G->A	187	G->A	141	C->T	287	G->C	173	Stop at 173
			C->A/C->A						
208	Fr.	250	>A	115	T->C	96	C->T	259	C->T
126	Fr.	254	T->G	119	G->A	164	Stop at 166	288	T->A
173	del	257	T->C	120	Fr.	255	Ins	207	T->A

WO 03/040366

50
Annexe B(4)

PCT/FR02/03843

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
192	C->T	275	T->C	127	T->A	275	del	197	Stop at 208
			G->T/G-						
209	Fr.	216	>T	133	Fr.	284	ins	214	A->T
216	T->G	149	T->C	144	A->T	161	G->C	127	C->G
258	G->A	240	G->T	187	T->C	246	A->T/G->T	337	G->C
282	G->C	65	A->T	205	T->A	199	G->C	102	Stop at 122
308	Fr.	125	C->T	209	A->G	195	Stop at 246	187	Stop at 202
332	Fr.	166	C->T	237	A->T	275	Fr.	100	A->G
173	T->G	242	C->T	337	G->T	283	Stop at 305	140	Stop at 143
249	Fr.	263	A->C	342	G->A	233	ins	176	Stop at 179
275	G->A	139	G->T	377	C->A	127	Stop at 169	235	Ins
294	G->T	165	A->T	93	C->T	138	G->A	250	Stop at 262
316	Fr.	241	T->G	202	C->T	208	A->T/C->T	284	Stop at 305
159	C->A	255	T->A	199	Stop at 246	106	del	132	G->A
118	Ins	265	Fr.	252	C->T	245	G->C/G->T	129	C->T
277	G->A	279	Fr.	254	C->T	212	Stop at 246	210	C->T
244	G->C	241	Fr.	262	G->A	133	G->A	232	C->T
264	Fr.	151	C->G	263	A->G	124	T->C	257	C->T
	C->T/C-								
278	>T	156	Fr.	274	Stop at 344	51	Stop at 122	164	Stop at 169
177	C->T	170	A->T	293	Stop at 344	170	G->A	249	del
179	C->T	204	G->T	156	C->G	150	del	187	Fr.
281	C->T	249	A->G	157	Stop at 169	85	Stop at 143	210	Fr.
141	G->A	280	G->T	92	C->T	195	T->A	207	T->C
	Stop at								
283	344	281	A->C	201	G->T	314	Stop at 338	226	G->C
	Stop at								
136	148	94	T->A	202	Stop at 246	307	Stop at 340	168	C->G/C->G
286	G->A	153	C->A	222	C->T	67	Stop at 122	185	A->G
109	C->A	172	T->C	223	Stop at 246	255	Stop at 344	198	Stop at 208
164	A->G	173	T->A	264	Stop at 344	163	del	208	G->C
					C->A/G-				
238	G->C	296	C->G	273	>A	191	Stop at 246	331	A->C
110	G->T	284	A->G	316	C->A	255	Stop at 257	320	Stop at 336
									A->C/G-
113	T->G	135	G->T	271	Ins	262	Stop at 263	331	>A
162	C->G	31	G->A	129	Fr.	264	C->A	338	T->A
183	C->G	72	Fr.	192	Ins	348	G->T	280	Fr.
	Stop at								
287	344	91	G->A	307	G->T	232	Stop at 246	290	Fr.
152	G->A	110	Fr.	220	T->A	170	ins	297	Fr.
138	C->T	154	Fr.	285	A->G	114	T->A	297	C->G
278	C->G	158	Fr.	226	G->A	343	G->T	136	Stop at 164
236	T->C	167	C->T	137	Ins	26	Stop at 36	149	Stop at 180
237	A->G	178	Stop at 180	259	Ins	137	G->T	221	Stop at 246
289	T->A	195	Stop at 208	234	Fr.	145	G->C	228	ins
237	G->T	197	G->A	135	del	146	T->C	243	Stop at 340
136	Ins	199	G->A	102	Stop at 116	286	A->T	292	Stop at 304
	Stop at				G->A/A-				
99	147	227	Ins	324	>G	296	A->T	328	del
	Stop at		G->T/G-						
134	169	248	>T	27	Fr.	164	G->A	338	Stop at 346
			T->C/G-						
242	T->C	265	>T	162	del	148	T->G	243	A->C
193	C->T	272	T->A	277	Ins	274	del	348	T->A

WO 03/040366
Tableau 3

51
Annexe B(5)

PCT/FR02/03843

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
188	Fr.	274	T->G	135	T->G	211	Stop at 215	304	C->T
152	Stop at 169	349	Fr.	69	C->G	239	A->T	228	G->T
57	Fr.	203	Fr.	242	T->G	313	ins	370	A->C
281	C->G	205	T->G	157	G->A	327	T->G	149	C->T/C->T
260	Stop at 263	205	A->C	198	G->C	211	C->A	158	C->T/G->A
132	A->T	246	A->T	157	T->G	246	Stop at 246	240	G->A
249	Stop at 263	282	Stop at 305	279	G->C	163	C->T	258	Stop at 263
167	G->T	133	A->C	134	Ins	252	del	317	C->A
17	A->T	162	A->T	239	Stop at 263	129	del	262	T->A
24	A->T	174	A->T	168	Stop at 169	215	G->C	263	A->T
175	C->T	253	C->G	134	Fr.	253	A->C	163	T->G
358	G->A	131	A->G	253	A->T	274	Ins	312	Fr.
175	Ins	137	T->A	254	A->T	154	C->A	301	C->A
115	C->T	141	Fr.	247	A->G	183	C->T	226	G->A/G->A
103	Fr.	157	T->A	235	A->T	225	T->A	200	A->C/A->C
237	Fr.	157	Fr.	176	Stop at 243	149	ins	207	G->C
250	C->T	176	Ins	163	Stop at 169	171	Fr.	226	Stop at 227
365	A->G	240	Fr.	248	Stop at 344	287	A->T	266	
271	G->A	274	T->C	289	Stop at 304	133	G->T	113	del
320	G->C	46	Fr.	163	Fr.	137	C->A	226	Fr.
349	G->T	112	Fr.	207	Fr.	148	G->T	94	C->A
126	del	295	C->T	251	A->T	246	A->C	127	Fr.
36	G->A	193	T->A	112	Stop at 120	251	T->C	133	Stop at 145
76	Fr.	221	G->T	120	Stop at 122	273	T->C	153	Stop at 180
241	C->G	227	Fr.	231	C->T	297	C->A	75	C->T
281	G->C	241	C->A	212	Stop at 214	192	G->A	116	Stop at 122
244	G->A	281	G->A	179	A->C	244	C->G	184	del
218	T->G	316	Ins	174	G->T	221	Stop at 222	106	Stop at 122
256	Stop at 344	344	Fr.	232	del	243	T->A	69	Stop at 147
280	A->C/G->C	145	T->G	173	Stop at 195	308	C->G	298	Stop at 344
258	A->G	145	T->C	273	Stop at 344	189	C->A	182	ins
270	T->A	194	T->C	143	T->A	239		133	del
176	T->G	162	A->G	161	C->T	142	C->G	163	Stop at 168
171	Stop at 231	315	Ins	72	Stop at 120	295	C->A	174	del
251	Stop at 263	203	T->A	265	del	156	Stop at 168	330	T->G
337	C->T	273	Ins	214	Stop at 214	213	Stop at 245	125	C->G
266	G->C	62	G->T	107	Stop at 147	243	Stop at 244	258	Stop at 344
203	G->C	71	Fr.	317	Ins	289	C->T	330	Stop at 335
241	Stop at 252	128	Fr.	165	C->A	211	del	113	T->C
193	A->T	203	T->C	99	Stop at 122	220	Stop at 244	265	T->G
255	A->G	254	C->G	36	C->T	229	T->G	126	T->C
194	C->G	282	Fr.	245	Ins	253	del	214	Stop at 218
342	Stop at 342	258	G->C	76	C->T	302	Stop at 303	284	C->T
55	Ins	217	Fr.	160	T->A	208	A->G	96	ins
257	C->G	139	A->C	165	A->C	212	Stop at 244	62	Stop at 121

WO 03/040366

52

PCT/FR02/03843

Tableau 3

Annexe B(6)

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
282	ins	215	A->C	269	Fr. G->T/C-	129	Stop at 145	285	A->C
245	G->C	243	Ins	245	>A	190	del	358	G->T
209	ins	295	Fr.	208	G->A	216	Stop at 221	122	G->A
239	ins	285	A->T	236	C->T	275	Stop at 304	69	Stop at 122
179	T->G	170	Stop at 179	294	G->A	150	ins	155	C->T/C->G G->A/C-
314	C->T	208	Stop at 246	251	Fr.	188	C->G	245	>G
155	C->T	209	Stop at 214	215	Ins	220	Ins	181	C->G
249	Stop at 344	240	Stop at 263	154	C->T	292	A->C	185	Ins
116	C->G	141	G->T	293	G->C	305	G->T	52	Stop at 56
163	A->G	151	Fr.	161	C->G	48	A->T/C->T	112	Stop at 122
173	G->C	182	Stop at 246	56	G->A	154	C->G	165	Stop at 169
255	C->T	140	A->G	139	G->A	150	Fr.	323	del
255	C->G	142	C->T	222	G->C	329	C->A	67	C->G
218	T->C	169	T->A	302	Stop at 344	80	C->T	148	A->T
301	Stop at 344	170	A->G	144	Stop at 169	243	T->G	230	Stop at 246
271	A->T	271	A->G	166	T->G	104	Stop at 148	95	Stop at 148
286	A->G	331	C->T	149	T->A	117	Stop at 148	276	Stop at 286
294	A->G	194	Stop at 245 T->G/T-	204	del	138	C->A	249	Stop at 342
264	C->T	113	>G	127	C->A	248	C->T/G->C	208	del
235	A->G	165	C->T	289	T->C	167	G->A	163	Stop at 163
249	A->T	176	Stop at 246	261	A->G	214	C->G	213	A->G
216	G->A	207	T->G	269	A->G	272	Fr.	282	Stop at 304
215	G->A	297	C->T	128	Stop at 169	186	A->G	295	Stop at 344
272	G->A	141	T->G	159	Stop at 169	147	Ins	160	del
267	Stop at 344	181	G->C	204	Ins	261	T->G	233	A->T
242	G->A	229	Fr.	242	Stop at 242	240	T->G	186	T->C
195	T->C	276	Fr.	237	del	288	Fr.	243	T->C/G->A
172	G->T	149	Stop at 169	284	Stop at 304	286	A->G/A->T	142	C->A
239	A->G	193	C->G	331	G->T	126	Stop at 169	144	G->T
262	G->T	293	Stop at 304	130	T->A	182	Fr.	231	Fr.
255	T->C	147	Fr.	39	C->T	298	Fr.	254	Fr.
286	A->C	286	G->T	352	G->C	220	T->G	266	ins
283	G->A	287	Stop at 303	209	Stop at 246	269	G->A	258	A->C
190	C->T	293	G->A	90	C->T	232	Fr.	239	Stop at 261
154	G->A	295	T->C	111	G->A	131	del	262	G->C/G->C
272	Stop at 344	215	Fr.	119	C->T	261	Fr.	296	Stop at 334
143	G->A	333	Fr.	141	T->C	111	T->A	284	del
271	A->C	28	A->C	202	T->C	285	Fr.	150	A->C
133	T->A	67	C->T	326	A->G	266	G->A/A->T	225	G->T
174	Fr.	288	A->G	36	G->T	162	Stop at 169	247	Fr.
132	A->G	276	del	68	A->G	208	Ins	322	C->T
252	Fr.	292	Fr.	117	G->T	250	Ins	85	Stop at 117
330	T->A	189	C->T	145	G->T	130	Stop at 169	86	ins
179	C->A	210	A->G	215	>A	289	Fr.	189	Fr.
309	C->G	217	T->C	325	G->A	198	Fr.	315	Fr.
212	ins	135	Stop at 169	112	G->A	302	Fr.	169	Stop at 180
175	G->T	165	A->G	308	G->A	137	C->T	245	G->T/G->T

WO 03/040366
Tableau 3

Annexe B(7)

PCT/FR02/03843

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
153	C->G	234	del	63	C->T	191	Ins	175	C->A/G->C/C->G
145	C->G/G->T	218	del	104	A->T	186	G->A	71	C->T
277	Fr.	100	C->T	212	T->C	237	ins	72	Stop at 148
275	G->T	169	G->A	217	G->A	230	A->G	98	T->A
110	C->T	158	Stop at 179	328	T->C	184	A->G	287	Stop at 304
232	T->A	143	Stop at 169	45	C->T	157	ins	162	A->G/C->T
151	C->A/C->T	200	Ins	299	G->C	95	T->A/T->G	130	T->C
218	G->T	185	Stop at 246	111	T->C	314	Fr.	215	Stop at 243
139	A->G	11	G->A	127	T->C	306	A->G	204	Stop at 207
250	C->G	217	G->C	162	Ins	45	C->A	315	Stop at 336
280	A->C	72	Stop at 122	360	G->T	100	Fr.	33	Stop at 43
127	C->T	105	G->T	257	Ins	162	Fr.	41	Stop at 43
176	G->C	221	G->A	341	T->G	319	Fr.	80	Stop at 120
274	G->C	253	A->G	242	Stop at 246	113	Fr.	96	Stop at 147
246	T->G	300	Stop at 344	262	del	126	C->A	207	Stop at 212
229	Stop at 238	250	Stop at 342	257	T->G	196	Stop at 246	215	Stop at 245
247	A->C	135	T->A	229	T->C	175	G->A/C->G	224	Stop at 246
290	G->A	159	C->T/C->T	196	G->A	182	T->G	260	del
219	Stop at 246	249	G->A	200	A->G	190	C->G	276	Stop at 339
88	Stop at 122	198	A->G	278	Stop at 344	141	Stop at 148	290	Stop at 339
254	T->C	238	T->G	144	G->C	166	Stop at 180	300	Stop at 343
283	C->G	243	A->T	158	Stop at 169	345	Stop at 369	51	Stop at 121
299	G->A	259	G->A	252	Stop at 344	192	C->A	301	Stop at 303
346	G->A	268	A->G	241	Stop at 261	65	Fr.	236	A->C/C->G
116	T->C	287	Fr.	282	C->T/G->A	185	G->T	83	C->T
150	A->G	302	G->A	276	G->T	181	C->A	237	T->C
95	T->C	189	G->C	196	C->A	190	Stop at 208	156	ins
54	T->A	212	Fr.	193	T->C	155	C->G	128	C->G
256	C->T	51	G->T	160	A->C	242	G->T/C->T	243	T->G/G->C
309	C->A	160	G->C	243	A->G	269	A->T	133	A->G
109	T->C	207	Ins	206	Stop at 246	283	Fr.	125	C->A
265	T->C	147	T->G	194	T->A	189	G->A	62	A->G
139	Stop at 169	177	Fr.	212	T->A	244	G->A/G->C	54	C->T
154	G->T	121	Fr.	169	A->G	138	Stop at 148	84	C->G
179	A->T	147	T->C	183	T->C	188	Stop at 208	202	G->C/T->G
255	del	160	A->G	77	C->G	246	del	319	A->C
342	Stop at 344	230	Fr.	188	Ins	180	G->C	138	C->G
11	G->C	237	A->C	158	G->T/C->T	175	del	229	T->A/G->A
121	Stop at 122	47	Stop at 121	194	Stop at 207	290	Stop at 301	101	Stop at 122
34	ins	78	Fr.	253	Ins	271	del	278	Stop at 304
53	G->A	81	Stop at 122	360	Stop at 369	156	Stop at 180	339	Fr.
144	A->C	108	Stop at 146	191	C->G	69	C->A	303	G->T
280	A->G	110	G->C	141	T->A	112	C->A	247	Stop at 344

WO 03/040366
Tableau 3

54
Annexe B(8)

PCT/FR02/03843

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
326	G->T	156	C->T	303	A->T	193	C->A	299	Ins
332	Stop at 344	217	del	49	Ins	222	Fr.	293	del
256	Ins	242	T->A	62	Stop at 141	228	Stop at 245	247	Stop at 343
283	C->T	245	Stop at 340	103	del	145	del	5	C->T
232	T->C	251	Ins	105	del	148	Stop at 167	123	C->T
184	Fr.	91	G->T	121	del	140	Stop at 168	126	C->T
273	C->G	136	A->G	124	Ins	171	Stop at 180	320	G->A
133	T->C	146	G->C	124	Stop at 167	304	Fr.	356	G->A
272	G->T	164	A->T	338	Stop at 343	159	ins	379	G->A
293	G->T	194	Fr.	336	G->T	261	G->A	154	Stop at 180
267	G->A	255	A->T	124	C->G	304	A->G	164	G->C
325	G->T	339	Ins	284	A->T	222	G->T	75	C->G
71	Ins	35	G->T	144	G->A	291	G->C	163	Stop at 165
120	A->T	213	G->T	227	C->T	147	T->A/T->A	238	Stop at 244
151	Ins	261	Stop at 263	208	G->T	216	G->C	8	C->T
307	Fr.	299	T->C	228	G->A	91	Ins	15	A->C
108	Fr.	204	A->T	196	G->T	311	A->C	61	A->G
257	T->A	47	Fr.	195	C->G	334	Stop at 344	72	C->T
257	Stop at 344	178	C->A	272	T->G	211	T->C	102	ins
138	G->T	257	G->A	53	G->C	197	G->T	104	G->T
155	C->A	341	C->T	290	C->G	202	C->A	106	A->G
167	C->A	290	C->T	292	A->T/A->T	219	C->A	365	C->T
174	A->G	169	T->C	245	Stop at 246	228	G->C	10	C->T
181	G->T	233	C->T	188	Stop at 246	163	A->C	21	C->T
241	T->A	198	G->A	288	Stop at 344	271	G->C/A->G	361	G->A
305	A->T	200	Fr.	176	Fr.	238	Fr.	364	C->T
273	C->A	228	C->G	148	Stop at 179	206	T->A	385	T->C
219	C->T	236	C->A	161	Stop at 169	52	del	307	A->G
251	C->G	245	G->T/C->T	211	Stop at 246	94	Stop at 122	161	G->T/C->T
233	C->G	249	Ins	244	Stop at 246	236	Stop at 236	241	Stop at 263
215	Stop at 246	251	T->A	247	del	107	C->A	327	Stop at 335
216	Ins	258	Fr.	260	Stop at 344	106	Fr.	157	T->C
344	T->C	278	Ins	216	T->C	69	Fr.	132	Stop at 169
213	G->C	279	Ins	231	A->T	204	Fr.	221	A->C
82	C->T	296	A->C	208	C->A	305	A->C/G->T	184	G->C
151	del	255	Stop at 343	301	C->G	269	Stop at 344	157	Stop at 179
180	G->A	290	Stop at 344	208	C->G	230	Stop at 238	289	Stop at 305
337	G->A	137	Stop at 145	237	G->C	227	Stop at 228	105	G->C
281	A->T	155	Fr.	243	G->C	363	G->A	215	Stop at 221
133	T->G	206	Ins	159	G->T	253	Fr.	179	Stop at 180
236	del	242	Ins	33	Ins	250	Stop at 344	128	Stop at 148
306	G->C	300	Fr.	192	del	259	C->A	256	Stop at 263
227	T->A	191	T->C	312	C->A	167	del	131	Stop at 169
138	G->C	191	C->A	321	Stop at 344	173	Stop at 246	143	Stop at 167
178	Stop at 246	246	T->A	283	C->G/C->G	313	Fr.	158	C->T/G->T
213	C->T/A->G	258	A->T	285	G->T	346	Ins	207	A->T
191	Stop at	143	Ins	283	C->A	293	Ins	245	Stop at 262

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

Tableau 3

Annexe B(9)

Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event	Codon	Event
	207								
236	A->G	159	Fr.	216	del	224	A->T	258	Stop at 291
196	G->C	165	Stop at 178	318	C->T	158	Stop at 167	266	Stop at 271
					G->C/C-				
156	G->A	168	Ins	119	>G/C->G	154	Stop at 167	284	Stop at 344
339	G->T	169	del	344	T->G	283	Stop at 304	285	ins
166	C->G	195	T->G	216	Stop at 246	284	C->A	290	ins
	Stop at								
184	246	191	C->T	240	G->C	176	G->T/C->T	294	Stop at 344
	Stop at								
279	344	152	Ins	306	Stop at 344	47	C->T/C->T	308	Stop at 344
140	C->T	168	A->C	210	A->T	151	C->T/C->T	49	Stop at 50
282	C->A	209	G->C	198	A->T	88	C->T/C->T	254	Stop at 260
162	T->A	209	G->A	273	Fr.	71	C->A	301	Stop at 305
251	C->T	214	T->G	138	del	162	T->C	311	Stop at 344
	Stop at								
241	246	166	Fr.	171	Stop at 173	180	A->G	320	Stop at 344
	G->A/G-								
248	>A	265	Stop at 344	174	Ins	150	Stop at 163	324	Stop at 344
	Stop at								
362	369	163	C->G	209	A->C	218	Stop at 219	244	Stop at 263
81	C->T	182	T->A	208	Stop at 215	218	ins	265	C->A
	G->A/G-								
224	>A	211	Ins	285	Stop at 304	228	C->A	222	Stop at 246
197	T->G	236	T->A	286	G->C	248	Fr.	296	C->A
301	C->T	267	C->T	130	C->A	282	G->A/G->T	205	ins
157	G->C	148	G->A	201	Fr.	61	A->T	77	Fr.
282	G->A	133	Stop at 169	330	Stop at 344	75	T->C	86	C->T
276	C->A	174	Stop at 179	131	Stop at 148	76	G->A	112	C->T
	C->T/C-								
250	>T	239	A->C	236	Stop at 239	295	C->G	320	ins
279	G->T	244	Fr.	236	Ins	340	G->A	125	G->T
	C->T/C-								
219	>T	271	G->T	238	del	144	A->G	266	Fr.
	C->T/C-								
152	>T	278	Fr.	313	Stop at 334	126	T->G	135	Stop at 148
157	C->T	171	G->A	240	Stop at 262	234	T->C/C->G	316	Stop at 336
158	C->T	229	G->A	266	del	165	Fr.	234	T->A/C->A
	C->T/C-								
222	>T	161	>A	276	Stop at 344	101	A->T	233	C->T/A->C
195	C->T	168	C->A	166	Ins	254	Stop at 344	206	T->A/G->T
							G->A/G-		
291	G->T	241	T->C	150	Stop at 169	217	>A	226	C->A
192	A->T	154	Ins	222	C->A	169	Fr.	302	G->C
			C->T/C-						
333	G->A	177	>T	218	T->A	167	A->T	260	C->G
369	del	202	G->C	228	C->T	148	A->C	220	A->G/T->A
			C->T/C-						
203	G->A	250	>G	141	C->A	155	Stop at 180	233	Stop at 246
232	C->G	261	A->T	221	G->C	195	del	325	G->C
188	G->A	303	G->C	226	C->T	248	del	185	A->T
224	Fr.	182	G->A	215	T->C	275	T->A	186	Stop at 208
199	A->G	177	C->A	85	C->T	230	Stop at 239	184	Stop at 185
277	T->C	271	G->C	89	C->T	303	Stop at 344	187	Stop at 208
176	T->C	292	A->T	101	A->G	279	del	234	C->T
227	T->C	300	C->T	132	A->T/A-	153	Fr.	235	Stop at 239

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

Tableau 3

Annexe B(10)

[illegible]

Tableau 5
Annexe C

Accession #		Phenotype #		Mutation type		Pathogenicity		Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding			Sex of		Family	

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

58

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven		CpG Position Exon Domain	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			1	2			Poly Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d					
0495	Prostate cancer	Deletion	1	Nterm	058-078	⇒ ⇒	18				Contraction of poly Gln repeats (20 to 18) Somatic mutation	Male	Normal		Wallin et al; J Pathology 189: 559-653, 1999
0008	CAIS	Substitution	1	Nterm	060 540	Gln ⇒ Stop CAG ⇒ TAG			low	normal high	Normal upregulation.	Female	Normal	neg	Zoppi et al; J Clin Inv 19:1105, 1993
0409	CAIS	Insertion or deletion	1	Nterm	060 542	Gln ⇒ Gln CAG ⇒ CAA					either Int. insert or 2nt. del. -frameshift & stop in codon 80	Female	Normal	pos	Zhu et al; J Clin Endocrinol & metab 84: 1590-1594, 1999
0009	Prostate cancer	Substitution	1	Nterm	064 550	Gln ⇒ Arg CAG ⇒ CGG					Also Leu830Pro (CTT to CCT) mut. Somatic mutation	Male	Normal		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2: 277-285, 1996
0416	CAIS	Insertion	1	Nterm	085 617	Gln ⇒ Gln CAG ⇒ CAA	25		zero		Int. insertion causing frameshift and stop in codon 91	Female	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0529	CWR22R Prost. CA Cell line	Substitution	1	Nterm	91 635	Glu ⇒ Asp ⇒	27	19			AR indep. +Leu57Gln & His 874Tyr mut. + Duplication of exon 3	Male	Normal		Chelnski et al. The Prostate 47: 66-75, 2001
0417	CAIS	Deletion	1	Nterm	102 668	Pro ⇒ Pro CCAC ⇒ CCG	12	25	zero		1 nt. deletion causing frameshift and stop in codon 172	Female	Normal	neg	Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0010	Prostate cancer	Substitution	1	Nterm	112 698	Gln ⇒ His CAG ⇒ CAT					Also Trp798Stop (TGG to TGA) mut. Somatic mutation	Male	Normal		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2: 277-285, 1996
0418	CAIS	Substitution	1	Nterm	113 699	Gln ⇒ Stop CAA ⇒ TAA	25	27			Int. deletion causing frameshift and stop at codon 172	Female	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0417	CAIS	Deletion	1	Nterm	125 738	Pro ⇒ Pro CCAC ⇒ CCG	23	24	zero		1 nt. deletion causing frameshift and stop in Codon 172	Female	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0011	CAIS	Deletion	1	Nterm	127 743	Arg ⇒ Arg AGAA ⇒ AGG			zero		1 nt deletion causing frameshift & stop in Codon 172	Female	Normal	neg	Batch et al; Hum Mol Genet 1: 497, 1992
0436	CAIS	Deletion	1	Nterm	127 743	Arg ⇒ Arg AGAA ⇒ AGG					1 nt deletion causing frameshift & stop in Codon 172	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0012	CAIS	Deletion	1	Nterm	140	⇒ ⇒					Deletion of Codons 140-148 Stop in Codon 154	Female	Normal		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		CpG Position spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			proven	Exon			Poly Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d					
0516	CAIS	Substitut	1	Nterm	153	Glu ⇒ Stop GAG ⇒ TAG						Female	Normal		Copelli et al; Asian J Androl 1: 73-77, 1999
0523	CAIS	Substitut	1	Nterm	819	Glu ⇒ Stop GAG ⇒ TAG						Female	Normal		Gacobini et al. Hum Genet. 108; 176, 2001
0013	CAIS	Substitut	1	Nterm	172 876	Leu ⇒ Stop TTA ⇒ TGA						Female	Normal		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0316	PAIS	Substitut	1	Nterm	172 876	Leu ⇒ Stop TTA ⇒ TGA			low	normal	Somatic mosaic mut. causes partial virilization	Female	Ambiguous		Holterhus et al; J Clin Endocrinol. 82: 3584- 3589, 1997
0420	CAIS	Substitut	1	Nterm	172 876	Leu ⇒ Stop TTA ⇒ TGA	26	24	zero			Female	Normal	neg	Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0014	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	180 911	Lys ⇒ Arg AAA ⇒ AGA					Somatic mutation	Male	Normal		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2: 277- 285, 1996
0319	CAIS	Substitut	1	Nterm	194 943	Gln ⇒ Arg CAA ⇒ CGA					Also 1 nt deletion in Codon 597 causing stop	Female	Normal		Komori et al; J Obstetrics & Gynocol. 23: 277-81, 1997
0551	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	198 955	Glu ⇒ Gly GAA ⇒ GGA					Treated with bicalutamide - somatic mutation	Male	Normal		Taplin et al; 37th meeting ASCO 20: Abstr, 1738 2001
0015	CAIS	Insertion	1	Nterm	202	Glu ⇒ 0 ⇒			zero		4 nt insertion causing frameshift & stop in Codon 232	Female	Normal	neg	Batch et al; Hum Mol Genet 1:497, 1992
0549	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	202 968	Glu ⇒ Glu GAA ⇒ GAG					Treated with bicalutamide - silent mutation- somat. mut.	Male	Normal		Taplin et al; 37th meeting ASCO 20: Abstr, 1738 2001
0395	Normal	Substitut	1	Nterm	205 977	Ser ⇒ Arg AGC ⇒ AGG					Homosexual individual	Male	Normal		Macke et al; Am J Human Genetics 53: 844-852, 1993
0437	CAIS	Deletion	1	Nterm	208 985	Arg ⇒ Lys AAGA ⇒ AAG			zero		Frameshift & stop in codon 232 ?	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0376	MAIS	Substitut	1	Nterm	210 992	Arg ⇒ Arg AGG ⇒ AGA						Male	Normal		Wang et al; Clinical Genetics 54: 185-192, 1998

WO 03/040366

60

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		CpG Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			proven	Exon Domain	hot spot	Amino acid Base	Poly Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d					
0328	Normal	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA					Silent mutation - polymorphism detected in 8% popul.	Male	Normal		Batch et al; Hum Mol Genet 1:497, 1992
0329	Normal	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA					Silent mut. polymorphism - detected in 14% of X chromosomes	Male	Normal		Hjort et al; Eur J Pediatr 153: 317-321, 1994
0330	Normal	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA					Silent mutation polymorphism	Male	Normal		Lu et al; Clinical Genetics 49: 323-324, 1996
0377	Normal	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA					Silent mutation polymorphism	Male	Normal		Wang et al; Clinical Genetics 54: 185-192, 1998
0396	Normal	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA					Silent mut. polymorphism detected in 10% of X chromosomes	Male	Normal		Macke et al; Am J Human Genetics 53: 844-852, 1993
0378	MAIS	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA					Silent mutation polymorphism - 4 patients with infertility	Male	Normal		Wang et al; Clinical Genetics 54: 185-192, 1998
0421	CAIS	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA	22	24	v low		Silent mutation - negligible level of mRNA & hAR	Female	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0422	CAIS	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA	21	23	normal normal		Silent mutation -	Female	Normal	neg	Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0423	PAIS	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA	23	24	v low		Silent mutation -	Male	Ambiguous		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0424	PAIS	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA	19	24	normal high		Silent mutation -	Male	Ambiguous	pos	Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0425	MAIS	Substitut	1	Nterm	211	Glu ⇒ Glu GAG ⇒ GAA	20	16	normal high		Silent mutation -	Male	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0379	MAIS	Substitut	1	Nterm	214	Gly ⇒ Arg GGG ⇒ AGG	27	23	normal normal norm		servere oligospermia- 20% lower transactivation	Male	Normal		Wang et al; Clinical Genetics 54: 185-192, 1998
0380	Normal	Substitut	1	Nterm	1005	Gly ⇒ Arg GGG ⇒ AGG						Male	Normal		Wang et al; Clinical Genetics 54: 185-192, 1998

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		CpG Position spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of External rearing Genitalia	Family history	Reference
			proven Exon	Domain			Poly Gln #	Poly Gly #	B_{max}	K_d				
0016	CAIS	Insertion	1	Nterm	215	Ala ⇒ Gly GCT ⇒ GGCT					1 nt insertion causing frameshift & stop in Codon 232	Female	neg	Hjort et al; Hum Mol Genet 3: 1163-1166 1994
0548	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	222 1026	Asn ⇒ Asp AAT ⇒ GAT					Treated with flutamide also Thr877Ala - somatic mutation	Male		Taplin et al; 37th meeting ASCO 20: Abstr, 1738 2001
0531	MAIS	Substitut	1	Nterm	233 1061	Asn ⇒ Lys AAC ⇒			normal	*	* Azospermia - transactivation 46% of wt	Male		Giwerman et al. Clin Endocrinol 54: 827-834, 2001
0350	CAIS	Substitut	1	Nterm	255 1126	Leu ⇒ Pro CTG ⇒ CCG				*	* Also Gly820Ala mut. Extra mutation causes greater thermolability	Female		Tanaka et al; Gynocol Endocrinol 12: 75-82, 1998
0017	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	266 1149	Met ⇒ Thr ATG ⇒ ACG					Also Leu574Pro (CTG to CCC) mut. Somatic mutation	Male		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2: 277- 285, 1996
0018	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	269 1167	Pro ⇒ Ser CCA ⇒ TCA					Somatic mutation	Male		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2: 277- 285, 1996
0019	CAIS	Deletion	1	Nterm	272 1178	Gly ⇒ Gly GGAA ⇒ GGG			zero		1 nt deletion causing frameshift & stop in Codon 301	Female		Bruggenwirth et al; J Steroid Biochem Mol Biol 58: 569-575, 1996
0556	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	296 1250	Ser ⇒ Arg AGC ⇒ AGA					Poor differentiation of CaP. Germline mutation ?	Male		Yu et al; Sheng Wu Hua Xue 32: 459-462, 2000
0550	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	334 1359	Ser ⇒ Pro TCC ⇒ CCC					Treated with flutamide somatic mutation	Male		Taplin et al; 37th meeting ASCO 20: Abstr, 1738 2001
0398	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	340 1381	Pro ⇒ Leu CCG ⇒ CTG					Somatic mutation Stage 3 tumor	Male		Castagnaro et al; Verh. Dtsch. Ges. Path. 77: 119-123, 1993
0020	CAIS	Substitut	1	Nterm	353 1419	Glu ⇒ Stop GAG ⇒ TAG	21	23	low		low specific binding with MB only-mRNA < 20%	Female	neg	Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0021	CAIS	Substitut	1	Nterm	371 1474	Gly ⇒ Stop GGA ⇒ TGA					Somatic instability of polyglycine tract	Female	pos	Davies et al; Clinical Endocrinology 43: 69-77, 1995
0338	MAIS	Substitut	1	Nterm	390 1530	Pro ⇒ Ser CCG ⇒ TCG					Oligospermia	Male		Hjort et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 2810-2815, 2000

WO 03/040366

62

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		Exon	CpG Position	Change	Exon 1 tracts			Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			proven	Exon	Domain	hot spot	Amino acid Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile					
0504	MAIS	Substitut 1	*	1	Nterm	390	Pro ⇒ Ser CCG ⇒ TCG						Oligospermia	Male	Normal		Hjort et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 2810-2815, 2000
0547	Prostate cancer	Substitut 1		1	Nterm	1530	Pro ⇒ Leu CCG ⇒ CTG						Treated with flutamide also Asn756Asp - somatic mutation	Male	Normal		Taplin et al; 37th meeting ASCO 20: Abstr, 1738 2001
0022	CAIS	Substitut 1		1	Nterm	390	Pro ⇒ Arg CCG ⇒ CCG	20	24	zero			+ substs. Glu211Glu GAGtoGAA&Gln443 Arg(CAGtoCCG)	Female	Normal	pos	Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0426	CAIS	Substitut 1		1	Nterm	403	Gln ⇒ Stop CAG ⇒ TAG	28	23	zero			mRNA < 20%	Female	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0438	CAIS	Deletion		1	Nterm	461	Gly ⇒ Gly GGAC ⇒ GGG			zero			1 nt. deletion causing frameshift	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0410	CAIS	Deletion		1	Nterm	473	Glu ⇒ Gly GAG ⇒ GGC	24	22				2nt. del causing frameshift & stop in cod 499- mRNA 50%	Female	Normal		Thiele et al; J Clin Endocrinol & Metab 84: 1751-1753, 1999
0427	CAIS	Deletion		1	Nterm	473	Glu ⇒ Gly GAG ⇒ GGC	26	26	zero			2nt. del causing frameshift & stop in cod 499- mRNA 50%	Female	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0024	CAIS	Substitut 1		1	Nterm	480	Tyr ⇒ Stop TAC ⇒ TAA	15	15	zero			Normal 110KD AR produced at 25% of normal level	Female	Normal		Gottlieb et al; Hum Mutat. 14: 527-539, 1999
0546	CAIS	Deletion		1	Nterm	487	Gln ⇒ Stop CAG ⇒ TAG							Female	Normal		Boehmer et al; J Clin Endocrinol & Metab 86: 4151-4160, 2001
0439	CAIS	Deletion		1	Nterm	488	Gly ⇒ 0 ⇒			low			5 nt. deletion causing frameshift	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0440	CAIS	Substitut 1		1	Nterm	491	Gly ⇒ Ser GGC ⇒ AGC			low		low		Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0025	CAIS	Substitut 1		1	Nterm	502	Trp ⇒ Stop TGG ⇒ TAG							Female	Normal	pos	Bruggenwirth et al; J Steroid Biochem Mol Biol 58: 569-575, 1996
0339	MAIS	Substitut 1	*	1	Nterm	511	Val ⇒ Val GTG ⇒ GTA						Oligospermia caused by silent mutation	Male	Normal		Hjort et al; 80th US Endo Soc Meeting, Abstr P2-38, 1998

WO 03/040366

63

PCT/FR02/03843

Accession #		Pathogenicity		CpG Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding		Sex of		Family	
		Phenotype	Mutation type	Exon Domain	hot spot Base	Amino acid Base	Change Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	rearing	External Genitalia	history	Reference
0026	Prostate cancer	Substitut	1	Nterm	528	Asp ⇒ Gly	GAT ⇒ GGT					Male	Normal		Tilley et al; Chemical Cancer Res. 2: 277-285, 1996
0027	CAIS	Substitut	1	Nterm	534 1964	Tyr ⇒ Stop	TAC ⇒ TAG			zero		Female	Normal	neg	McPhaul et al; FASEB J 5:2910-15, 1991
0028	CAIS and mental retardation	Deletion	1-8			⇒	⇒			zero		Female	Normal	neg	Trifiro et al; Mol Cell Endocrinol 75:37-47, 1991
0029	CAIS	Deletion	1-8			⇒	⇒			zero		Female	Normal	pos	Quigley et al; J Clin Endocrinol Metab 74:927, 1992
0030	CAIS	Deletion	1-8			⇒	⇒			zero		Female	Normal	pos	Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-22, 1996
0435	CAIS	Deletion	1-8			⇒	⇒			zero		Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0031	CAIS	Deletion	2			⇒	⇒					Female	Normal		Quigley et al; J Cell Biochem Suppl 16C; Abstr L323, 1992
0441	CAIS	Duplicat	2			⇒	⇒					Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0032	PAIS	Substitut	2		547	Leu ⇒ Phe	TTG ⇒ TTT			low	high	Male	Ambiguous	pos	Kari et al; 76th US Endo Soc Meeting, Abstr 1735, 1994
0357	Prostate cancer	Deletion	2		2003	Leu ⇒ Leu	TAG ⇒ TTC					Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0033	MAIS	Substitut	2		547 2003	Pro ⇒ Ser	CCC ⇒ TCC					Male	Near-normal male	pos	Sutherland et al; J of Urology 156: 828-831, 1996
0023	CAIS	Duplicat	2		2011	⇒	⇒					Female	Normal		Lumbroso et al; 10th Int Cong of Endocrinol, Abstr P1-182, 1996
0358	Prostate cancer	Deletion	2		554 2023	Pro ⇒ Pro	CCAA ⇒ CCC					Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995

WO 03/040366

64

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding Thermolabile			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
						Gln #	Poly Gly #	Poly	Bmax	Kd	k					
0359	Prostate cancer	Deletion	2	554	Pro ⇒ Pro CCAA ⇒ CCC							Frameshift - somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0034	CAIS	Substitut	2 DBD	559 2038	Cys ⇒ Tyr TGC ⇒ TAC				normal	normal			Female	Normal	neg	Zoppi et al; Mol Endocrinol 6:409, 1992
0035	PAIS	Substitut	2 DBD	568 2064	Gly ⇒ Trp GGG ⇒ TGG				normal	normal			Female	Normal		Lobaccaro et al; Clin Endocrinol, 40:297, 1994
0036	PAIS	Substitut	2 DBD	568 2065	Gly ⇒ Val GGG ⇒ GTG				normal			Severe hypospadia	Male	Ambiguous		Allera et al; J Clin Endocrinol & Metab 80: 2697-2699, 1995
0037	PAIS	Substitut	2 DBD	568 2065-6	Gly ⇒ Val GGG ⇒ GTT				normal	normal						Chang et al; 73rd US Endo Soc Meeting, Abstr 28, 1991
0545	PAIS	Substitut	2 DBD	571 2073	Tyr ⇒ His TAT ⇒ CAT	21							Male	Ambiguous		Boehmer et al; J Clin Endocrinol & Metab 86: 4151-4160, 2001
0558	PAIS	Substitut	2 DBD	571 2073	Tyr ⇒ His TAT ⇒ CAT							DHT therapy effective	Male	Ambiguous		Foresta et al; Am J Med Genet 107: 259-260, 2002
0332	CAIS	Substitut	2 DBD	571 2074	Tyr ⇒ Cys TAT ⇒ TGT								Female	Normal		Komori et al; Arch Gynecol & Obstetrics 261: 95-100, 1998
0038	CAIS	Substitut	2 DBD	573 2080	Ala ⇒ Asp GCT ⇒ GAT				normal			Defective DNA binding & transactivation	Female	Normal	neg	Bruggenwirth et al; J Steroid Biochem Mol Biol 58: 569-575, 1996
0489	Prostate Cancer	Substitut	2 DBD	575 2085	Thr ⇒ Ala ACA ⇒ GCA							Somatic Mutation	Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0039	CAIS	Substitut	2 DBD	576 2088	Cys ⇒ Arg TGT ⇒ CGT				normal	normal			Female	Normal	pos	Zoppi et al; Mol Endocrinol 6:409, 1992
0040	CAIS	Substitut	2 DBD	576 2089	Cys ⇒ Phe TGT ⇒ TTT				normal	normal			Female	Normal		Chang et al; 73rd US Endo Soc Meeting, Abstr 28, 1991
0407	CAIS	Substitut	2 DBD	576 2089	Cys ⇒ Phe TGT ⇒ TTT							Lack of DNA binding - 17 members of same family	Female	Normal		Hooper et al; 81st US Endo Soc Meeting, Abstr P2-145, 1999

WO 03/040366

65

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Pathogenicity		Mutation type	Exon	CpG Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
		proven	Domain			hot spot Base	Amino acid Base	Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d					
0554	PAIS	*	Substitut 2 DBD		577		Gly ⇒ Arg GGA ⇒ AGA			normal	normal high	Alters affinity & selectivity of AR-ARE interactions				Nguyen et al; Mol Endocrinol 15:1790-1802, 2001
0509	PAIS	*	Substitut 2 DBD		2091					normal		partial transactivation in COS cells	Male	Ambiguous		Giwerzman et al; Hormone Research 53: 83-88, 2000
0041	CAIS		Substitut 2 DBD		578		Ser ⇒ Thr AGC ⇒ ACC						Female	Normal		Sultan et al, J Steroid Biochem & Mol Biol:46 519, 1993
0042	CAIS	*	Substitut 2 DBD		2095		Cys ⇒ Tyr TGC ⇒ TAC			normal normal		Reduced transcription & DNA binding	Female	Normal	pos	Imasaki et al; Mol & Cell Endocrinol 120: 15-24, 1996
0043	CAIS		Deletion 2 DBD		579		Cys ⇒ Phe TGC ⇒ TTC			zero		Single nt. deletion causing frameshift & stop in Codon 619	Female	Normal		Imai et al, Annals of Clin Biochem, 32: 482-486, 1995
0487	Prostate Cancer		Substitut 2 DBD		2099		Cys ⇒ Cys TGAC ⇒ TGA					Somatic mutation	Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0044	CAIS	*	Substitut 2 DBD		580		Lys ⇒ Arg AAG ⇒ AGG			normal normal			Female	Normal		Lumbroso et al; Fertil Steril, 60:814, 1993
0045	CAIS	*	Deletion 2 DBD		2101		Val ⇒ Phe GTC ⇒ TTC			low	normal	3 nt. del - Phe 582 del 2nt. from 581, 1nt. 582. 581 still Val	Female	Normal	neg	Beitel et al; Hum Mol Genet, 3:21, 1994
0442	CAIS		Deletion 2 DBD		2103		Phe ⇒ 0 GATCT ⇒ GTC	22	23	normal normal		3 nt. del - of Phe	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0047	PAIS		Substitut 2 DBD		582		Phe ⇒ 0 TTC ⇒			zero			Female	Ambiguous		Hjort et al; Hum Mol Genet 3: 1163-1166 1994
0046	PAIS	*	Substitut 2 DBD		2106-8		Phe ⇒ Ser TTC ⇒ TCC			normal normal		Reduced transcription & DNA binding	Female	Ambiguous	pos	Imasaki et al; Mol & Cell Endocrinol 120: 15-24, 1996
0048	CAIS		Substitut 2 DBD		582		Phe ⇒ Tyr TTC ⇒ TAC						Female	Normal		Sultan et al; J Steroid Biochem & Mol Biol:46 519, 1993
0049	CAIS		Deletion 2-8		2107		Arg ⇒ Lys AGA ⇒ AAA			zero		Similar 2-8 deletion in 2 different families	Female	Normal		Jakubiczka et al; Human Mutation 9: 57-61, 1997

WO 03/040366

66

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		CpG Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			proven	Exon Domain	hot spot Base	Amino acid Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd					
0050	CAIS	Deletion	*	3 DBD		⇒			high	normal	Produces internally deleted protein	Female	Normal	pos	Quigley et al; Mol Endocrinol 6:1103, 1992
0051	CAIS	Deletion		3 DBD		⇒						Female	Normal	pos	Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-22, 1996
0443	CAIS	Deletion		3 DBD		⇒			zero			Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0444	CAIS	Deletion		3 DBD		⇒						Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0488	Prostate Cancer	Substitut		3 DBD	586	Ala ⇒ Val					Somatic mutation	Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0490	Prostate Cancer	Substitut		3 DBD	2119	GCC ⇒ GTC					Somatic mutation	Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0052	CAIS	Substitut	*	3 DBD	587	Ala ⇒ Ser			zero			Female	Normal		Marcelli et al; Mol Endocrinol 4: 1105, 1990
0053	PAIS	Substitut	*	3 DBD	2121	GCT ⇒ TCT			normal	normal	Found in 2 unrelated fam. Abolishes dimerization	Male	Ambiguous	pos	Gast et al; Mol & Cell Endocrinol 111: 93-98, 1995
0434	PAIS	Substitut	*	3 DBD	590	Lys ⇒ Stop			normal	normal	Somatic mosaicism	Male	Ambiguous		Holterhus et al; Pediatric Res 46: 684-690, 1999
0510	PAIS	Substitut	*	3 DBD	2130	AAA ⇒ TAA			normal	normal	partial transactivation in COS cells	Male	Ambiguous		Giwerzman et al; Hormone Research 53: 83-88, 2000
0054	PAIS	Substitut	*	3 DBD	2148	GCC ⇒ ACC			normal	normal	High dissoc. rate. Also has Arg617Pro (CGG to CCG) mut.	Female	Ambiguous		Zoppi et al; Mol Endocrinol 6:409, 1992
0390	PAIS	Substitut		3 DBD	596	Ala ⇒ Thr					Severe hypospadias and cryptorchidism	Male	Ambiguous		Nordenskjold et al Urological Res. 27: 49-55, 1999
0055	CAIS	Substitut		3 DBD	2148	GCC ⇒ ACC						Female	Normal	pos	Baldazzi et al; Hum Mol Genet 3:1169-70 1994

Accession #	Phenotype	Mutation type	Substitut	Exon	proven	Pathogenicity		CpG Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
						hot spot	Domain	hot spot	Amino acid Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile				
0056	PAIS	Substitut	3				DBD	604	Asp ⇒ Tyr GAT ⇒ TAT						Male	Ambiguous		Hiort et al; Hum Mol Genet 3: 1163-1166 1994
0057	CAIS	Substitut	3	*			DBD	2172	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA			zero			Female	Normal		Brown et al; Eur J Pediatr (Suppl 2) 152; S62, 1993
0511	CAIS	Substitut	3	*			DBD	607	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA			zero			Female	Normal		Giwerman et al; Hormone Research 53: 83-88, 2000
0058	PAIS and breast cancer	Substitut	3	*			DBD	607	Arg ⇒ Gln CGA ⇒ CAA						Male	Ambiguous	pos	Wooster et al; Nat Genet 2:132, 1992
0059	PAIS	Substitut	3	*			DBD	2182	Arg ⇒ Gln CGA ⇒ CAA			normal normal			Male	Ambiguous	pos	Weidmann et al; Clin Endocrinology 45: 733-739, 1996
0060	PAIS	Substitut	3	*			DBD	607	Arg ⇒ Gln CGA ⇒ CAA						Female	Ambiguous		Hiort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0347	PAIS	Substitut	3	*			DBD	2182	Arg ⇒ Gln CGA ⇒ CAA					Patient successfully treated with testosterone enanthate	Male	Ambiguous		Weidmann et al; J Clin Endocrinol & Metab 83: 1173-1176, 1998
0393	PAIS	Substitut	3	*			DBD	607	Arg ⇒ Gln CGA ⇒ CAA					Germ cell tumour - in undescended testis	Female	Normal		Chen et al; Human Reproduction 14: 664-670, 1999
0412	CAIS	Deletion	3				DBD	608	⇒ ⇒					Mullerian ducts pres. 5nt. del frameshift & stop in codon 619	Female	Normal		Chen et al; Fertility & Sterility 72: 170-173, 1999
0061	PAIS	Substitut	3				DBD	608	Arg ⇒ Lys AGG ⇒ AAG			normal normal			Male	Ambiguous		Saunders et al; Clin Endocrinol 37:214, 1992
0062	PAIS and breast cancer	Substitut	3				DBD	2185	Arg ⇒ Lys AGG ⇒ AAG			normal normal			Male	Ambiguous		Lobaccaro et al; Hum Mol Genet, 2:1799, 1993
0322	PAIS	Substitut	3				DBD	608	Arg ⇒ Lys AGG ⇒ AAG			normal normal		Defective nuclear localization	Male	Ambiguous		Tincello et al; Clinical Endocrinology 46: 497-506, 1997
0352	PAIS	Substitut	3				DBD	608	Arg ⇒ Lys AGG ⇒ AAG						Male	Ambiguous	pos	Hiort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998

WO 03/040366

68

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Pathogenicity		Mutation type	Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of rearing		External Genitalia	Family history	Reference
		proven	Exon					Gln #	Poly Gly #	Poly	Bmax	Kd						
0481	PAIS		Substitut 3	DBD	608		Arg ⇒ Lys AGG ⇒ AAG				normal high							Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0063	PAIS	*	Substitut 3	DBD	610		Asn ⇒ Thr AAT ⇒ ACT				normal low	*		Male		Ambiguous		Weidemann et al; Clin Endocrinology 45: 733 - 739, 1996
0496	CAIS		Substitut 3	DBD	611		Cys ⇒ Tyr TGT ⇒ TAT							Female		Normal		Mockel et al; Geburtshi. und Frauen. 60: 232-234, 2000
0064	CAIS	*	Deletion 3	DBD	615		Arg ⇒ 0 TCA TCG ⇒ TGT	27	23		normal normal		3 nt. del -Arg615 del, 1nt. from 614, 2nt. 615. 614 still Cys	Female		Normal	pos	Beitel et al; Hum Mol Genet, 3:21, 1994
0512	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ Gly CGT ⇒ GGT						no transactivation in COS cells	Female		Normal		Giwerzman et al; Hormone Research 53: 83-88, 2000
0065	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT	25	23		low high			Female		Normal	pos	Beitel et al; Hum Mol Genet, 3:21, 1994
0066	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT				normal normal			Female		Normal	pos	Mowszowicz et al; Mol Endocrinol 7:861-869, 1993
0067	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT							Female		Normal		Brown et al; Eur J Pediatr 152 (Suppl 2): S62, 1993
0068	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT							Female		Normal		Ris-Stalpers et al; Pediatr Res 36: 227, 1994
0348	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT							Female		Normal		Cabral et al; Brazilian J Mol & Biol Res. 31: 775-778, 1998
0353	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT							Female		Normal		Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998
0354	CAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT							Female		Normal		Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998
0069	PAIS	*	Substitut 3	DBD	615		Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT							Male		Ambiguous		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996

WO 03/040366

69

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding Thermolabile			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
						Gln #	Poly Gly #	Poly	Bmax	Kd	k					
0070	PAIS	Substitut 3	DBD	615	Arg ⇒ Pro CGT ⇒ CCT								Male	Ambiguous		Hiort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0445	CAIS	Substitut 3	DBD	615 2206	Arg ⇒ Pro CGT ⇒ CCT				normal high				Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0071	PAIS	Substitut 3	DBD	616 2209	Leu ⇒ Arg CTT ⇒ CGT				normal normal				Female	Ambiguous	pos	De Bellis et al; J Clin Endocrinol Metab. 78:513, 1994
0072	CAIS	Substitut 3	DBD	616 2209	Leu ⇒ Pro CTT ⇒ CCT								Female	Normal		Mebarki et al; 75th US Endo Soc Meeting, Abstr 602,1993
0073	CAIS	Substitut 3	DBD	616 2209	Leu ⇒ Pro CTT ⇒ CCT				normal normal				Female	Normal		Lobaccaro et al; Mol Cell Endocrinol, 5: 137-147, 1996
0074	PAIS	Substitut 3	DBD	617 2212	Arg ⇒ Pro CGG ⇒ CCG				normal normal				Female	Ambiguous	pos	Marcelli et al; J Clin Invest. 87: 1123, 1991
0075	PAIS	Substitut 3	DBD	617 2212	Arg ⇒ Pro CGG ⇒ CCG				normal normal high			Mutation also at 597	Female	Normal		Zoppi et al; Mol Endocrinol 6:409, 1992
0431	Prostate cancer	Substitut 3	DBD	619 2218	Cys ⇒ Tyr TGT ⇒ TAT				low high			Inactive transcription Does not bind DNA somatic mutation	Male	Normal		Nazereth et al; Mol Endocrinol 13: 2065-2075, 1999
0491	Prostate cancer	Substitut 3	DBD	619 2218	Cys ⇒ Tyr TGT ⇒ TAT							Somatic mutation	Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0076	CAIS	Deletion 3-8			⇒ ⇒								Female	Normal		Brown et al, Eur J Pediatr (Suppl 2) 152: S62, 1993
0077	MAIS	Deletion 4	LBD		⇒ ⇒							Azoospermia	Male	Normal	neg	Aiken et al; Am J Obs & Gyn. 165:1891-1894, 1991
0078	CAIS	Deletion 4	LBD		⇒ ⇒							13 nt deletion causing frameshift and stop at codon 783	Female	Normal	pos	Lobaccaro et al; Mol & Cellular Endocrinology 111: 21-8,1995
0306	Prostate cancer	Substitut 4		629 2248	Arg ⇒ Gln CGG ⇒ CAG							1 of 6 of hormone-independent D2 patients- somatic mut	Male	Normal		Wang et al; Japanese J of Urology 88: 550-556 1997

WO 03/040366

70

PCT/FR02/03843

Accession #		Pathogenicity		Exon 1 tracts		Androgen Binding		Sex of rearing		Family history		Reference
		Phenotype	Mutation type	proven Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts Poly Gln # Poly Gly #					
0079	Prostate cancer		Substitut	4	630	Lys ⇒ Thr AAG ⇒ ACG			Male	Normal		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2:277-285, 1996
0400	CAIS		Substitut	4 LBD	2251	Gln ⇒ Stop CAG ⇒ TAG		zero	Female	Normal		Yaegashi et al; Tohoku J of Exp Med 187: 263-272, 1999
0429	CAIS		Substitut	4 LBD	640 2280	Gln ⇒ Stop CAG ⇒ TAG		zero	Female	Normal		Uehara et al; Am J Med Genet. 86: 107-111, 1999
0080	PAIS		Substitut	4 LBD	645 2296	Ala ⇒ Asp GCT ⇒ GAT			Male	Ambiguous		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0334	Normal		Substitut	4 LBD	645 2296	Ala ⇒ Asp GCT ⇒ GAT			Male	Normal		Nordenskjold et al; Human Mutation. 11: 339, 1998
0081	Prostate cancer		Substitut	4 LBD	647 2302	Ser ⇒ Asn AGC ⇒ AAC			Male	Normal		Taplin et al; New England J Med 332:1393-1398, 1995
0555	PAIS		Substitut	4 LBD	653 2319	Glu ⇒ Lys GAG ⇒ AAG	20		Male	Ambiguous		Lundberg et al; J Clin Endocrinol & Metab 87: 2023-2028, 2002
0517	CAIS		Substitut	4 LBD	657 2231	Gln ⇒ Stop CAG ⇒ TAG			Female	Normal		Chavez et al; Clin Genet 59:: 185-188, 2001
0082	PAIS		Substitut	4 LBD	664 2353	Ile ⇒ Asn ATT ⇒ AAT	22	low				Pinsky et al; Clin Inv Med 15: 456, 1992
0083	Prostate cancer		Substitut	4 LBD	670 2371	Gln ⇒ Arg CAG ⇒ CGG			Male	Normal		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2: 277-285, 1996
0084	PAIS		Substitut	4 LBD	671 2374	Pro ⇒ His CCC ⇒ CAC			Male	Ambiguous		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0085	Prostate cancer		Substitut	4 LBD	672 2377	Ile ⇒ Thr ATC ⇒ ACC			Male	Normal		Tilley et al; Clinical Cancer Res. 2: 277-285, 1996
0086	CAIS		Substitut	4 LBD	677 2392	Leu ⇒ Pro CTG ⇒ CCG		zero	Female	Normal	pos	Belsham et al; Human Mutation 5: 28-33, 1995

WO 03/040366

71

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Pathogenicity		Mutation type	Exon	CpG Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
		proven	Domain	hot spot	Base	Base	Amino acid	Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d					
0087	CAIS		Substitut 4	LBD	681		Glu ⇒ Lys GAG ⇒ AAG						Female	Normal		Hjort et al; J Clin Endocrinol Metab 77: 262-266, 1993
0394	CAIS		Substitut 4	LBD	2403		Glu ⇒ Lys GAG ⇒ AAG					Germ cell tumour in undescended testis	Female	Normal		Chen et al; Human Reproduction 14: 664-670, 1999
0534	PAIS		Substitut 4	LBD	682		Pro ⇒ Thr CCA ⇒ ACA			low			Female	Ambiguous		Chavez et al; J Hum Genet 46: 560-565, 2001
0089	Prostate cancer		Substitut 4	LBD	683		Gly ⇒ Ala GGT ⇒ GCT					Somatic mutation - transactivation normal	Male	Normal		Koivisto et al; Cancer Research 57: 314-319, 1997
0090	CAIS		Substitut 4	LBD	684		Val ⇒ Ile GTA ⇒ ATA			zero			Female	Normal		Mebaraki et al; 75th US Endo Soc Meeting, Abstr 602, 1993
0091	PAIS		Substitut 4	LBD	686		Cys ⇒ Arg TGT ⇒ CGT						Male	Ambiguous		Hjort et al; Am J Med Genet 63: 218-222, 1996
0092	PAIS		Substitut 4	LBD	687		Ala ⇒ Val GCT ⇒ GTT						Male	Ambiguous		Hjort et al; Am J Med Genet 63: 218-222, 1996
0093	CAIS		Substitut 4	LBD	688		Gly ⇒ Glu GGA ⇒					de novo mutation	Female	Normal	neg	Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998
0446	CAIS		Substitut 4	LBD	688		Gly ⇒ Stop GGA ⇒ TGA			zero			Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0094	PAIS		Deletion 4	LBD	690		Asp ⇒ 0 ACG ⇒ 0									Schwartz et al; Horm Res 41:117 Abstr 244, 1994
0095	CAIS		Deletion 4	LBD	692		Asn ⇒ 0 AAC ⇒ 0			normal high		* Three nucleotide deletion	Female	Normal		Batch et al; Hum Mol Genet 1:497, 1992
0096	CAIS		Substitut 4	LBD	695		Asp ⇒ His GAC ⇒ CAC			low			Female	Normal	neg	Ris-Stalpers et al; Mol Endocrinol 5:1562, 1991
0097	CAIS		Substitut 4	LBD	695		Asp ⇒ Asn GAC ⇒ AAC			normal normal high		mutation found in two unrelated families	Female	Normal	pos	Ris-Stalpers et al; Mol Endocrinol 5:1562, 1991

WO 03/040366

72

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Exon Domain	CpG position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts Poly Gln # Poly Gly #	Androgen Binding			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
							Bmax	Kd	Thermolabile k					
0098	PAIS	Substituted	4 LBD	* 695 2445	Asp ⇒ Asn GAC ⇒ AAC				de novo mutation	Female	Ambiguous		Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998	
0335	CAIS	Substituted	4 LBD	695 2446	Asp ⇒ Val GAC ⇒ GTC	21			mutation found in two siblings	Female	Normal	pos	Dork et al; Human Mutation 11: 337-339, 1998	
0447	CAIS	Substituted	4 LBD	700 2460	Leu ⇒ Met TTG ⇒ ATG					Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000	
0448	CAIS	Substituted	4 LBD	701 2463	Leu ⇒ Phe CTC ⇒ TTC					Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000	
0518	PAIS	Substituted	4 LBD	701 2463	Leu ⇒ Ile CTC ⇒ ATC								Chavez et al; Clin Genet 59:: 185-188, 2001	
0099	Prostate cancer	Substituted	4 LBD	701 2464	Leu ⇒ His CTC ⇒ CAC				Somatic mutation	Male	Normal		Suzuki et al; J Steroid Biochem Molec Biol 46:759, 1993	
0326	Prostate cancer	Substituted	4 LBD	701 2464	Leu ⇒ His CTC ⇒ CAC				Somatic mutation	Male	Normal		Watanabe et al; Jpn J Clin Oncol 27: 389-393, 1997	
0408	MDA PCa-Za	Substituted	4 LBD	701 2464	Leu ⇒ His CTC ⇒ CAC			normal low	Som. mut. Prostate cancer cell line. Also has Thr877Ala	Male	Normal		Zao et al; J of Urology 162: 2192-2199, 1999	
0100	CAIS	Substituted	4 LBD	702 2466	Ser ⇒ Ala TCT ⇒ GCT			zero		Female	Normal		Pinsky et al; Clin Inv Med 15:456, 1992	
0101	PAIS	Substituted	4 LBD	* 703 2469	Ser ⇒ Gly AGC ⇒ GGC			low high		Male	Ambiguous		Radnayr et al; J of Urology 158: 1553-1556, 1997	
0449	CAIS	Substituted	4 LBD	* 703 2469	Ser ⇒ Gly AGC ⇒ GGC					Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000	
0559	CAIS	Substituted	4 LBD	705 2475	Asn ⇒ Tyr AAT ⇒ TAT				Sister a carrier	Female	Normal		Sills et al; Int J Mol Med 9: 45-48, 2002	
0102	CAIS	Substituted	4 LBD	705 2476	Asn ⇒ Ser AAT ⇒ AGT			zero		Female	Normal		Pinsky et al; Clin Inv Med 15:456, 1992	

WO 03/040366

73

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Pathogenicity		Mutation type	Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
		proven	Exon					Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd					
0103	CAIS		Substitut 4	LBD		705	Asn ⇒ Ser AAT ⇒ AGT			zero			Female	Normal		DeBellis et al; Mol Endocrinol 6:1909-20, 1992
0104	CAIS		Substitut 4	LBD		2476	Asn ⇒ Ser AAT ⇒ AGT					Mutation found in two unrelated families	Female	Normal		Quigley et al; Endocrine Reviews 16: 271, 1995
0482	PAIS		Substitut 4	LBD		705	Asn ⇒ Ser AAT ⇒ AGT				normal high					Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0105	CAIS	*	Substitut 4	LBD		707	Leu ⇒ Arg CTG ⇒ CCG						Female	Normal		Lumbroso et al; J Clin Endo & Metab 81: 1984-1988, 1996
0106	PAIS		Substitut 4	LBD		708	Gly ⇒ Ala GGA ⇒ GCA						Male	Ambiguous		Hjort et al; Hum Mol Genet 3: 1163-1166 1994
0314	PAIS		Substitut 4	LBD		708	Gly ⇒ Ala GGA ⇒ GCA					Severe hypospadias	Male	Ambiguous		Albers et al; J of Pediatrics 131: 388-392, 1997
0107	CAIS		Substitut 4	LBD		708	Gly ⇒ Val GGA ⇒ GTA			zero			Male	Ambiguous	pos	Auchus et al; 77th US Endo Soc Meeting, Abstr P1-508 1995
0450	CAIS		Substitut 4	LBD		710	Arg ⇒ Thr AGA ⇒ ACA			zero			Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0525	PAIS	*	Substitut 4	LBD		711	Gln ⇒ Glu CAG ⇒ GAG			v low		altered AR specificity 2x increased affinity for E2.	Female	Ambiguous	pos	Lumbroso et al. 83rd US Endo Soc Meeting, Abstr P2-29, 2001
0535	PAIS	*	Substitut 4	LBD		711	Gln ⇒ Glu CAG ⇒ GAG			normal			Female	Ambiguous	pos	Chavez et al; J Hum Genet. 46: 560-565, 2001
0108	PAIS	*	Substitut 4	LBD		712	Leu ⇒ Phe CTT ⇒ GTT			normal high		Phenotypic diversity brother of 505 & 506 Testost-induced norm.	Male	Ambiguous	pos	Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0505	PAIS	*	Substitut 4	LBD		712	Leu ⇒ Phe CTT ⇒ GTT			normal high		Phenotypic diversity brother of 108 & 506 Testost-induced norm.	Male	Ambiguous	pos	Hjort et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 3245-3250, 2000
0506	PAIS	*	Substitut 4	LBD		712	Leu ⇒ Phe CTT ⇒ GTT			normal high		Phenotypic diversity brother of 505 & 108 Testost-induced norm.	Male	Ambiguous	pos	Hjort et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 3245-3250, 2000

Accession #		Pathogenicity proven		CpG Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding			Comments		Sex of rearing		External Genitalia		Family history		Reference	
Phenotype		Mutation type		Exon Domain		spot Base		Amino acid Base		Poly Cln #		Poly Gly #		Bmax		Kd		k				
0507	PAIS	Substitut	4	*	LBD	712		Leu⇒Phe <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> ⇒ <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u>					normal high	Phenotypic diversity uncle of 108,505,506 Testost-induced norm.	Male	Ambiguous	pos	Hjort et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 3245-3250, 2000				
0109	Prostate cancer	Substitut	4	*	LBD	715 2507		Val⇒Met <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> ⇒ <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u>					normal	Somatic mutation. Receptor showed a gain in function	Male	Normal		Culig et al; Mol Endocrinol 7:1541-1550 1993				
0110	Prostate cancer	Substitut	4	*	LBD	715 2507		Val⇒Met <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> ⇒ <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u>					normal	Somatic mutation. Receptor showed a gain in function	Male	Normal		Bubley et al 87th Am Assoc Cancer Res Meet Abstr. 1680, 1996				
0111	CAIS	Substitut	4		LBD	718 2516		Trp⇒Stop <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> ⇒ <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u>					zero		Female	Normal	pos	Sai et al; Am J Hum Genet 46:1095, 1990				
0112	Prostate cancer	Substitut	4		LBD	720 2520		Lys⇒Glu <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> ⇒ <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u>						Somatic mutation- Bone metastases of Prostate cancer	Male	Normal		Kleinerman et al; J of Urology 155: 624A, 1996				
0113	Prostate cancer	Substitut	4		LBD	721 2523		Ala⇒Thr <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> ⇒ <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u>						Somatic mutation in 20% of isolates in initial cloning	Male	Normal		Taplin et al; New England J Med 332: 1393-1398, 1995				
0114	CAIS	Substitut	4		LBD	722 2526		Leu⇒Phe <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> ⇒							Female	Normal		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996				
0451	CAIS	Substitut	4		LBD	723 2529		Pro⇒Ser <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> ⇒ <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u>					normal high		Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000				
0452	CAIS	Substitut	4		LBD	724 2532		Gly⇒Ser <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> ⇒ <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u>					zero		Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000				
0453	CAIS	Substitut	4		LBD	724 2533		Gly⇒Asp <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> ⇒ <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u>					zero		Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000				
0115	CAIS	Deletion	4-8		LBD			⇒ ⇒					zero		Female	Normal		Brown et al; Proc Natl Acad Sci 85:8151, 1988				
0116	CAIS	Deletion	5		LBD			⇒ ⇒					zero	Affected aunt deleted for exons 6 and 7 only.	Female	Normal	pos	Maclean et al; J Clin Invest, 91:1123, 1993				
0117	CAIS	Substitut	5		LBD			Tyr⇒Arg ⇒					zero		Female	Normal		Marcelli et al; 74th US Endo Soc Meetings: Abstr. 224, 1992				

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		CpG Position spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			proven Exon	Domain			Poly Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d					
0118	PAIS	Substituted	5	LBD	725	Phe ⇒ Leu TTC ⇒ CTC			normal	normal					Quigley et al; Endocrin Reviews 16: 271, 1995
0391	PAIS	Substituted	5	LBD	2535	Phe ⇒ Leu TTC ⇒ CTC						Male	Ambiguous	pos	Nordenskjold et al Urological Res, 27: 49-55, 1999
0119	Prostate cancer	Substituted	5	LBD	726 2539	Arg ⇒ Leu CGC ⇒ CTC	*		normal	normal		Male	Normal	pos	Elo et al : J Clin Endocrinol Metab, 80: 3494-3500, 1995
0508	Prostate cancer	Substituted	5	LBD	726 2539	Arg ⇒ Leu CGC ⇒ CTC	*					Male	Normal	pos	Mononen et al; Cancer Res 60: 6479-6481, 2000
0120	MAIS	Substituted	5	LBD	727 2543	Asn ⇒ Lys AAC ⇒ AAG						Male	Normal		Yong et al; Lancet, 344: 826-827, 1994
0121	PAIS	Substituted	5	LBD	728 2545	Leu ⇒ Ser TTA ⇒ TCA			low	*					McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0122	Prostate Cancer	Substituted	5	LBD	730 2550	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG	*					Male	Normal		Newmark et al; Proc Natl AcadSci 89:6319, 1992
0123	Prostate Cancer	Substituted	5	LBD	730 2550	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG	*					Male	Normal		Petersiel et al; Int J Cancer 63: 544-550, 1995
0310	CAIS	Substituted	5	LBD	732 2556	Asp ⇒ Asn GAC ⇒ AAC		19				Female	Normal		Ko et al; J Reprod. Med 42: 424-427, 1997
0125	CAIS	Substituted	5	LBD	732 2556	Asp ⇒ Tyr GAC ⇒ TAC	*			high		Female	Normal		Brown et al; 74th US Endo Soc Meeting, Abstr 1506, 1992
0126	CAIS	Substituted	5	LBD	732 2556	Asp ⇒ Tyr GAC ⇒ TAC			zero			Female	Normal		Pinsky et al; Clin Inv Med 15:456, 1992
0127	CAIS	Substituted	5	LBD	732 2556	Asp ⇒ Tyr GAC ⇒ TAC						Female	Normal		Ghirri and Brown; Pediatr Res 33: Abstr 95, 1993
0124	CAIS	Substituted	5	LBD	732 2556	Asp ⇒ Asn GAC ⇒ AAC				high		Female	Normal		Brown et al; 74th US Endo Soc Meeting, Abstr 1506, 1992

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

76

Accession #	Phenotype	Mutation type	Substituted Exon	Proven Exon Domain	CpG Position hot spot	Amino acid Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts		Androgen Binding			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
								Poly Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile k					
0128	PAIS	Substituted	5	LBD	733	Gln ⇒ His CAG ⇒ CAT					low		This patient was a mosaic for wt. & mut. alleles- de novo mut.	Female	Ambiguous	neg	Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998
0129	PAIS	Substituted	5	LBD	737	Ile ⇒ Thr ATT ⇒ ACT											Quigley et al; Endocrin Reviews 16: 271, 1995
0530	CAIS	Substituted	5	LBD	739	Tyr ⇒ Asp TAC ⇒ GAC					zero		no transactivation in COS-1 cells	Female	Normal		Suzuki et al. Int. J Andrology 24: 183-188, 2001
0130	CAIS	Substituted	5	LBD	741	Trp ⇒ Arg TGG ⇒ CGG					low			Female	Normal	neg	Marcelli et al; J Clin Invest 94: 1642-1650, 1994
0360	Prostate cancer	Substituted	5	LBD	741	Trp ⇒ Stop TGG ⇒ TAG							Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0552	Prostate cancer	Substituted	5	LBD	741	Trp ⇒ Cys TGG ⇒ TGG							Treated with bicalutamide - somatic mutation	Male	Normal		Taplin et al; 37th meeting ASCO 20: Abstr. 1738
0131	PAIS	Substituted	5	LBD	742	Met ⇒ Val ATG ⇒ GTG						high					Ris-Stalpers et al; Pediatric Res. 36: 227 -234,1994
0341	PAIS	Substituted	5	LBD	742	Met ⇒ Val ATG ⇒ GTG										pos	Melo et al; 80th US Endo Soc Meeting Abstr P2-44, 1998
0132	PAIS	Substituted	5	LBD	742	Met ⇒ Ile ATG ⇒ ATA					normal high	*		Female	Ambiguous		Batch et al; Hum Mol Genet 1:497, 1992
0519	CAIS	Substituted	5	LBD	743	Gly ⇒ Arg GGG ⇒ CGG								Female	Normal		Chavez et al; Clin Genet 59:: 185-188, 2001
0133	PAIS	Substituted	5	LBD	743	Gly ⇒ Val GGG ⇒ GTG					low	high	Transcription only at high conc of androgen	Female	Ambiguous		Georget et al; J Clin Endocrinol & Metab 83: 3597-3603, 1998
0134	PAIS	Substituted	5	LBD	743	Gly ⇒ Val GGG ⇒ GTG					normal normal	*					Nakao et al; J Clin Endocrinol Metab 77:103-107, 1993
0414	CAIS	Substituted	5	LBD	743	Gly ⇒ Val GGG ⇒ GTG					zero		de novo mutation	Female	Normal		Lobaccaro et al; J Steroid Biochem & Mol Biol. 44: 211-216, 1993

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven		CpG spot	Position	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			Exon	Domain	hot	Amino acid spot	Base	Poly Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d					
0536	CAIS	Substitut	5	LBD		743	Gly ⇒ Glu CGG ⇒ GAG			normal			Female	Normal		Chavez et al; J Hum Genet. 46: 560-56, 2001
0361	Prostate cancer	Deletion	5	LBD		2590						Frameshift-somatic mut.- separate tumor in same indiv. as 0362	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0135	CAIS	Substitut	5	LBD		744	Leu ⇒ Phe CTC ⇒ TTC									Brinkmann et al; J Steroid Biochem & Mol Biol 53: 443, 1995
0362	Prostate cancer	Substitut	5	LBD		744	Leu ⇒ Phe CTC ⇒ TTC					Somatic mutation - separate tumor in same indiv. as 0361	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0136	PAIS	Substitut	5	LBD		745	Met ⇒ Thr ATG ⇒ ACG			zero						Ris-Stalpers et al; Pediatric Res 36: 227-234, 1994
0137	PAIS	Substitut	5	LBD		746	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG									Brown et al; 74th US Endo Soc Meeting, Abstr 1506, 1992
0138	PAIS	Substitut	5	LBD		746	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG						Male	Ambiguous		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0492	Prostate cancer	Substitut	5	LBD		748	Ala ⇒ Thr GCC ⇒ ACC					Also Ser865Pro; Gln867Stop and Gln919Arg ;Som mut	Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0139	PAIS	Substitut	5	LBD	*	748	Ala ⇒ Asp GCC ⇒ GAC			low	high	Abnormal dissociation				Marcelli et al; J Clin Invest 94: 1642-1650, 1994
0363	Prostate cancer	Substitut	5	LBD		748	Ala ⇒ Val GCC ⇒ GTC					Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0140	CAIS	Substitut	5	LBD		749	Met ⇒ Val ATG ⇒ GTG						Female	Normal	pos	DeBellis et al; Mol Endocrinol 6:1909-20, 1992
0141	CAIS	Substitut	5	LBD		749	Met ⇒ Val ATG ⇒ GTG						Female	Normal	pos	Jakubiczka et al; Hum Genet 90:311-2, 1992
0483	PAIS	Substitut	5	LBD		749	Met ⇒ Val ATG ⇒ GTG			normal high						Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000

Accession #			Pathogenicity		CpG Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding			Sex of rearing		Family history	
Phenotype	Mutation	Exon	proven	hot spot	Amino acid	Base	Amino acid	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile	Comments	Sex of rearing	External genitalia	Family history	Reference
	type	Domain			Base												
0364	Prostate cancer	Substitut 5			749	Met⇒Ile							Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
		LBD			2609	ATG⇒ATA											
0365	Prostate cancer	Substitut 5			750	Gly⇒Ser							Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
		LBD			2610	GGC⇒AGC											
0142	CAIS	Substitut 5	*		750	Gly⇒Asp							Mutation found in two unrelated patients	Female	Normal		Bevan et al; J Steroid Biochem Molec. Biol 61: 19-26, 1997
		LBD			2611	GGC⇒GAC											
0143	CAIS	Substitut 5			750	Gly⇒Asp								Female	Normal		Brown et al; 74th US Endo Soc Meeting Abstr 1506, 1992
		LBD			2611	GGC⇒GAC											
0144	CAIS	Substitut 5			751	Trp⇒Arg								Female	Normal		Brinkmann et al; J Steroid Biochem Mol Biol 53: 443, 1995
		LBD			2613	TGG⇒AGG											
0366	Prostate cancer	Substitut 5			751	Trp⇒Stop							Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
		LBD			2614	TGG⇒TAG											
0367	Prostate cancer	Substitut 5			751	Trp⇒Stop							Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
		LBD			2614	TGG⇒TAG											
0368	Prostate cancer	Substitut 5			751	Trp⇒Stop							Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
		LBD			2615	TGG⇒TGA											
0401	CAIS	Substitut 5			751	Trp⇒Stop								Female	Normal		Yaegashi et al; Tohoku J of Exp Med 187: 263-272, 1999
		LBD			2615	TGG⇒TGA											
0145	CAIS	Substitut 5	*		752	Arg⇒Stop								Female	Normal		Pinsky et al; Clin Inv Med 15:456, 1992
		LBD			2616	CGA⇒TGA											
0146	CAIS	Substitut 5	*		752	Arg⇒Stop								Female	Normal		Brinkmann et al; J Steroid Biochem Mol Biol 53: 443, 1995
		LBD			2616	CGA⇒TGA											
0342	CAIS	Substitut 5	*		752	Arg⇒Stop							In two different families	Female	Normal		Melo et al; 80th US Endo Soc Meeting Abstr P2-44, 1998
		LBD			2616	CGA⇒TGA											
0402	CAIS	Substitut 5	*		752	Arg⇒Stop								Female	Normal		Yaegashi et al; Tohoku J of Exp Med 187: 263-272, 1999
		LBD			2616	CGA⇒TGA											

WO 03/040366

79

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven	Exon	CpG Position	Change	Exon 1 tracts			Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
							Base	Amino acid	Poly	Gln #	Poly	Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile	
0147	CAIS	Substitut 5	LBD	*	752	Arg ⇒ Gln	CGA ⇒ CAA					zero				Brown et al; 74th US Endo Soc Meeting, Abstr 1506, 1992
0148	CAIS	Substitut 5	LBD	*	752	Arg ⇒ Gln	CGA ⇒ CAA					zero				Evans; J Endocrinol 135 Suppl, Abstr P26, 1992
0333	CAIS	Substitut 5	LBD	*	752	Arg ⇒ Gln	CGA ⇒ CAA								pos	Komori et al; Arch Gynecol & Obstetrics 261: 95-100, 1998
0349	CAIS	Substitut 5	LBD	*	752	Arg ⇒ Gln	CGA ⇒ CAA									Cabral et al; Brazilian J Med & Biol Res. 31: 775-758, 1998
0497	CAIS	Substitut 5	LBD	*	752	Arg ⇒ Gln	CGA ⇒ CAA									Sakai et al; International J of Urology 7: 390-392, 2000
0149	CAIS	Substitut 5	LBD		754	Phe ⇒ Val	TTC ⇒ GTC					zero				Lobaccaro et al; Hum Mol Genet 2:1041-1043, 1993
0150	CAIS	Substitut 5	LBD		754	Phe ⇒ Val	TTC ⇒ GTC									Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0369	Prostate cancer	Substitut 5	LBD		754	Phe ⇒ Leu	TTC ⇒ CTC									Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0151	PAIS	Substitut 5	LBD		754	Phe ⇒ Leu	TTC ⇒ TTA									Hjort et al; Hum Mol Genet 3: 1163-1166 1994
0152	PAIS	Substitut 5	LBD	*	754	Phe ⇒ Leu	TTC ⇒ TTA					normal high				Weidemann et al; Clin Endocrinology 45: 733-739, 1996
0370	Prostate cancer	Substitut 5	LBD		755	Thr ⇒ Ala	ACC ⇒ GCC									Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0153	PAIS	Substitut 5	LBD		756	Asn ⇒ Ser	AAT ⇒ AGT									Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0532	MAIS	Substitut 5	LBD	*	756	Asn ⇒ Ser	AAT ⇒ AGT					high				Giwerzman et al. Clin Endocrinol 54: 827-834, 2001

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

80

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven		CpG spot	Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External genitalia	Family history	Reference
			Exon	Domain	hot	Amino acid	Amino acid	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd					
0300	Prostate cancer	Substituted	5	LBD	*	757	Val ⇒ Ala GTC ⇒ GCC					Binds R1881 norm.- transcriptionally inactive- Som mut	Male	Normal		James et al; 79th US Endo Soc Meeting, Abstr P2-484, 1997
0493	Prostate cancer	Substituted	5	LBD		757	Val ⇒ Ala GTC ⇒ GCC					Somatic mutation	Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0346	PAIS	Substituted	5	LBD	*	758	Asn ⇒ Thr AAC ⇒ ACC			normal	high	* 50% reduction in transactivation in COS-7				Yong et al; Mol & Cell Endocrinol. 137: 41-50, 1998
0371	Prostate cancer	Substituted	5	LBD		759	Ser ⇒ Pro TCC ⇒ CCC					Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0154	CAIS	Substituted	5	LBD		759	Ser ⇒ Phe TCC ⇒ TTC			zero			Female	Normal		DeBellis et al; Mol Endocrinol, 6:1909-20, 1992
0155	CAIS	Substituted	5	LBD		762	Leu ⇒ Phe CTC ⇒ TTC			zero			Female	Normal		Brown et al; 74th US Endo Soc Meeting, Abstr 1506, 1992
0156	CAIS	Substituted	5	LBD	*	762	Leu ⇒ Phe CTC ⇒ TTC			zero			Female	Normal		Bevan et al; J Steroid Biochem Molec. Biol 61: 19-26, 1997
0157	CAIS	Substituted	5	LBD		763	Tyr ⇒ His TAC ⇒ CAC						Female	Normal		Quigley et al; Endocrin. Reviews, 16:271, 1995
0158	PAIS	Substituted	5	LBD	*	763	Tyr ⇒ Cys TAC ⇒ TGC	12		normal high		* PolyGln tract short (only 12 repeats)	Male	Ambiguous	pos	McPhaul et al; J Clin Inv 87:1413,1991;Batch&al Arc Dis Ch 68:453
0159	PAIS	Substituted	5	LBD		763	Tyr ⇒ Cys TAC ⇒ TGC			low			Male	Ambiguous		Morono et al; Human Mutation 6: 152-162, 1995
0405	PAIS	Substituted	5	LBD		763	Tyr ⇒ Cys TAC ⇒ TGC						Male	Ambiguous		Batch et al; Arch Disease Child 68: 453, 1993
0484	PAIS	Substituted	5	LBD		763	Tyr ⇒ Cys TAC ⇒ TGC			normal high						Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0485	PAIS	Substituted	5	LBD		763	Tyr ⇒ Cys TAC ⇒ TGC			normal high						Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000

WO 03/040366

81

PCT/FR02/03843

Accession #		Pathogenicity		Exon 1 tracts		Androgen Binding		Sex of External		Family	
Phenotype	Mutation	proven	CpG Position	Change	Amino acid	Base	Thermolabile	Comments	rearing	Genitalia	history
		Exon	hot spot				Kd				Reference
		Domain	Base				Bmax				
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base								
			Base		</						

WO 03/040366

82

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		CpG Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External genitalia	Family history	Reference
			proven	Exon Domain	hot spot Base	Amino acid Base	Poly Gln #	Poly Gly #	Bmar	Kd					
0520	PAIS	Substitut	5	LBD	765	Ala ⇒ Ser GCC ⇒ TCC			zero						Chavez et al; Clin Genet 59: 185-188, 2001
0167	CAIS	Substitut	5	LBD	765	Ala ⇒ Val GCC ⇒ GTC	20					Female	Normal		Pinsky et al; Clin Inv Med, 15:456, 1992
0168	CAIS	Substitut	5	LBD	766	Pro ⇒ Ser CCT ⇒ TCT			low	high		Female	Normal	pos	Marcelli et al; J Clin Invest 94: 1642-1650, 1994
0457	CAIS	Substitut	5	LBD	766	Pro ⇒ Ser CCT ⇒ TCT						Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0543	CAIS	Substitut	5	LBD	766	Pro ⇒ Ala CCT ⇒ ATG			normal high			Female	Normal		Boehmer et al; J Clin Endocrinol & Metab 86: 4151-4160, 2001
0169	CAIS	Deletion	5	LBD	766	Pro ⇒ Pro CCAT ⇒ CCG					Single nt. deletion causing frameshift & stop in Codon 807	Female	Normal	pos	Baldazzi et al; Hum Mol Genet 3:1169-1170, 1994
0388	CAIS	Deletion	5	LBD	766	Pro ⇒ Pro CCAT ⇒ CCG					Single nt. deletion causing frameshift & stop in Codon 807	Female	Normal		Chung et al; Molecules & Cells 8: 741-745, 1998
0458	CAIS	Deletion	5	LBD	766	Pro ⇒ Pro CCAT ⇒ CCG					Single nt. deletion causing frameshift & stop in Codon 807	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0459	CAIS	Deletion	5	LBD	766	Pro ⇒ Pro CCAT ⇒ CCG					Single nt. deletion causing frameshift & stop in Codon 807	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0561	CAIS	Deletion	5	LBD	766	Pro ⇒ Pro CCAT ⇒ CCG					Single nt. del framhifft & stop in Codon 807 in 2 unrelated individs	Female	Normal		Guillen et al; An Esp Pediatr 56: 341-352, 2002
0170	CAIS	Substitut	5	LBD	767	Asp ⇒ Glu GAT ⇒ GAG			v low			Female	Normal		Lobaccaro et al; Pediatr Res, 33: Abstr 115, 1993
0343	CAIS	Substitut	5	LBD	767	Asp ⇒ Glu GAT ⇒ GAG						Female	Normal		Melo et al; 80th US Endo Soc Meeting Abstr P2-44, 1998
0544	PAIS	Substitut	5	LBD	768	Leu ⇒ Met CTG ⇒ ATG			normal high			Female	Ambiguous		Boehmer et al; J Clin Endocrinol & Metab 86: 4151-4160, 2001

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven		CpG position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			Exon	Domain	hot spot	Amino acid Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	k					
0460	CAIS	Substituted	5	LBD		Leu ⇒ Pro CTG ⇒ CCG	768						Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0171	PAIS	Substituted	5	LBD		Asn ⇒ His AAT ⇒ CAT	771						Female	Ambiguous		Hjort et al; Hum Mol Genet 3: 1163-1166 1994
0526	PAIS	Substituted	5	LBD	*	Asn ⇒ His AAT ⇒ CAT	771			high		Size & level of expression of AR normal	Female	Ambiguous		Zhu et al, 83rd US Endo Soc Meeting, Abstr P2-34, 2001
0172	CAIS	Substituted	5	LBD		Glu ⇒ Stop GAG ⇒ TAG	772		zero				Female	Normal		Imasaki et al; Endocrine Journal 42: 643-648 1995
0173	PAIS	Substituted	5	LBD		Glu ⇒ Gly GAG ⇒ GGG	772		low	high						Tincello et al; Clinical Endocrinology 46: 497-506, 1997
0174	PAIS	Substituted	5	LBD	*	Glu ⇒ Ala GAG ⇒ GCG	772	25	normal	normal high			Male	Ambiguous		Shkolny et al; J Clin Endocrinol & Metab 84: 805-810, 1999
0336	CAIS	Substituted	6	LBD	*	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC	774	26	normal	normal			Female	Normal		Prior et al; Am J Hum Genet, 51:143, 1992
0176	CAIS	Substituted	6	LBD	*	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC	774	27	zero				Female	Normal	pos	Prior et al; Am J Hum Genet, 51:143, 1992
0177	CAIS	Substituted	6	LBD	*	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC	774		zero				Female	Normal		Mebarki et al; 72nd US Endo Soc Meeting, Abstr 791, 1990
0178	CAIS	Substituted	6	LBD	*	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC	774						Female	Normal		Hjort et al; J Pediatrics 132: 939-943, 1998
0179	CAIS	Substituted	6	LBD	*	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC	774		v low	high			Female	Normal	neg	Marcelli et al; J Clin Endocrinol & Metab 73: 318, 1991
0180	CAIS	Substituted	6	LBD	*	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC	774						Female	Normal		Jakubiczka et al; Human Mutation 9: 57-61, 1997
0331	CAIS	Substituted	6	LBD	*	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC	774						Female	Normal		Komori et al; Arch Gynecol & Obstetrics 261: 95-100, 1998

WO 03/040366

84

PCT/FR02/03843

Pathogenicity			Exon 1 tracts			Androgen Binding			Sex of rearing	External genitalia	Family history	Reference
Accession #	Mutation type	CpG Position	Change	Amino acid	Base	Gln #	Poly Gly #	Thermolabile Kd				
Phenotype	Substituted	Exon Domain	spot	Base	Base	Base	Base	Bmax				
0175 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ Cys	CGC ⇒ TGC		v low	Female	Normal		Brown et al; Mol Endocrinol, 4:1759-72, 1990
0355 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ Cys	CGC ⇒ TGC			Female	Normal	neg	Hjort et al; J Pediatrics 132: 939-943, 1998
0181 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC		normal high	Female	Normal	pos	Prior et al; Am J Hum Genet, 51:143, 1992
0182 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC		low normal	Female	Normal		Batch et al; Hum Mol Genet, 1:497, 1992
0183 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC		v low high	Female	Normal		DeBellis et al; Mol Endocrinol, 6:1909-20, 1992
0184 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC			Female	Normal		Hjort et al; Am J Med Genet, 63: 218-222, 1996
0461 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC		zero	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0462 CAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC			Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0185 PAIS	Substituted	6 LBD	*	774	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC			Female	Normal		Quicley et al; Endocrin Reviews 16: 271, 1995
0186 CAIS	Substituted	6 LBD	*	779	Arg ⇒ Trp	CGG ⇒ TGG			Female	Normal		Hjort et al; Hum Mol Genet 3: 1163-1166 1994
0187 CAIS	Substituted	6 LBD	*	779	Arg ⇒ Trp	CGG ⇒ TGG			Female	Normal		Morono et al; Human Mutation 6: 152-162, 1995
0188 CAIS	Substituted	6 LBD	*	779	Arg ⇒ Trp	CGG ⇒ TGG			Female	Normal		Sinnecker et al; Eur J. Pediatr. 156: 7-14, 1997
0463 CAIS	Substituted	6 LBD	*	779	Arg ⇒ Trp	CGG ⇒ TGG			Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

85

Accession #		Phenotype		Mutation type		Pathogenicity proven		CpG Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments		Sex of rearing		External Genitalia		Family history		Reference	
																				</					

WO 03/040366

86

PCT/FR02/03843

Accession #		Pathogenicity		Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments		Sex of External rearing Genitalia		Family history		Reference
		Phenotype	Mutation type	Substituted	CpG Position	Change	Amino acid							
					spot	Base	Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile		
0197	MAIS		Substituted	6	790	Leu ⇒ Phe	CTC ⇒ TTC			normal low	*			Tsakada et al; J Clin Endocrinol Metab, 79:1202, 1994
0198	MAIS		Substituted	6	2730	Glu ⇒ Asp	GAG ⇒ GAC			normal normal				Pinsky et al; Clin Inv Med, 15:456, 1992
0397	Normal		Substituted	6	793	Glu ⇒ Asp	GAG ⇒ GAC							Macke et al; Am J Human Genetics 53: 844-852, 1993
0199	CAIS		Substituted	6	2741	Phe ⇒ Ser	TTT ⇒ TCT							Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0200	CAIS		Substituted	6	2743	Phe ⇒ Ser	TTT ⇒ TCT							Jakubiczka et al Human Mutation 9: 57-61, 1997
0201	CAIS		Substituted	6	794	Trp ⇒ Stop	TGG ⇒ TGA			v low				Marcelli at al; J Clin Invest 85: 1522, 1990
0202	PAIS		Substituted	6	2750	Gln ⇒ Glu	CAA ⇒ GAA			normal normal	*			Bevan et al; Hum Mol Genet, 5: 265-273, 1996
0203	PAIS		Substituted	6	2754	Gln ⇒ Glu	CAA ⇒ GAA			normal normal				Quigley et al; Endocrine Reviews 16: 271, 1995
0204	PAIS		Substituted	6	798	Gln ⇒ Glu	CAA ⇒ GAA							Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0205	Prostate cancer		Substituted	6	2754	Gln ⇒ Glu	CAA ⇒ GAA							Evans et al; Prostate 28: 162-171, 1996
0399	Prostate cancer		Substituted	6	798	Gln ⇒ Glu	CAA ⇒ GAA							Castagnaro et al; Verh. Dtsch. Ges. Path. 77: 119-123, 1993
0340	MAIS		Substituted	6	2754	Gln ⇒ Glu	CAA ⇒ GAA			normal				Hjort et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 2810-2815, 2000
0381	MAIS		Substituted	6	798	Gln ⇒ Glu	CAA ⇒ GAA			normal				Wang et al; J Clin Endocrinol & Metab 83: 4303-4309, 1998

WO 03/040366

87

PCT/FR02/03843

Accession #		Phenotype		Mutation		Pathogenicity proven		CpG Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments		Sex of rearing		External genitalia		Family history		Reference
												hot spot	Base	Amino acid	Base									
0542	CAIS	Deletion	6	LBD				800	2762	Thr ⇒ Thr	ACAC ⇒ ACC						Single nt. deletion causing frameshift & stop in codon 807	Female	Normal		Boehmer et al; J Clin Endocrinol & Metab 86: 4151-4160, 2001			
0521	PAIS	Substitut	6	LBD				802	2767	Gln ⇒ Arg	CGG ⇒ CCG													
0498	CAIS	Substitut	6	LBD				803	2769	Glu ⇒ Lys	GAA ⇒ AAA				zero	zero		Female	Normal	pos	Sawai et al. J Hum Genet 45: 342-345, 2000			
0206	PAIS	Substitut	6	LBD				806	2779	Cys ⇒ Tyr	TGC ⇒ TAC													
0207	CAIS	Substitut	6	LBD	*			807	2781	Met ⇒ Val	ATG ⇒ GTG				low			Female	Normal		Morono et al; Human Mutation 6: 152-162, 1995			
0208	CAIS	Substitut	6	LBD				807	2782	Met ⇒ Arg	ATG ⇒ AGG				zero			Female	Normal		Adeyemo et al; Hum Mol Genet, 2:1809, 1993			
0428	PAIS	Substitut	6	LBD	*			807	2782	Met ⇒ Thr	ATG ⇒ ACG				low		Treatment with topical DHT restored male genital development	Female	Ambiguous		Ong et al; Lancet 354: 1444-1445, 1999			
0403	PAIS	Substitut	6	LBD				812	2796	Leu ⇒ Phe	CTC ⇒ TTC							Female	Normal		Yaegashi et al; Tohoku J of Exp Med 187: 263-272, 1999			
0209	PAIS	Substitut	6	LBD				814	2803	Ser ⇒ Asn	AGC ⇒ AAC	20			normal		Hormone binding specificity altered.	Female	Ambiguous		Pinsky et al; Clin Inv Med, 15:456, 1992			
0210	MAIS	Substitut	6	LBD				814	2803	Ser ⇒ Asn	AGC ⇒ AAC	20			normal		Hormone binding specificity altered	Male	Normal	pos	Pinsky et al; Clin Inv Med, 15:456, 1992			
0501	CAIS	Substitut	7	LBD				819	2818	Asp ⇒ Gln	GAT ⇒ GGT							Female	Normal		Choi et al; Arch Gynecol Obstet 263: 201-205, 200			
0211	CAIS	Substitut	7	LBD	*			820	2821	Gly ⇒ Ala	GGG ⇒ GCG				normal high		* Also Leu 257 Pro, enhances thermolability	Female	Ambiguous	neg	Tanaka et al; Gynecological Endo. 12: 75-82, 1998			
0212	PAIS	Substitut	7	LBD				821	2823	Leu ⇒ Val	CTG ⇒ GTG	24	23		normal normal						Pinsky et al; Clin Inv Med, 15:456, 1992			

WO 03/040366

88

PCT/FR02/03843

Pathogenicity			Exon 1 tracts			Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
Accession #	Mutation type	CpG Position Exon Domain hot spot	Change Amino acid Base	Poly Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd					
0513 MAIS	Substitut 7 LBD	* 824 2832	Gln ⇒ Lys CAA ⇒ AAA					Gynocomastia-normal fertility -related to 514 abnormal Bmax DHT	Male	Normal	pos	Giwerzman et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 2253-2259, 2000
0514 MAIS	Substitut 7 LBD	* 824 2832	Gln ⇒ Lys CAA ⇒ AAA					Gynocomastia-normal fertility -related to 513 abnormal Bmax DHT	Male	Normal	pos	Giwerzman et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 2253-2259, 2000
0537 CAIS	Substitut 7 LBD	827 2841	Phe ⇒ Val TTT ⇒ GTT						Female	Normal		Chavez et al; J Hum Genet. 46: 560-565, 2001
0522 CAIS	Substitut 7 LBD	830 2850	Leu ⇒ Val CTT ⇒ GTT						Female	Normal		Chavez et al; Clin Genet 59:: 185-188, 2001
0213 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2853	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA			zero			Female	Normal	pos	DeBellis et al; Mol Endocrinol, 6:1909-20, 1992
0214 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2853	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA			zero			Female	Normal		Tincello et al; J Endocrinol, 132 Suppl, Abstr 87, 1992
0215 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2853	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA			zero			Female	Normal		Ris-Stalpers et al; 74th Endo Soc Meeting, 1992
0384 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2853	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA						Female	Normal		Giwerzman et al; Human Genetics 103: 529-531, 1998
0465 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2853	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA						Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0500 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2853	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA						Female	Normal		Choi et al; Arch Gynecol Obstet 263: 201-205, 2000
0515 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2853	Arg ⇒ Stop CGA ⇒ TGA					Harmatoma found in pubertal patient	Female	Normal		Chen et al; Fertility & Sterility 74: 182-183, 2000
0466 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2854	Arg ⇒ Gln CGA ⇒ CAA						Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0499 CAIS	Substitut 7 LBD	* 831 2854	Arg ⇒ Gln CGA ⇒ CAA						Female	Normal		Choi et al; Arch Gynecol Obstet 263: 201-205, 2000

Accession #	Phenotype	Mutation type	Substituted Exon Domain	Pathogenicity proven		CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
				*	*			Poly Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	k					
0216	CAIS	Substituted	7 LBD	*	*	831 2854	Arg⇒Gln CGA⇒CAA			very low				Female	Normal	pos	Brown et al; Mol Endocrinol, 4:1759-72, 1990
0217	CAIS	Substituted	7 LBD	*	*	831 2854	Arg⇒Gln CGA⇒CAA			zero			Found in two unrelated families	Female	Normal		McPhaul et al; J Clin Inv, 90: 2097, 1992
0404	CAIS	Substituted	7 LBD			831 2854	Arg⇒Gln CGA⇒CAA			zero				Female	Normal		Yaegashi et al; Tohoku J of Exp Med 187: 263-272, 1999
0524	CAIS	Substituted	7 LBD			831 2854	Arg⇒Gln CGA⇒CAA			zero			Sertoli cell carcinoma	Female	Normal		Ko et al. Int. J. Gynecol. Pathol. 20: 196-199, 2001
0218	CAIS	Substituted	7 LBD	*	*	831 2854	Arg⇒Leu CGA⇒CTA	21	19	zero				Female	Normal		Shkolny et al; Human Mol Genetics 4: 515-521,1995
0307	CAIS	Substituted	7 LBD	*	*	831 2854	Arg⇒Leu CGA⇒CTA	26	16	zero				Female	Normal		Shkolny et al; Human Mol Genetics 4: 515-521,1995
0219	CAIS	Substituted	7 LBD			834 2863	Tyr⇒Cys TAC⇒TGC			zero				Female	Normal		Wilson et al; J Clin Endocrinol Metab, 75:1474-8, 1992
0392	PAIS	Substituted	7 LBD			838 2876	Leu⇒Leu CTC⇒CTT						Hypospadia and cryptorchidism - silent mutation	Male	Ambiguous		Nordenskjold et al Urological Res, 27: 49-55, 1999
0415	PAIS	Substituted	7 LBD			840 2880	Arg⇒Ser CGT⇒AGT							Male	Ambiguous	pos	Melo et al; Hum Mutat. 14: 353, 1999
0220	PAIS	Substituted	7 LBD	*	*	840 2880	Arg⇒Cys CGT⇒TGT	20	16	normal high	normal	*		Male	Ambiguous	pos	Beitel et al; J Clin Inv, 94: 546-554 1994
0221	PAIS	Substituted	7 LBD	*	*	840 2880	Arg⇒Cys CGT⇒TGT			low	high	*	Found in two unrelated individuals.	Female			McPhaul et al; J Clin Inv, 90: 2097, 1992
0222	PAIS	Substituted	7 LBD	*	*	840 2880	Arg⇒Cys CGT⇒TGT			normal high			Sibling of 0308	Female	Ambiguous	pos	Bevan et al; Hum Mol Genet, 5: 265-273, 1996
0308	PAIS	Substituted	7 LBD	*	*	840 2880	Arg⇒Cys CGT⇒TGT			normal high			Sibling of 0222	Male	Ambiguous	pos	Bevan et al; Hum Mol Genet, 5: 265-273, 1996

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven	Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding Thermolabile			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
							Poly Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	k						
0387	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ Cys CGT ⇒ TGT							Transcriptional activity only at high conc of androgen				Georget et al; J Clin Endocrinol & Metab 83: 3597-3603, 1998
0385	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ Gly CGT ⇒ GGT					low		Reduced transactivation				Giwerzman et al; Human Genetics 103: 529-531, 1998
0337	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT	19				normal high	high	*		Female	pos	Beitel et al; J Clin Inv, 94: 546-554 1994
0224	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT	18	24			normal high	high	*		Female	pos	Beitel et al; J Clin Inv, 94: 546-554 1994
0225	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					high			Found in two unrelated families	Female	pos in 1 fam	Hjort et al; J Clin Endocrinol Metab, 77:262-266, 1993
0226	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					zero						McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0227	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					normal normal		*	In same fam. persons raised as males with ambiguous genitalia	Female	pos	Imasaki et al; Eur J Endocrinol, 130: 569-574, 1994
0228	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					low						Lumbruso et al; Eur J Endocrinol 130: 327, 1994
0229	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					low						Imai et al; Annals of Clinical Biochem, 32: 482-486, 1995
0230	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT											Ghirri & Brown; Pediatr Res 33: Abstr.95, 1993
0231	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					low	high	high				Marcelli et al; J Clin Invest 94: 1642-1650, 1994
0232	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					normal high		*		Female	pos	Weidemann et al; Clin Endocrinology 45: 733 - 739, 1996
0223	PAIS	Substituted	*	7	840	Arg ⇒ His CGT ⇒ CAT					low	high			Female		De Bellis et al; J Clin Endocrinol Metab, 78:513, 1994

WO 03/040366

91

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Pathogenicity		Mutation type	Exon Domain	CpG Position hot spot	Position Amino acid Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
									Gln #	Poly Gly #	Poly	Bmax	Kd					
0233	PAIS	Substitut	7	LBD			841	Ile ⇒ Ser ATC ⇒ AGC							Female	Ambiguous		Hior et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0234	CAIS	Substitut	7	LBD			842	Ile ⇒ Thr ATT ⇒ ACT							Female	Normal	pos	Hior et al; J Clin Endocrinol Metab, 77:262-266, 1993
0235	PAIS	Substitut	7	LBD	*		842	Ile ⇒ Thr ATT ⇒ ACT				low	high	*	Male	Ambiguous	pos	Weidemann et al Clin Endocrinology 45: 733 - 739, 1996
0494	Prostate cancer	Substitut	7	LBD			846	Arg ⇒ Gly AGA ⇒ GGA							Male	Normal		Marcelli et al; Cancer Research 60: 944-949, 2000
0236	CAIS	Insertion	7	LBD			848	Asn ⇒ Lys AAT ⇒ AAA T				zero			Female	Normal		Brinkmann et al; J Steroid Biochem Mol Biol 53: 443, 1995
0467	CAIS	Insertion	7	LBD			848	Asn ⇒ Lys AAT ⇒ AAA T				zero			Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0237	CAIS	Substitut	7	LBD			853	Ser ⇒ Stop TCA ⇒ TGA				zero			Female	Normal		Wilson et al; J Clin Endocrinol Metab, 75:1474-8, 1992
0238	CAIS	Substitut	7	LBD			853	Ser ⇒ Stop TCA ⇒ TGA				zero			Female	Normal		Jakubiczka et al; Human Mutation 9: 57-61, 1997
0239	PAIS	Substitut	7	LBD			854	Arg ⇒ Lys AGA ⇒ AAA				low		*				McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0240	CAIS	Substitut	7	LBD	*		855	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				zero			Female	Normal		DeBellis et al; Mol Endocrinol 6:1909-20, 1992
0241	CAIS	Substitut	7	LBD	*		855	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC							Female	Normal		Tincello et al; J Endocrinol 132 Suppl, Abstr 87, 1992
0242	CAIS	Substitut	7	LBD	*		855	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				zero			Female	Normal		McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0243	CAIS	Substitut	7	LBD	*		855	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC							Female	Normal		Lobocaro et al; Pediat Res 33: Abstr 115, 1993

WO 03/040366

92

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven Exon Domain	CpG Position hot Amino acid spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding Thermolabile			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
						Gln #	Poly Gly #	Poly	Bmax	Kd	k					
0244	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				low				Female	Normal	pos	Morono et al; Human Mutation 6: 152-162. 1995
0245	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				zero				Female	Normal		Sultan et al; J Steroid Biochem & Mol Biol:40:519, 1993
0246	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC								Female	Normal		Brinkmann et al; J Steroid Biochem & Mol Biol 53: 443, 1995
0247	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC								Female	Normal		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222, 1996
0248	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				v low	high			Female	Normal	pos	Malingren et al; Clin Genet. 50:202-205, 1996
0320	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC								Female	Normal		Komori et al; J Obstetrics & Gynecol. Res. 23: 277-81, 1997
0468	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				zero				Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0469	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				normal high				Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0527	CAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ Cys CGC ⇒ TGC				v low	high			Female	Normal		Elhaji et al. 83rd US Endo Soc Meeting, Abstr P2-37, 2001
0528	PAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2925	Arg ⇒ His CGC ⇒ CAC				normal high		*		Male	Ambiguous		Elhaji et al. 83rd US Endo Soc Meeting, Abstr P2-37, 2001
0251	PAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2926	Arg ⇒ His CGC ⇒ CAC				normal high							Chang et al; 73rd Endo Soc Meeting, Abstr 28, 1991
0252	PAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2926	Arg ⇒ His CGC ⇒ CAC				normal high		*	* Severe hypospadias	Male	Ambiguous	pos	Batch et al; Hum Mol Genet. 1:497, 1992
0253	PAIS	Substitut	7 LBD	* 855 2926	Arg ⇒ His CGC ⇒ CAC								Male	Ambiguous		Hjort et al; Am J Med Genet. 63: 218-222. 1996

WO 03/040366

93

PCT/FR02/03843

Accession #		Pathogenicity		CpG Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding			Comments		Sex of External rearing		Family history		Reference	
Phenotype	Mutation	type	Exon	proven	spot	Base	Amino acid	Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile							
0254	PAIS	Substitut	7	*	855	2926	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC			zero				Female	Ambiguous	pos	Weidemann et al; Clin Endocrinology 45: 733 - 739, 1996		
0255	PAIS	Substitut	7	*	855	2926	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC			low	high	norm		Female	Ambiguous		Marcelli et al; J Clin Invest, 94:1642-1650, 1994		
0301	PAIS	Substitut	7	*	855	2926	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC	14					Brother of 0302 somatic & germ-line muts. in mother	Male	Ambiguous	pos	Boehmer et al; Am J Hum Genetics 60: 1003-6, 1997		
0250	PAIS	Substitut	7	*	855	2926	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC			zero				Female	Ambiguous		Weidemann et al; Clin Endocrinology 45: 733-739, 1996		
0302	PAIS	Substitut	7	*	855	2926	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC	14					Sister of 0301. somatic & germ-line muts. in mother	Female	Ambiguous	pos	Boehmer et al; Am J Hum Genetics 60: 1003-6, 1997		
0249	CAIS	Substitut	7	*	855	2926	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC			low				Female	Normal		McPhaul et al; J Clin Invest. 90: 2097, 1992		
0344	PAIS	Substitut	7	*	855	2926	Arg ⇒ His	CGC ⇒ CAC										Melo et al; 80th US Endo Soc Meetings Abstr P2-44, 1998		
0470	CAIS	Substitut	7		856	2930	Phe ⇒ Leu	TTC ⇒ TTG							Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000		
0356	CAIS	Substitut	7		857		Tyr ⇒ Stop	TAC ⇒					de novo mutation		Female	Normal	neg	Hjort et al; J Pediatrics 132: 939-943, 1998		
0256	CAIS	Substitut	7		863	2950	Leu ⇒ Arg	CTG ⇒ CGG							Female	Normal		Brown et al; Eur J Pediatr 152: (Suppl 2) S62, 1993		
0257	CAIS	Substitut	7	*	864	2952	Asp ⇒ Asn	GAC ⇒ AAC			low		Transactivation activity increases with horm. concentration		Female	Normal		Bevan et al; J Steroid Biochem Molec. Biol 61: 19-26, 1997		
0471	CAIS	Substitut	7		864	2952	Asp ⇒ Asn	GAC ⇒ AAC							Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000		
0258	CAIS	Substitut	7	*	864	2953	Asp ⇒ Gly	GAC ⇒ GGC			zero				Female	Normal		DeBellis et al; Mol Endocrinol, 6:1909-20, 1992		

Accession #		Pathogenicity		CpG Position		Change		Exon 1 tracts		Androgen Binding		Sex of rearing		Family history		Reference	
Phenotype	Mutation type	Exon Domain	hot spot	Amino acid Base	Amino acid Base	Change	Gln #	Poly Gly #	Poly Gly #	Bmax	Kd	Thermolabile	Comments	Sex	External genitalia	Family history	Reference
0472 CAIS	Substitut	7 LBD		864	2953	Asp ⇒ Gly GAC ⇒ GGC				zero				Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0486 CAIS	Substitut	7 LBD		865	2955	Ser ⇒ Pro TCC ⇒ CCC								Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0560 CAIS	Substitut	7 LBD		865	2955	Ser ⇒ Pro TCC ⇒ CCC							de novo mut. also Phe868Leu mut -no effect horm binding	Female	Normal	pos	Mongan et al; J Clin endocrinol Metab 87: 1057-1061, 2002
0259 PAIS	Substitut	7 LBD		866	2958	Val ⇒ Leu GTG ⇒ TTG	21			normal high				Male	Ambiguous	pos	Saunders et al; Clin Endocrinol 37: 214, 1992
0345 PAIS	Substitut	7 LBD		866	2958	Val ⇒ Leu GTG ⇒ TTG	25			normal high				Male	Ambiguous		Saunders et al; Clin Endocrinol, 37:214, 1992
0260 PAIS	Substitut	7 LBD	*	866	2958	Val ⇒ Leu GTG ⇒ TTG				normal high				Male	Ambiguous	pos	Kazemi-Esfarjani et al; Mol Endocrinol, 7:37-46, 1993
0261 PAIS	Substitut	7 LBD		866	2958	Val ⇒ Leu GTG ⇒ TTG				high				Male	Ambiguous	pos	Hjort et al; J Clin Endocrinol Metab, 77:262-266, 1993
0262 PAIS	Substitut	7 LBD	*	866	2958	Val ⇒ Leu GTG ⇒				zero							Merkabi et al; 75th US Endo Soc Meeting Abstr 602, 1993
0263 CAIS	Substitut	7 LBD	*	866	2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG	20	16		normal high				Female	Normal		Kazemi-Esfarjani et al; Mol Endocrinol, 7:37-46, 1993
0264 CAIS	Substitut	7 LBD	*	866	2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG				normal high				Female	Normal		Weidemann et al; Clin Endocrinology 45: 733 - 739, 1996
0265 CAIS	Substitut	7 LBD	*	866	2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG				normal high				Female	Normal		Lubahn et al; Proc Natl Acad Sci. 86: 9534, 1989
0266 PAIS	Substitut	7 LBD	*	866	2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG											McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0267 PAIS	Substitut	7 LBD	*	866	2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG				high			de novo mutation - mosaic 2 functionally diff AR's	Female	Ambiguous	neg	Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998

WO 03/040366

95

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
						Poly Gln #	Poly Gly #	Poly Bmax	Kd	Thermolabile k					
0373	Prostate cancer	Substitut	7 LBD	* 866 2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG						Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0473	CAIS	Substitut	7 LBD	* 866 2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG							Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0474	CAIS	Substitut	7 LBD	* 866 2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG			zero				Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0475	CAIS	Substitut	7 LBD	* 866 2958	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG			zero				Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0268	CAIS	Substitut	7 LBD	866 2959	Val ⇒ Glu GTG ⇒ GAG							Female	Normal		McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0269	PAIS	Substitut	8 LBD	* 869 2969	Ile ⇒ Met ATT ⇒ ATG			normal high			* Hypospadias	Male	Ambiguous	pos	Bevan et al; Hum Mol Genet, 5: 265-273, 1996
0270	PAIS	Substitut	8 LBD	* 870 2971	Ala ⇒ Val GCG ⇒ GTG						Found in two unrelated families	Male	Ambiguous		Hjort et al; Eur J Pediatr, 153:317, 1994
0315	PAIS	Substitut	8 LBD	870 2971	Ala ⇒ Gly GCG ⇒ GGG						Severe hypospadias	Male	Ambiguous		Albers et al; J of Pediatrics 131: 388-392, 1997
0271	PAIS	Substitut	8 LBD	* 870 2971	Ala ⇒ Gly GCG ⇒ GGG						de novo mutation	Female	Ambiguous	neg	Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998
0562	MAIS	Substitut	8 LBD	* 870 2971	Ala ⇒ Gly GCG ⇒ GGG						bilateral gynecomastia	Male	Normal		Zenteno et al; Horm Res 57: 90-93, 2002
0272	MAIS	Substitut	8 LBD	* 871 2973	Arg ⇒ Gly AGA ⇒ GGA	26	24	normal normal norm				Male	Normal		Shkolny et al; J Clin Endocrinol & Metab 84: 805-810, 1999
0273	Prostate cancer	Substitut	8 LBD	874 2982	His ⇒ Tyr CAT ⇒ TAT						Som mut- stimulated by progesterone & oestrogen	Male	Normal		Taplin et al; New England J Med 332: 1393-1398, 1995
0274	Prostate cancer	Substitut	8 LBD	874 2982	His ⇒ Tyr CAT ⇒ TAT						Somatic mutation	Male	Normal		Tan et al; J of Urology 155: 340A, 1996

Pathogenicity			Exon 1 tracts			Androgen Binding			Sex of		Family history	Reference
Accession #	Mutation type	Proven Exon Domain	CpG Position hot spot Base	Change Amino acid Base	Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd	rearing	External Genitalia		
0538	CAIS	Substitut 8 LBD	874 2983	His ⇒ Arg CAT ⇒ CGT			zero		Female	Normal		Chavez et al; J Hum Genet. 46: 560-565, 2001
0275	LNCaP mutation	Substitut 8 LBD	877 2991	Thr ⇒ Ala ACT ⇒ GCT					Male	Normal		Veldscholte et al; Biochem Biophys Res Comm, 172:534, 1990
0276	Prostate cancer	Substitut 8 LBD	877 2991	Thr ⇒ Ala ACT ⇒ GCT					Male	Normal		Suzuki et al; J Steroid Biochem Molec Biol 46:759, 1993
0277	Prostate cancer	Substitut 8 LBD	877 2991	Thr ⇒ Ala ACT ⇒ GCT					Male	Normal		Gaddipati et al; Cancer Res, 54: 2861-2864, 1994
0278	Prostate cancer	Substitut 8 LBD	877 2991	Thr ⇒ Ala ACT ⇒ GCT					Male	Normal		Suzuki et al; Prostate 29: 153-158, 1996
0279	Prostate cancer	Substitut 8 LBD	877 2991	Thr ⇒ Ala ACT ⇒ GCT					Male	Normal		Kleinerman et al; J of Urology 155: 624A, 1996
0432	Prostate cancer	Substitut 8 LBD	877 2991	Thr ⇒ Ala ACT ⇒ GCT					Male	Normal		Taplin et al; Cancer Research 59: 2511-2515 1999
0280	Prostate cancer	Substitut 8 LBD	877 2992	Thr ⇒ Ser ACT ⇒ AGT					Male	Normal		Taplin et al; New England J Med 332: 1393-1398, 1995
0539	PAIS	Substitut 8 LBD	879 2997	Asp ⇒ Tyr GAC ⇒ TAC			normal		Male	Ambiguous		Chavez et al; J Hum Genet. 46: 560-565, 2001
0553	Prostate cancer	Substitut 8 LBD	879 2998	Asp ⇒ Gly GAC ⇒ GCC					Male	Normal		Taplin et al; 37th meeting ASCO 20: Abstr 1738, 2001
0281	CAIS	Substitut 8 LBD	881 3003	Leu ⇒ Val CTA ⇒ GTA					Female	Normal	pos	Davies et al; Clinical Endocrinology 43: 69-77, 1995
0282	CAIS	Substitut 8 LBD	883 3009	Lys ⇒ Stop AAG ⇒ TAG			zero		Female	Normal	pos	Trifiro et al; Am J Med Genet, 40:493, 1991
0283	MAIS	Substitut 8 LBD	886 3018	Met ⇒ Val ATG ⇒ GTG	23	23	normal normal normal		Male	Normal		Yong et al; 46th Am Soc Hum Genetics meetings Abstr 217, A43, 1996

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity proven		CpG position	Change amino acid	Exon 1 tracts		Androgen Binding Thermolabile		Comments	Sex of External rearing		Family history	Reference
			Exon	Domain	hot spot	Base	Poly Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d		Male	Female		
0309	MAIS	Substitut 8	*	LBD	886	Met ⇒ Val ATG ⇒ GTG	21	24	normal	normal norm	Oligospermia-50% red. in transactivation	Male	Normal		Yong et al: 46th Am Soc Hum Genetics meetings Abstr 217, A43, 1996
0533	PAIS	Substitut 8 /Splice	*	LBD	3018 888 3026	Ser ⇒ Ser AGC ⇒ AGT AGC ⇒ AGT	21	24	v low	normal	silent mut.-part exon 8 + part of 3' untransl also small amt. wt AR	Male	Ambiguous		Hellwinkel et al. J Clin Endocrinol & Metab 86: 2569-2575, 2001
0540	PAIS	Substitut 8 /Splice	*	LBD	888 3026	Ser ⇒ Ser AGC ⇒ AGT			normal			Male	Ambiguous		Chavez et al; J Hum Genet. 46: 560-565, 2001
0476	CAIS	Substitut 8	*	LBD	889 3027	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG			low	normal		Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0284	CAIS	Substitut 8	*	LBD	889 3027	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG			zero			Female	Normal		Pinsky et al; Clin Inv Med, 15:456, 1992
0285	PAIS	Substitut 8	*	LBD	889 3027	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG			low	normal		Female	Normal		De Bellis et al; J Clin Endocrinol Metab, 78:513, 1994
0321	PAIS	Substitut 8	*	LBD	889 3027	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG						Female	Normal		Essawi et al; Disease Markers 13: 99-105, 1997
0433	Prostate cancer	Substitut 8	*	LBD	890 3030	Asp ⇒ Asn GAC ⇒ AAC					Mutation also found in peripheral blood	Male	Normal		Taplin et al; Cancer Research 59:2511-2515, 1999
0389	CAIS	Substitut 8	*	LBD	892 3036	Pro ⇒ Leu CCG ⇒ TCG	26		low	high	Reduced transactivation	Female	Normal	neg	Peters et al; Mol & Cellular Endocrinol. 148: 47-53, 1999
0375	CAIS	Substitut 8		LBD	892 3037	Pro ⇒ Leu CCG ⇒ CTG					Mutation found in two siblings	Female	Normal	pos	Knoke et al; Human Mutation 12: 220, 1998
0413	CAIS	Substitut 8		LBD	892 3037	Pro ⇒ Leu CCG ⇒ CTG						Female	Normal		Kanayama et al; Int J Urology 6: 327-330, 1999
0386	CAIS	Substitut 8	*	LBD	895 3046	Met ⇒ Thr ATG ⇒ ACG			low		Reduced transactivation	Female	Normal		Giwerzman et al; Human Genetics 103: 529-531, 1998
0286	CAIS	Substitut 8		LBD	898 3055	Ile ⇒ Thr ATC ⇒ ACC					de novo mutation	Female	Normal	neg	Hjort et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

98

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		Exon	Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			proven	Exon		hot spot	Amino acid Base	Poly Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd					
0287	Prostate cancer	Substitut	8	LBD		902	Gln ⇒ Arg CAA ⇒ CGA					Somatic mutation in 37% of isolates in initial cloning	Male	Normal		Taplin et al; New England J Med 332: 1393-1398, 1995
0288	PAIS	Substitut	8	LBD		903	Val ⇒ Met GTG ⇒ ATG			low		Qualitative binding abnormality				McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0289	CAIS	Substitut	8	LBD		904	Pro ⇒ Ser CCC ⇒ TCC	23		normal high			Female	Normal		Pinsky et al; Clin Inv Med, 15:456, 1992
0290	CAIS	Substitut	8	LBD		904	Pro ⇒ His CCC ⇒ CAC			zero			Female	Normal		McPhaul et al; J Clin Inv, 90:2097, 1992
0291	CAIS	Substitut	8	LBD	*	907	Leu ⇒ Phe CTT ⇒ TTT			low	normal	Decreased transactivation activity compared to normal	Female	Normal		Bevan et al; J Steroid Biochem Molec. Biol 61: 19-26, 1997
0292	PAIS	Substitut	8	LBD	*	909	Gly ⇒ Arg GGG ⇒ AGG			low	low	Also silent G to A mutation in codon 211	Female	Ambiguous	pos	Choong et al; J Clin Endocrinol Metab, 81: 236-243, 1996
0374	Prostate cancer	Substitut	8	LBD		909	Gly ⇒ Glu GGG ⇒ GAG					Somatic mutation	Male	Normal		Takahashi et al; Cancer Research 55: 1621-1624, 1995
0327	Prostate cancer	Substitut	8	LBD		910	Lys ⇒ Arg AAA ⇒ AGA					Somatic mutation	Male	Normal		Watanabe et al; Jpn J Clin Oncol 27: 389-393, 1997
0430	PAIS	Substitut	8	LBD		911	Val ⇒ Leu GTC ⇒ CTC	19				Servere oligozoospermia	Male	Ambiguous		Knoke et al; Andrologia 31: 199-201, 1999
0293	PAIS	Substitut	8	LBD		913	Pro ⇒ Ser CCC ⇒ TCC									Ghirri and Brown; Paed Res, 33(5) Suppl, Abstr 95, 1993
0318	CAIS	Substitut	8	LBD	*	916	Phe ⇒ Leu TTC ⇒ TTG			low	high	*	Female	Normal		Radnayr et al; J of Urology 158: 1553-1556, 1997
0477	CAIS	Substitut	8	LBD		917	His ⇒ Arg CAC ⇒ CGC						Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0303	Prostate cancer	Substitut	8	LBD	*	919	Gln ⇒ Arg CAG ⇒ CGG					Somatic mutation	Male	Normal		Nazereth et al; 79th US Endo Soc Meetings Abstr. P2-489, 1997

WO 03/040366

99

PCT/FR02/03843

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity		CpG Position	Change	Exon 1 tracts		Androgen Binding		Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			proven	Exon	hot spot	Amino acid Base	Poly Gln #	Poly Gly #	Bmax	Kd					
0294	CAIS	Splice	exon1/	intron 1		⇒ gta ⇒ gta	24	23			Insertion at +3 position of donor splice site	Female	Normal		Trifiro et al; Eur J Hum Genetics 5: 50-58, 1997
0304	CAIS	Splice	exon2/	intron 2		⇒ ctg ⇒ cta					Substitution at +1 pos of donor splice site - lacks exon 2	Female	Normal	neg	Hellwinkel et al; J Steroid Biochem & Mol Biol 68: 1-9, 1999
0479	CAIS	Splice	exon2/	intron 2		⇒ ⇒			zero			Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0480	CAIS	Splice	exon2/	intron 2		⇒ ⇒						Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0295	CAIS	Splice	exon3/	intron 3		⇒ ggt ⇒ gat					Substitution at +1 position of donor splice site	Female	Normal		Evans et al; J Endocrinol 129 Suppl, Abstr 65, 1991
0478	CAIS	Splice	exon3/	intron 3		⇒ ggt ⇒ gat			normal		Substitution at +1 position of donor splice site	Female	Normal		Ahmed et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 658-665, 2000
0296	CAIS	Splice	exon4/	intron 4		⇒ ggt ⇒ ggt			zero		+1 pos of donor site. Splice site activated & del of aa's 683-723	Female	Normal		Ris-Stalpers et al; Proc Natl AcadSci 87:7866-70, 1990
0297	CAIS	Splice	exon6/	intron 6		⇒ gta ⇒ tta	21		zero		Substitution at +3 position of donor splice site	Female	Normal	pos	Pinsky et al; Eur J Hum Genetics 5: 50-58, 1997
0503	PAIS	Splice	exon6/	intron 6		⇒ taa ⇒ tat			low	normal	Subst. at +5 position of donor splice site, stop at +79 bases	Female	Ambiguous		Sammarco et al; J Clin Endocrinol & Metab 85: 3256-3261, 2000
0541	CAIS	Splice	exon6/	intron 6		⇒ aag ⇒ aac			zero		Sust. at +6 position of donor splice site.	Female	Normal		Chavez et al; J Hum Genet 46: 560-565, 2001
0298	CAIS	Splice	exon7/	intron 7		⇒ tgt ⇒ tat			zero		Subst. at +1 pos of donor splice, - exon7, stop +10 aa exon 8	Female	Normal	pos	Lim et al; Mol & Cell Endocrinology 131: 205-210, 1997
0502	CAIS	Splice	exon7/	intron 7		⇒ tgt ⇒ tat					Sustitution at +1 position of donor splice site	Female	Normal		Choi et al; Arch Gynecol Obstet 263: 201-205, 200
0299	PAIS	Splice	intron 2/	exon 3		⇒ ggt ⇒ gat					Subst. at -11 pos of acceptor site. 2 transc; 1, -exon3, 1, +69 nt.	Male	Normal		Bruggenwirth et al; Am J Hum Genet 61: 1067-1077, 1997

Accession #	Phenotype	Mutation type	Pathogenicity			Change Amino acid Base	Exon 1 tracts			Androgen Binding Thermolabile			Comments	Sex of rearing	External Genitalia	Family history	Reference
			Mutation Exon	CpG hot spot	Position Amino acid Base		Poly Gln #	Poly Gly #	B _{max}	K _d	k						
												Domain					
0317	Breast Cancer	Splice				⇒							- exon 3: higher express. of mut. var in 7/31 breast cancer	Female	Normal		Zhu et al; Intl J of Cancer 72: 574-580, 1997
0351	CAIS	Substitut.	intron 2			⇒								Female	Normal		Hior et al; J Pediatrics 132: 939- 943, 1998
0088	PAIS	Deletion	intron 2			⇒ gt ⇒ at					normal normal		6 kb del at -18 pos of acceptor site 2 transcr: 1 wt, 1 minus exon 3	Male	Ambiguous	pos	Ris-Stalpers et al; Am J Hum Genet 54:609, 1994
0312	Prostate Cancer	Substitut.	5' UTR			⇒ agc ⇒ atc							+2 pos from transcription initiation site AR-TIS II	Male	Normal		Crocio et al; J of Urology 158: 1599-1601, 1997
0313	Prostate Cancer	Substitut.	5' UTR			⇒ gcc ⇒ gac							+214 pos from transcription initiation site AR-TIS II	Male	Normal	pos	Crocio et al; J of Urology 158: 1599-1601, 1997
0323	Prostate Cancer		3' UTR			⇒ ⇒							Som mut. polymorph seq 2820-36 downstrm to transl. init. site	Male	Normal		Paz et al; European Urology 31: 209-215, 1997

REVENDICATIONS

1. Un oligonucléotide double brin caractérisé en ce qu'il est constitué de deux séquences oligonucléotidiques complémentaires formant un hybride comprenant chacune à l'une de leurs extrémités 3' ou 5' un à cinq nucléotides non appariés formant des bouts simples brins débordant de l'hybride, l'une desdites séquences oligonucléotidiques étant complémentaire d'une séquence cible appartenant à une molécule d'ADN ou d'ARN d'un gène codant l'une ou plusieurs des isoformes du VEGF A, ledit oligonucléotide double brin étant constitué d'une séquence oligonucléotidique représentée par la séquence SEQ ID NO : 7 et d'une séquence oligonucléotide représentée par la séquence SEQ ID NO: 8.
2. L'oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est couplé à une substance favorisant ou permettant sa pénétration, ciblage ou adressage dans les cellules.
3. Composition comprenant au moins un oligonucléotide tel que défini dans la revendication 1 ou 2, et un excipient pharmaceutiquement acceptable.
4. La composition selon la revendication 3, pour utilisation dans la recherche de la fonction de gène.
5. La composition selon la revendication 3, pour utilisation à une fin thérapeutique ou diagnostique.
6. Utilisation d'un oligonucléotide tel que défini dans la revendications 1 ou 2, pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour la prévention ou le traitement d'une hypervascularisation pathologique dans le développement tumoral.
7. Utilisation d'un oligonucléotide tel que défini dans la revendication 1 ou 2, pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour la prévention ou le traitement de l'angiogenèse tumorale.
8. Utilisation selon la revendication 6, pour la préparation d'une composition pharmaceutique utile pour la prévention ou le traitement du cancer de la prostate ou du fibrosarcome.
9. Utilisation d'un oligonucléotide tel que défini dans la revendications 1 ou 2, pour la prévention ou le traitement d'une hypervascularisation pathologique dans le développement tumoral.

10. Utilisation d'un oligonucléotide tel que défini dans la revendication 1 ou 2, pour la prévention ou le traitement de l'angiogenèse tumorale.

11. Utilisation selon la revendication 9, pour la prévention ou le traitement du cancer de la prostate ou du fibrosarcome.

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

1/14

Fig. 1 A

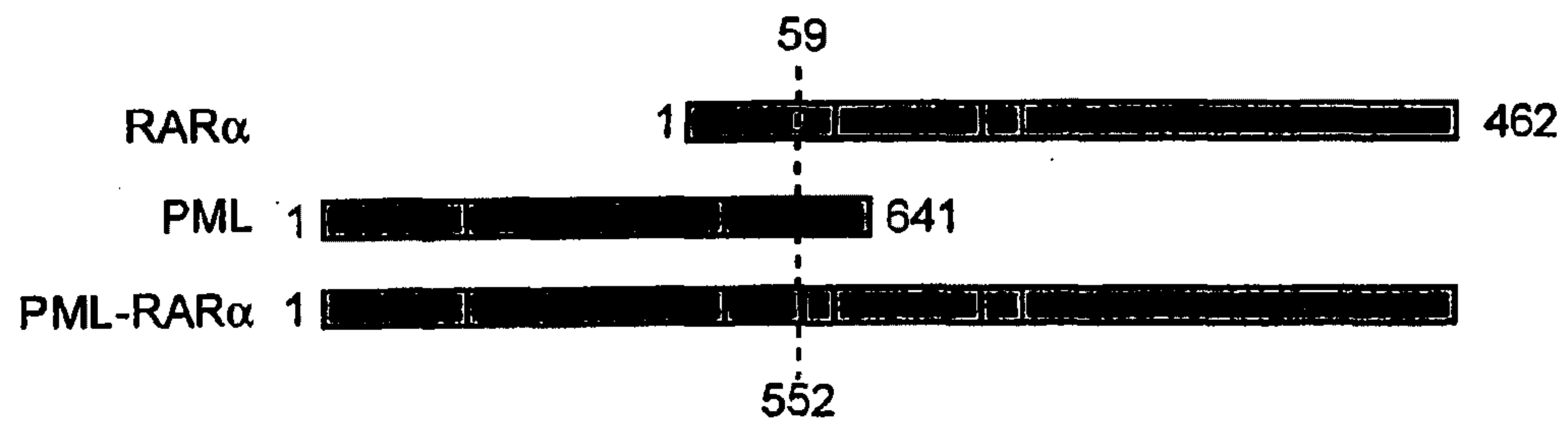


Fig. 1 B

siRNA	C	PR
PML-RARα	■	
RARα	...	

WO 03/040366

PCT/FR02/03843

2/14

Fig. 2 A

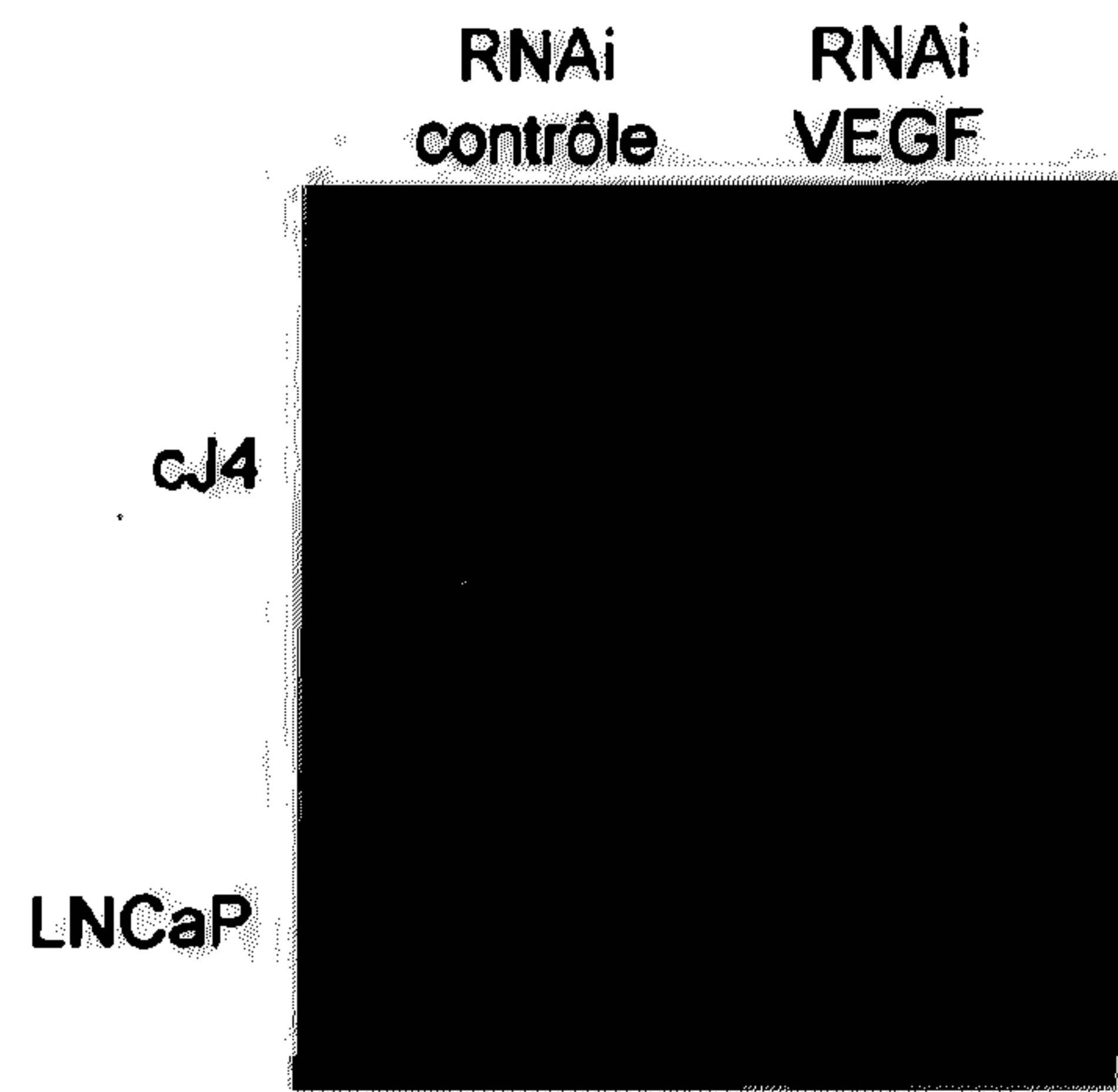


Fig. 2 B

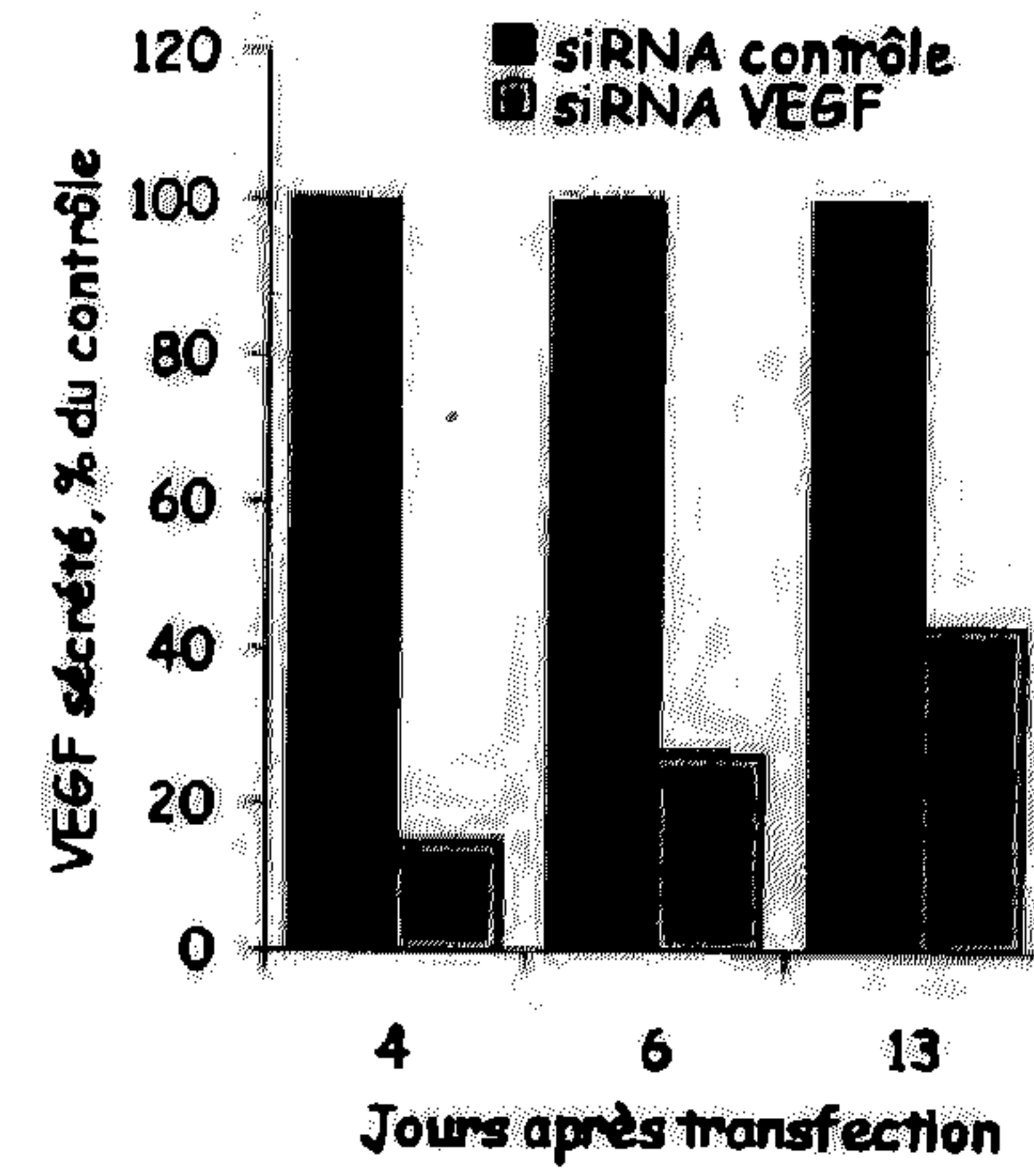


Fig. 2 C

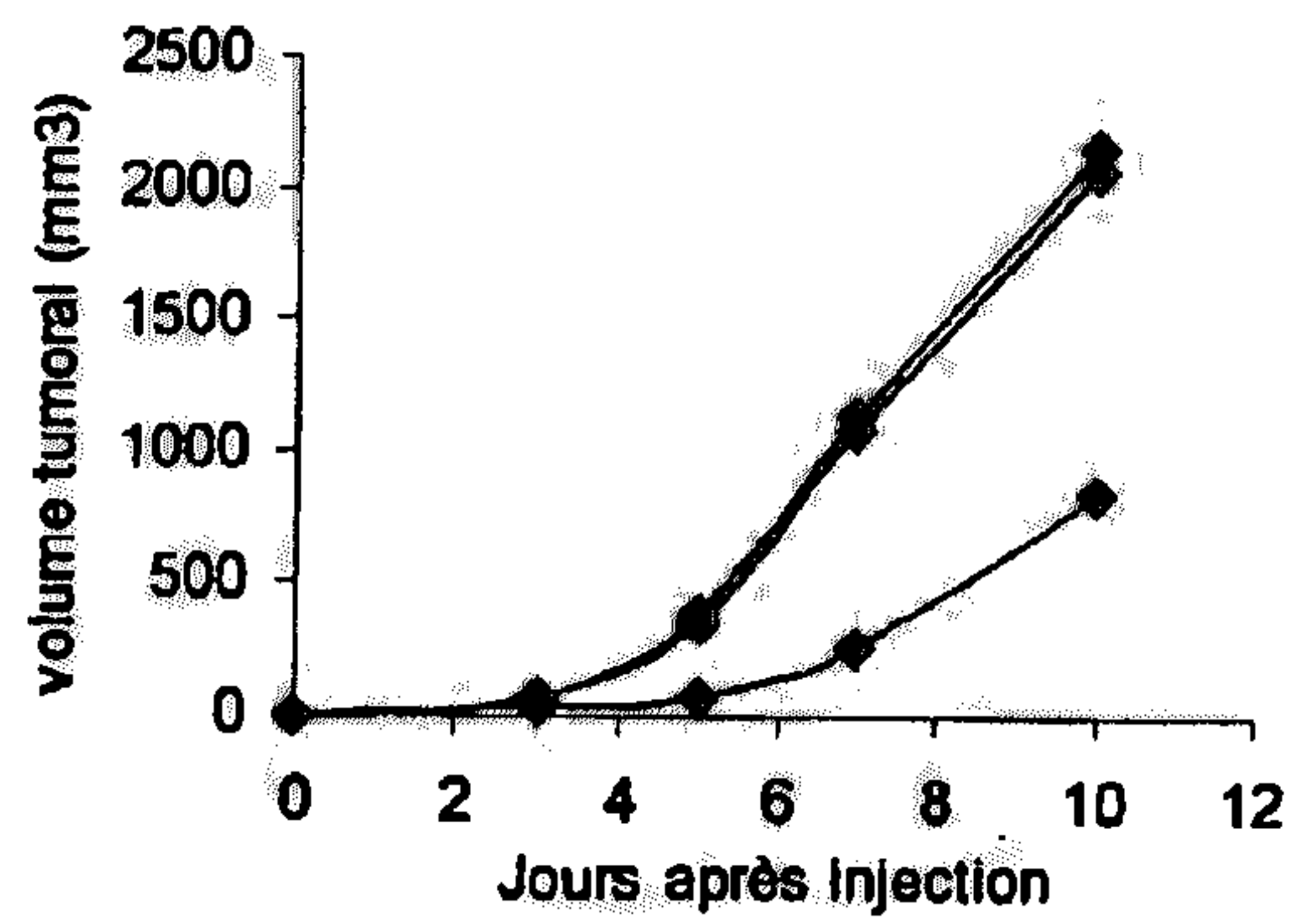


Fig. 2 D

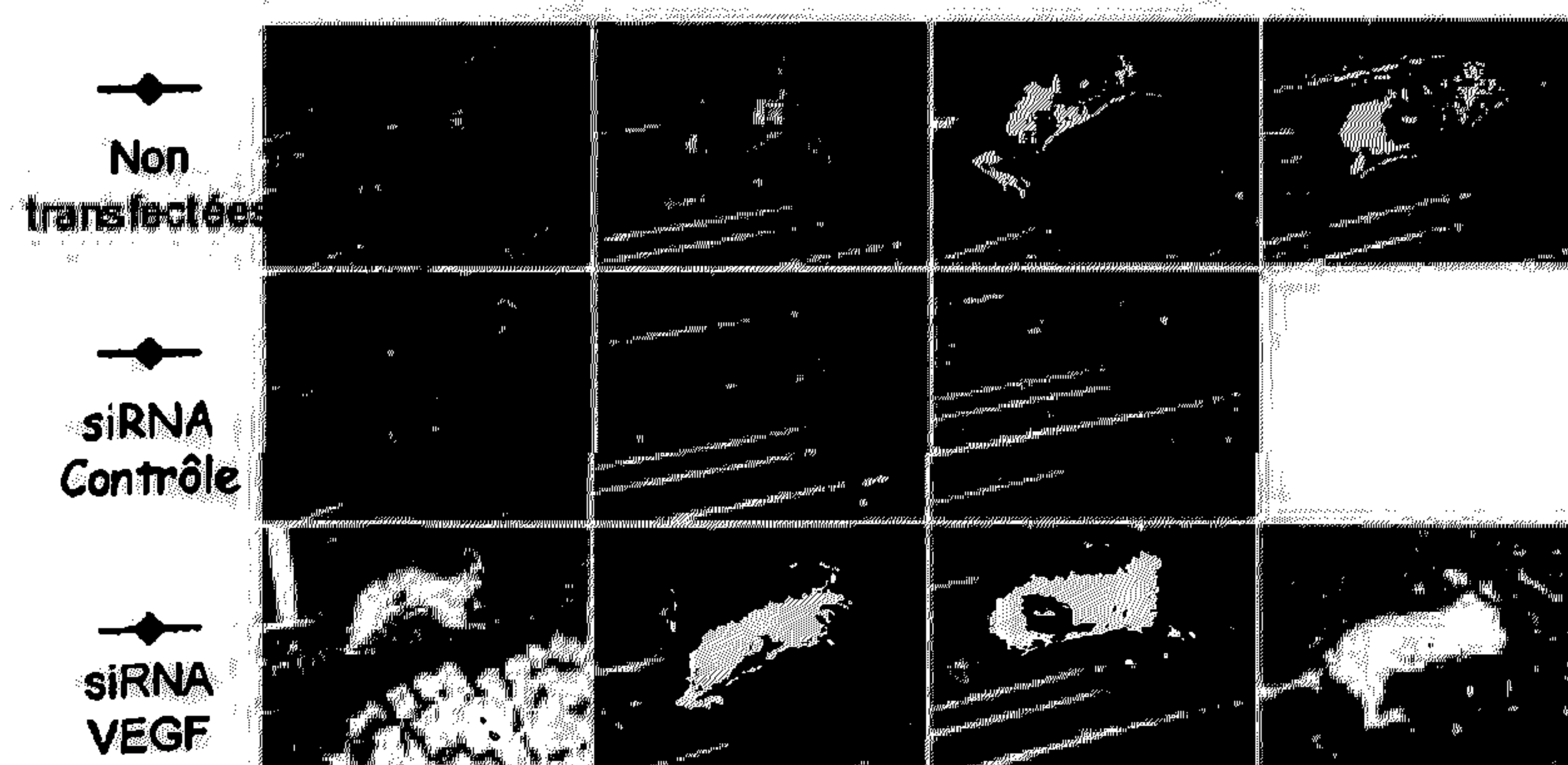


Fig. 2 E

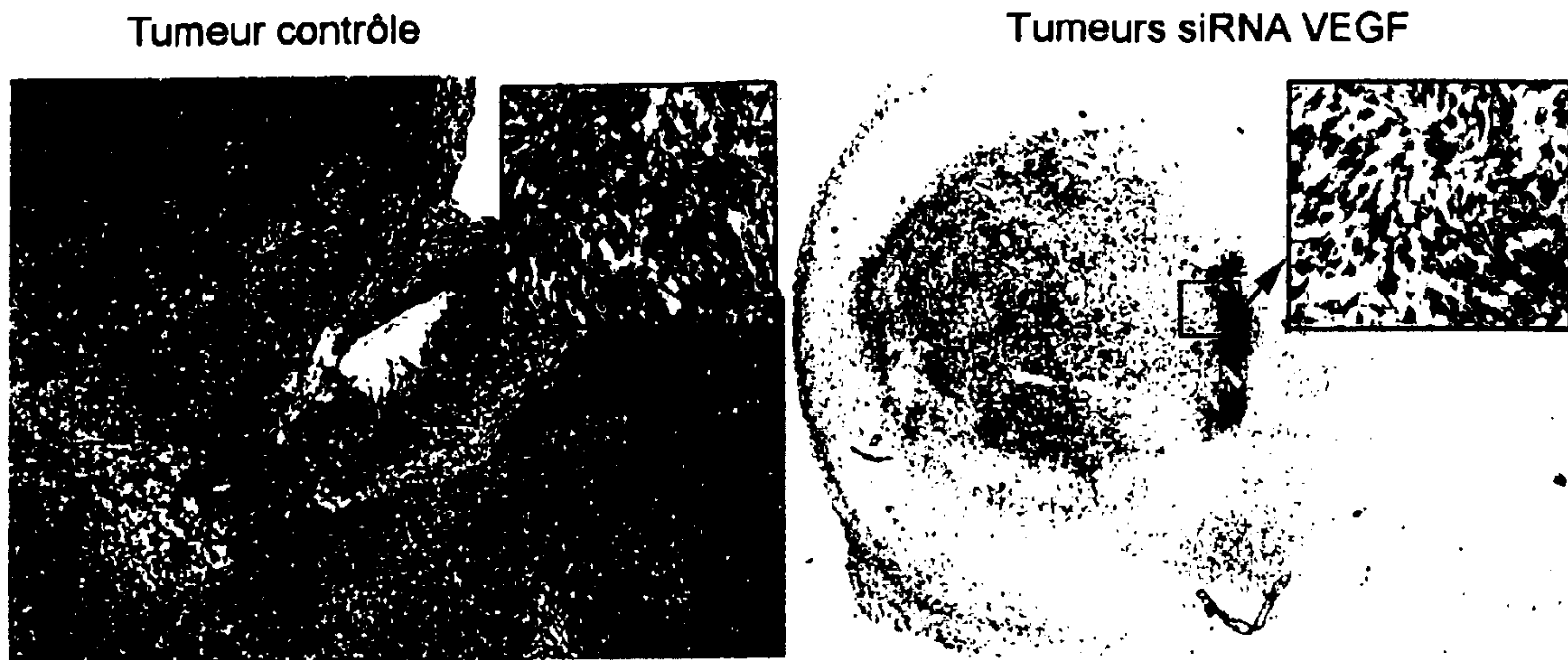


Fig. 3

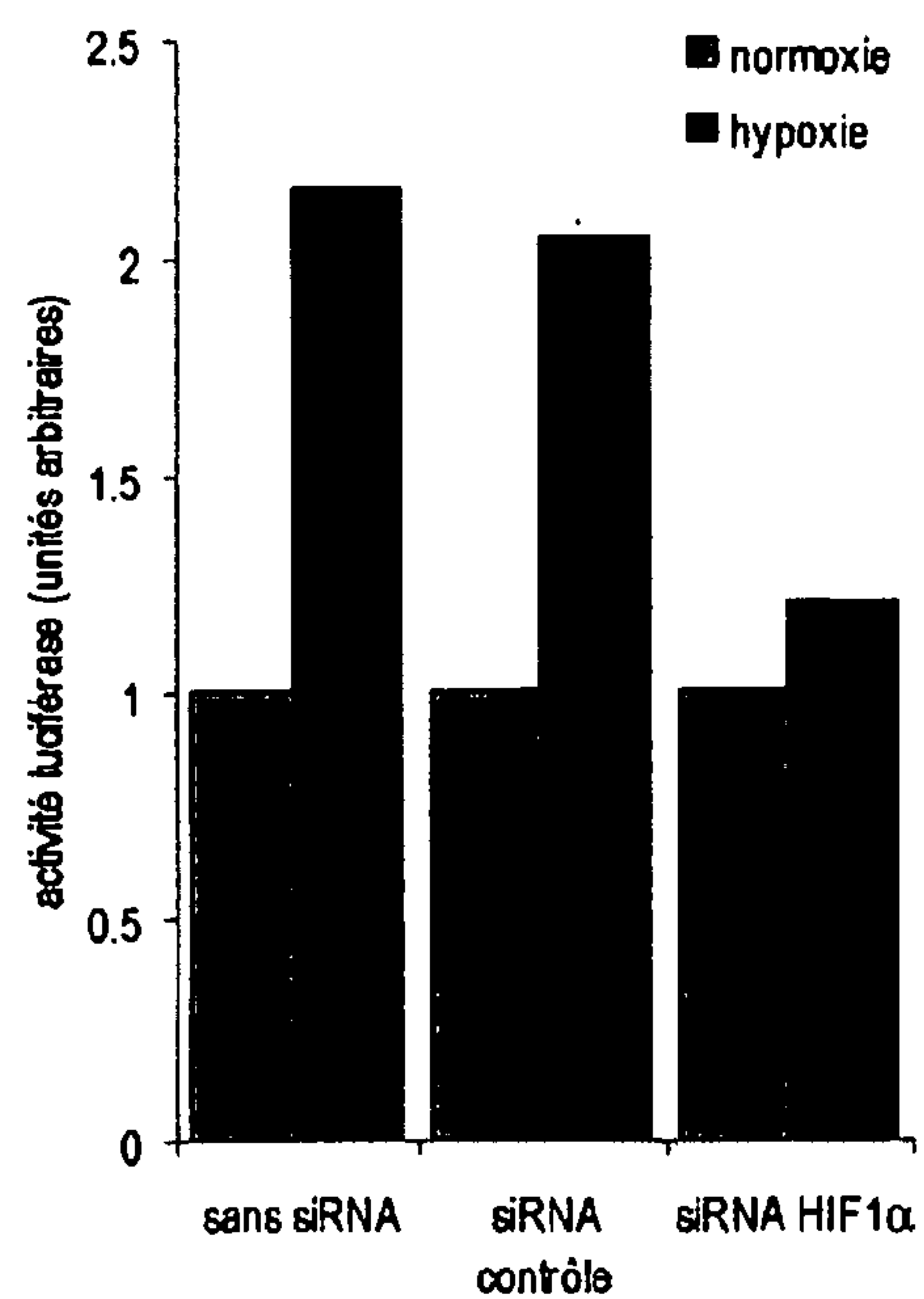


Fig.4 A

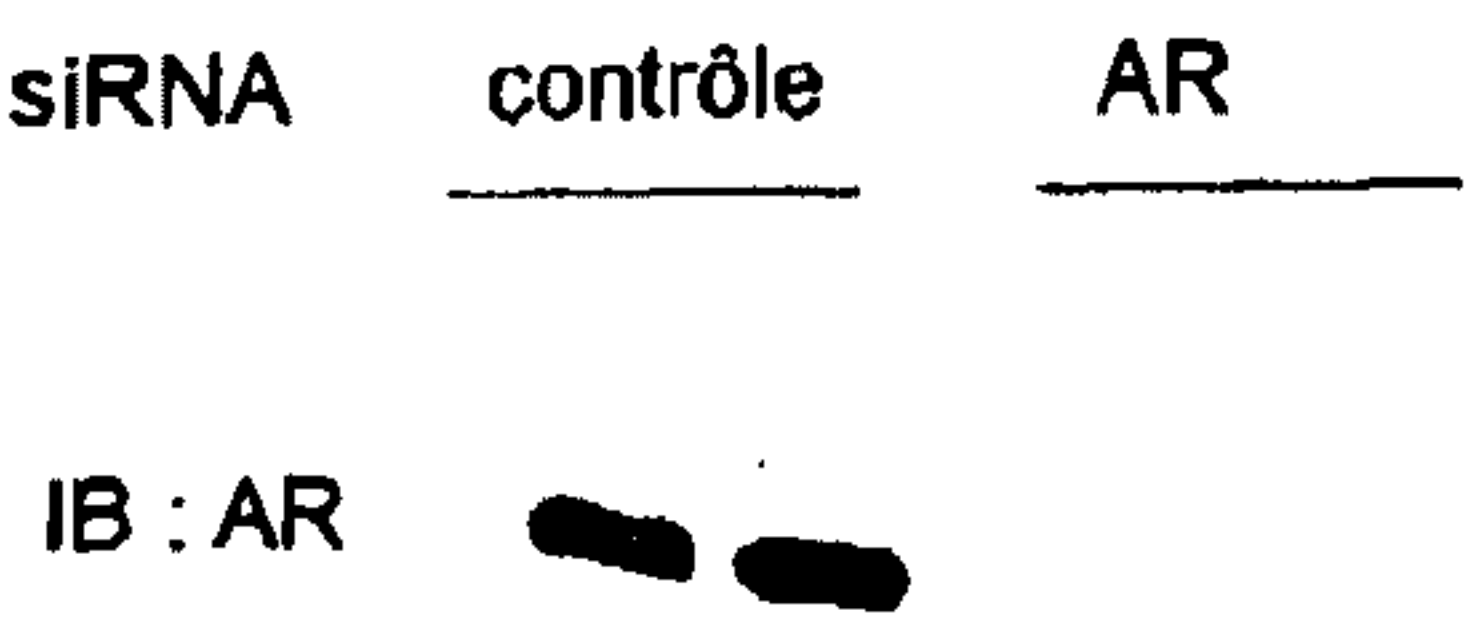


Fig. 4 B

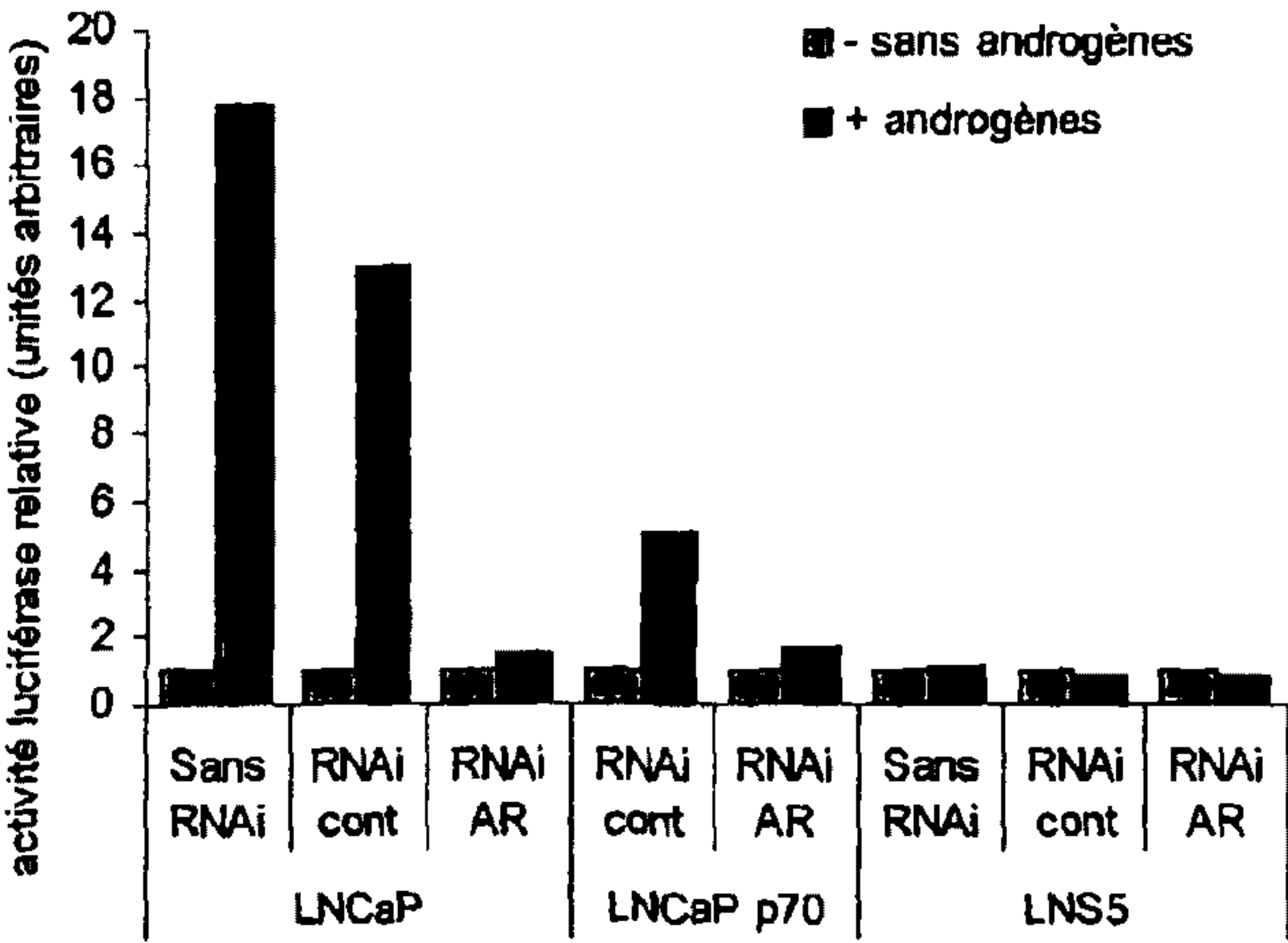
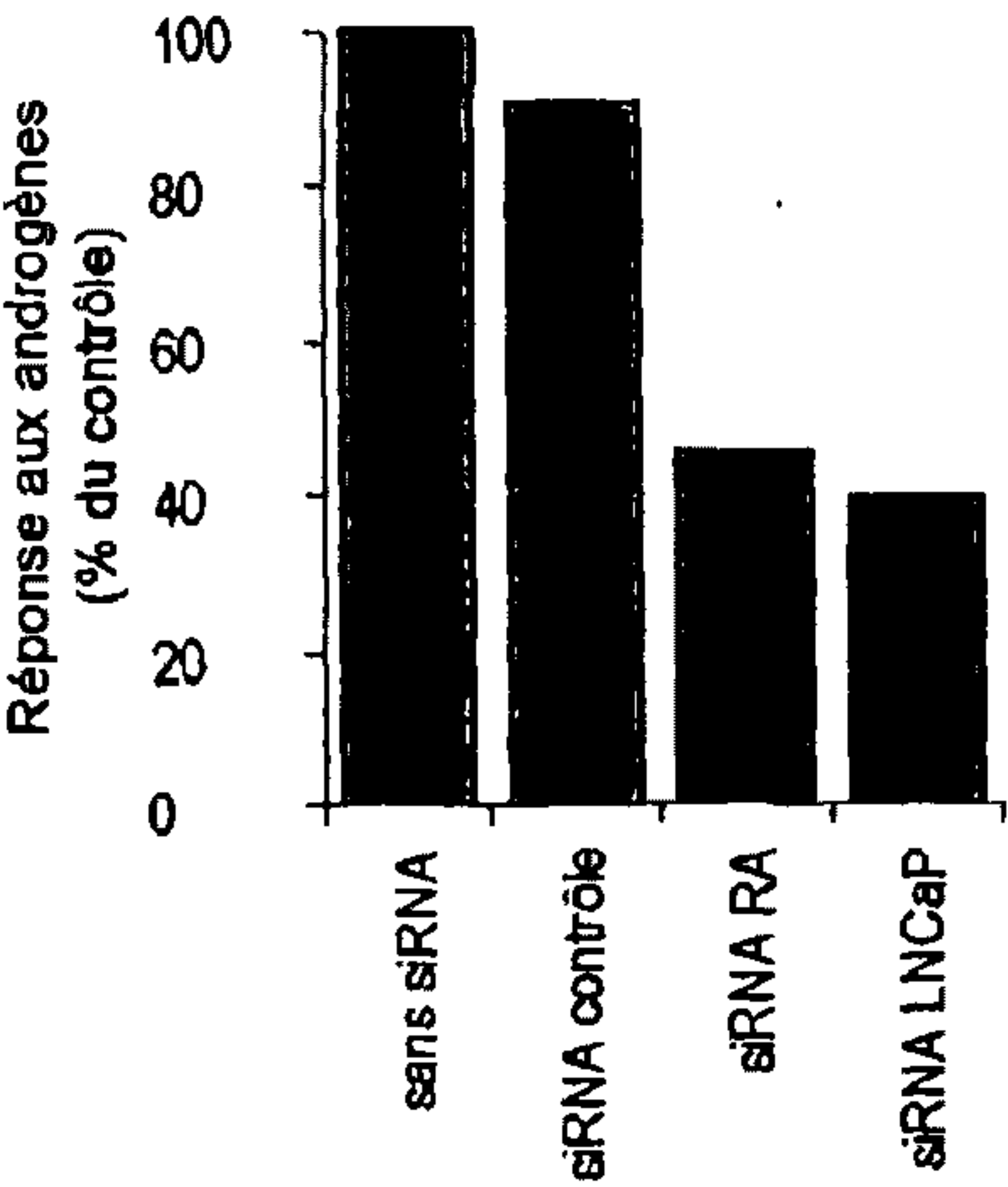


Fig. 4 C



5/14

Fig. 4 D

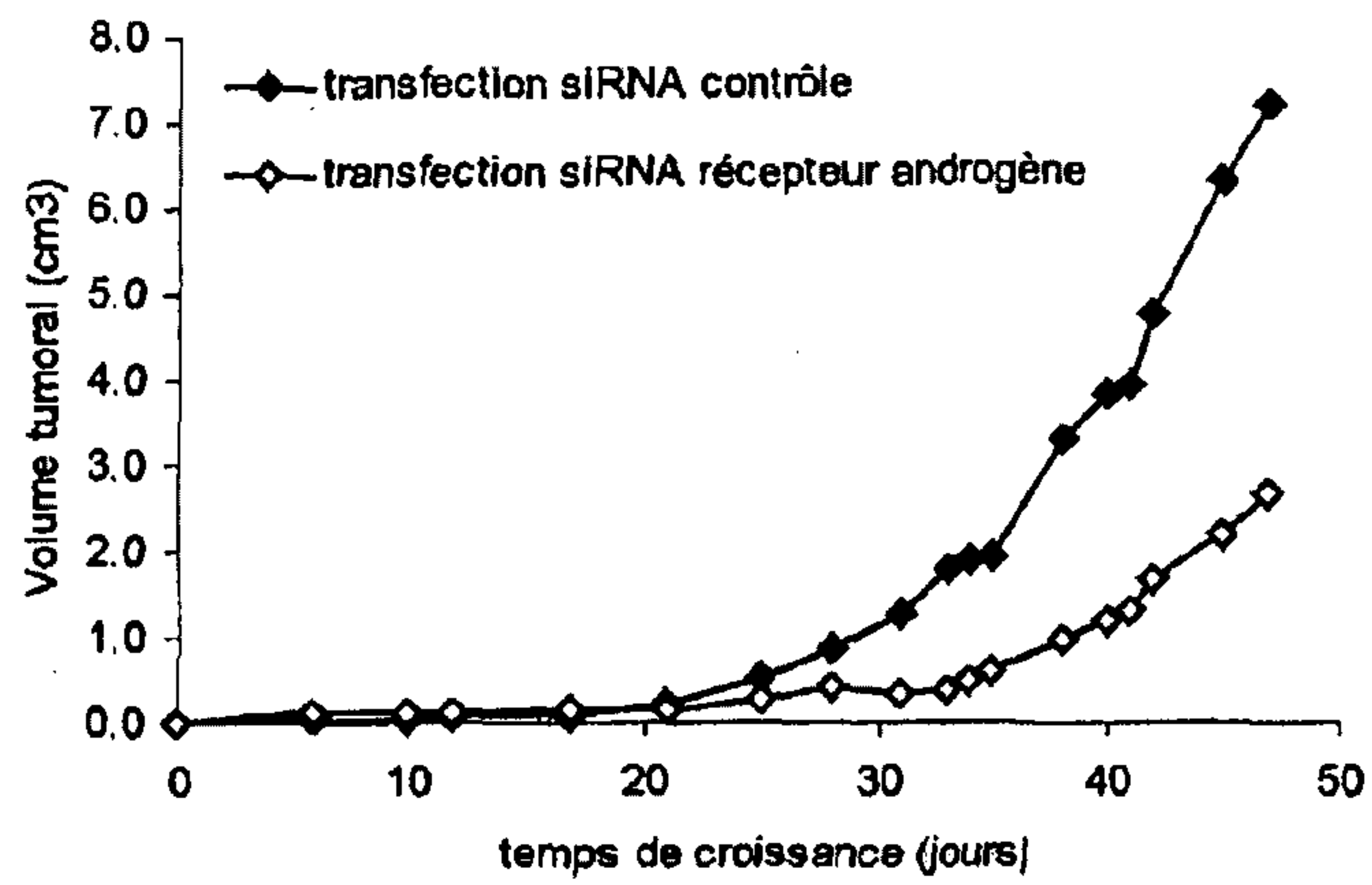


Fig. 4 E

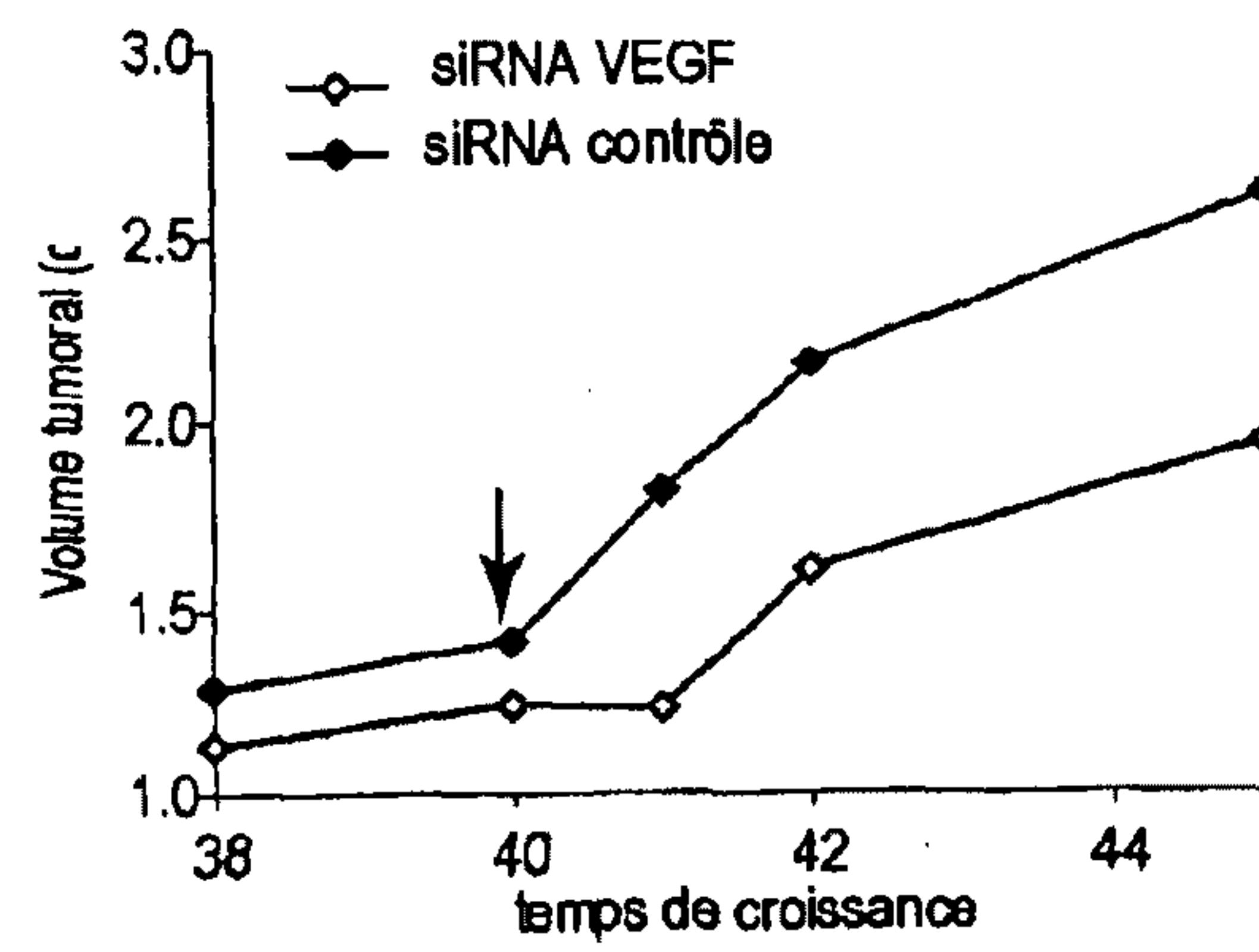
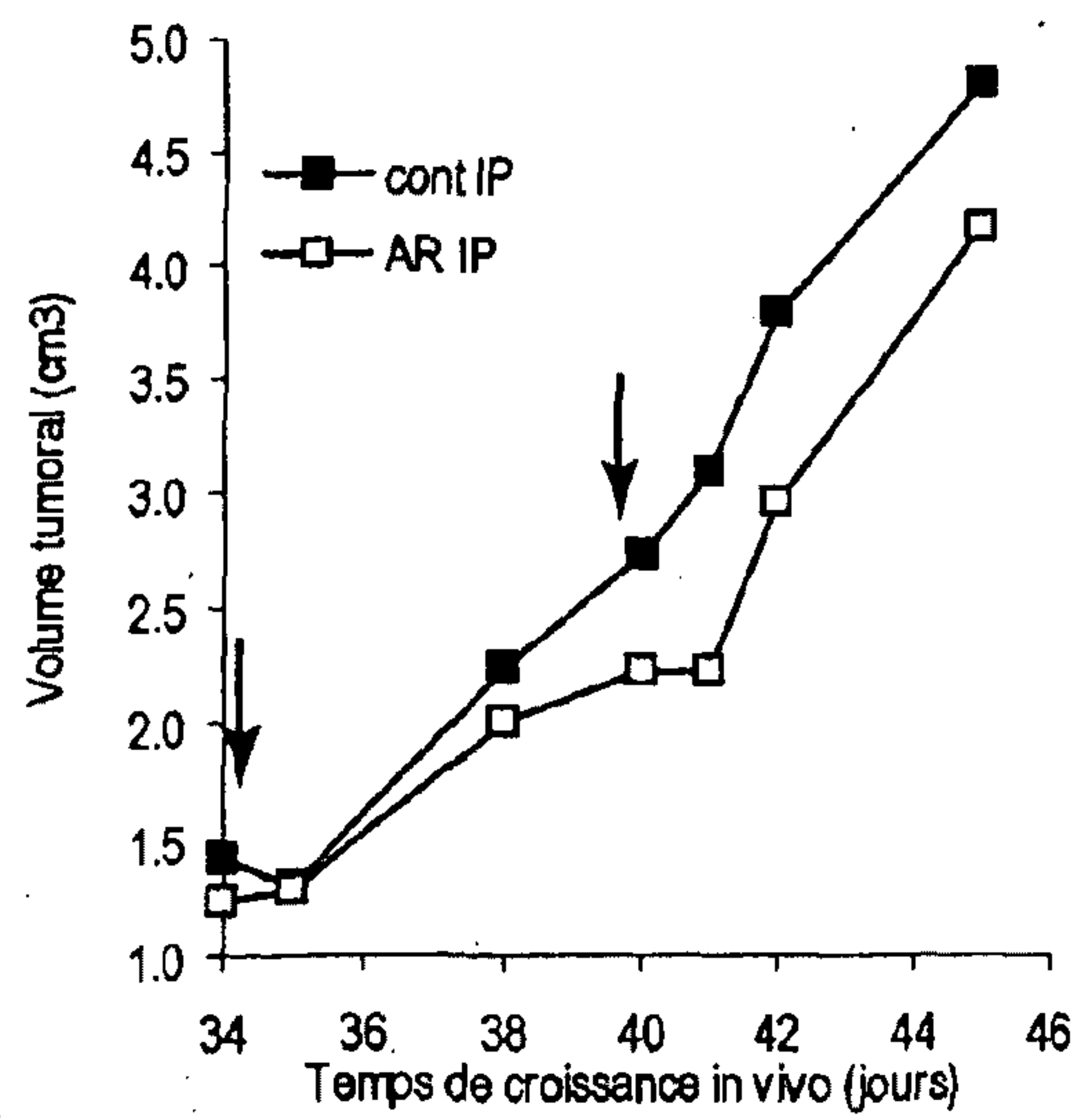


Fig. 4 F



6/14

Fig. 5 A

1 atggaggagc cgagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca
61 gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg
121 gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggg tcaactgaaga cccaggtcca
181 gatgaagctc ccagaatgcc agaggtgct cccccgtgg cccctgcacc agcagctcct
241 acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggccctgt catcttctgt cccttcccag
301 aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag
361 tctgtgactt gcacgtactc cctgcccctc aacaagatgt ttgccaact ggccaagacc
421 tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgccg gcaccgcgt ccgcgccatg
481 gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccaccatgag
541 cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat
601 ttgcgtgtgg agtatttggg tgacagaaac acttttccgac atagtgtggg ggtgccctat
661 gagccgcctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt
721 tcctgcatgg gcggcatgaa ccggaggccc atcctcacca tcacacact ggaagactcc
781 agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgcgtg tttgtgcctg tcctgggaga
841 gaccggcgca cagaggaaga gaatctccgc aagaaagggg agcctcacca cgagctgccc
901 ccaggagca ctaagcgagc actgcccac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag
961 aaaccactgg atggagaata ttccaccctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg
1021 ttccgagagc tgaatgaggc cttggaactc aaggatgccc aggctgggaa ggagccaggg
1081 gggagcaggg ctactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat
1141 aaaaaactca tgttcaagac agaaggcct gactcagact ga

7/14

Fig. 5 B

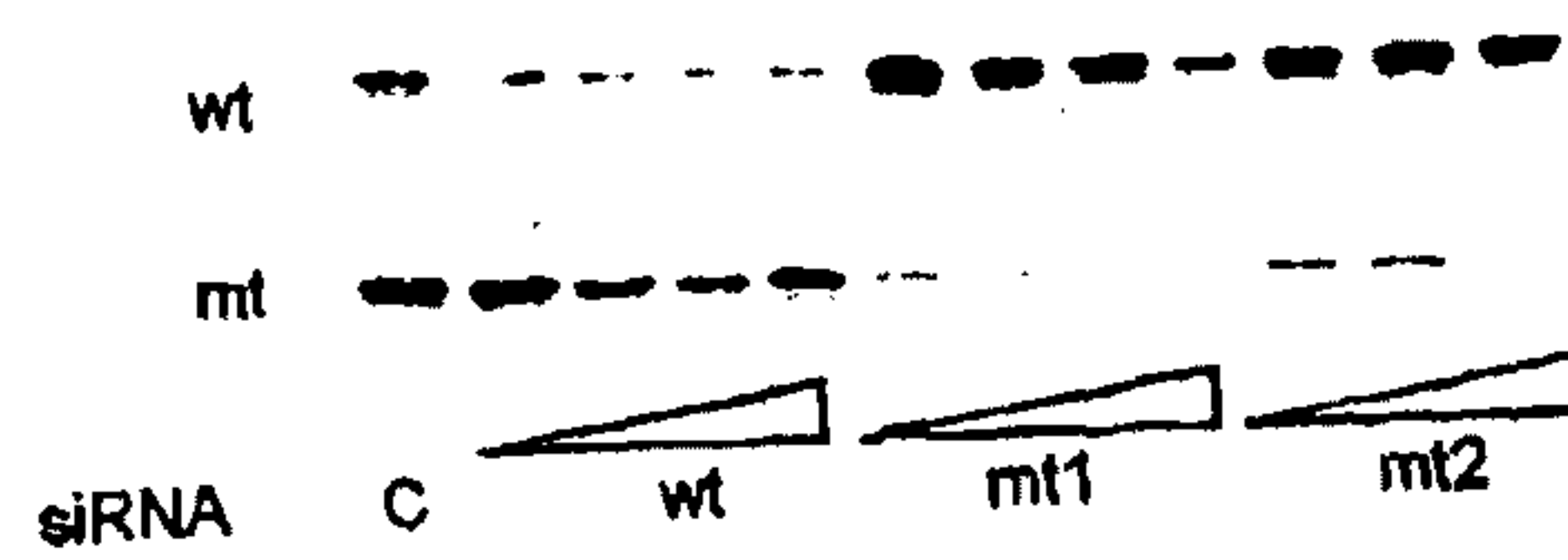


Fig. 5 C

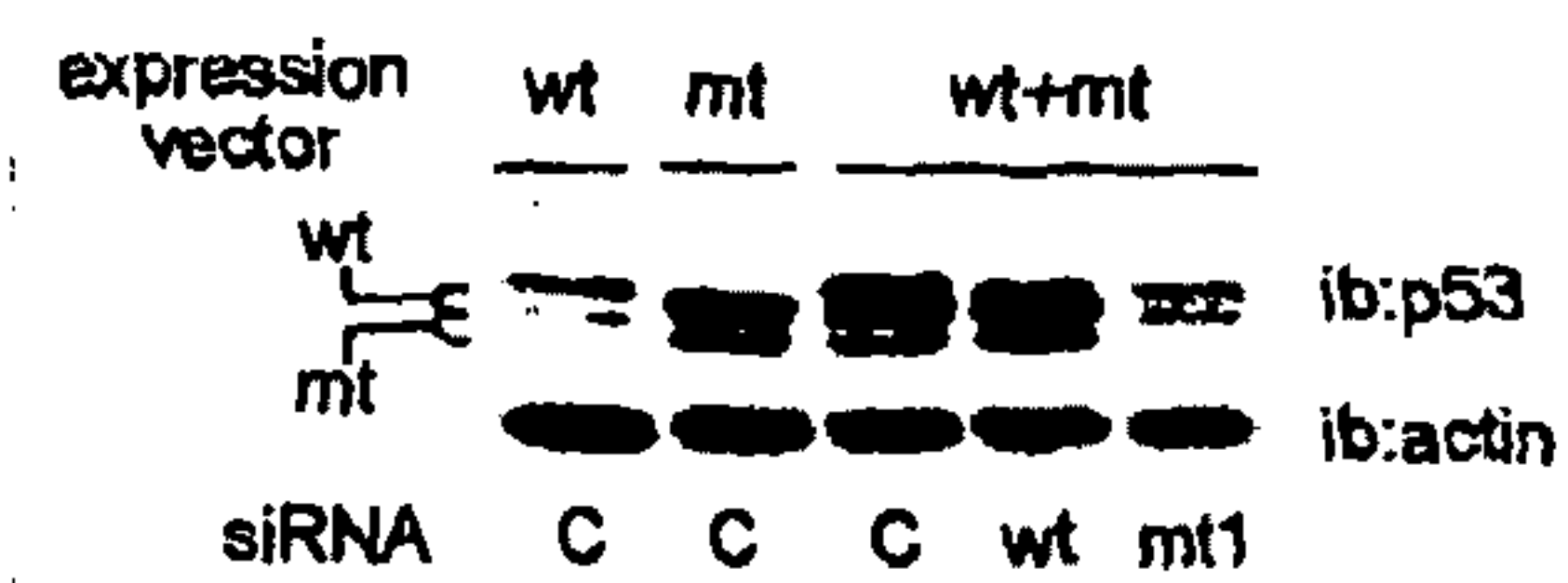


Fig. 5 D

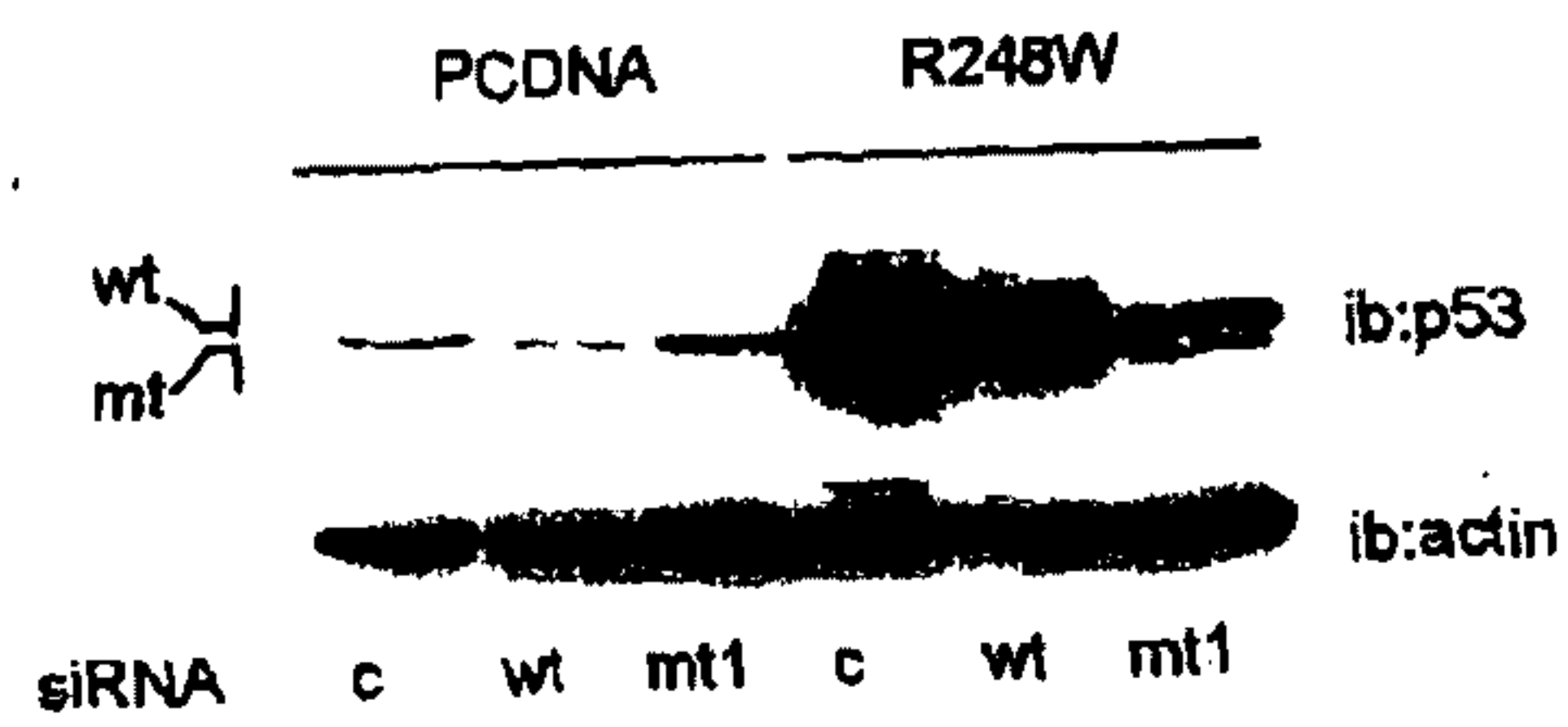
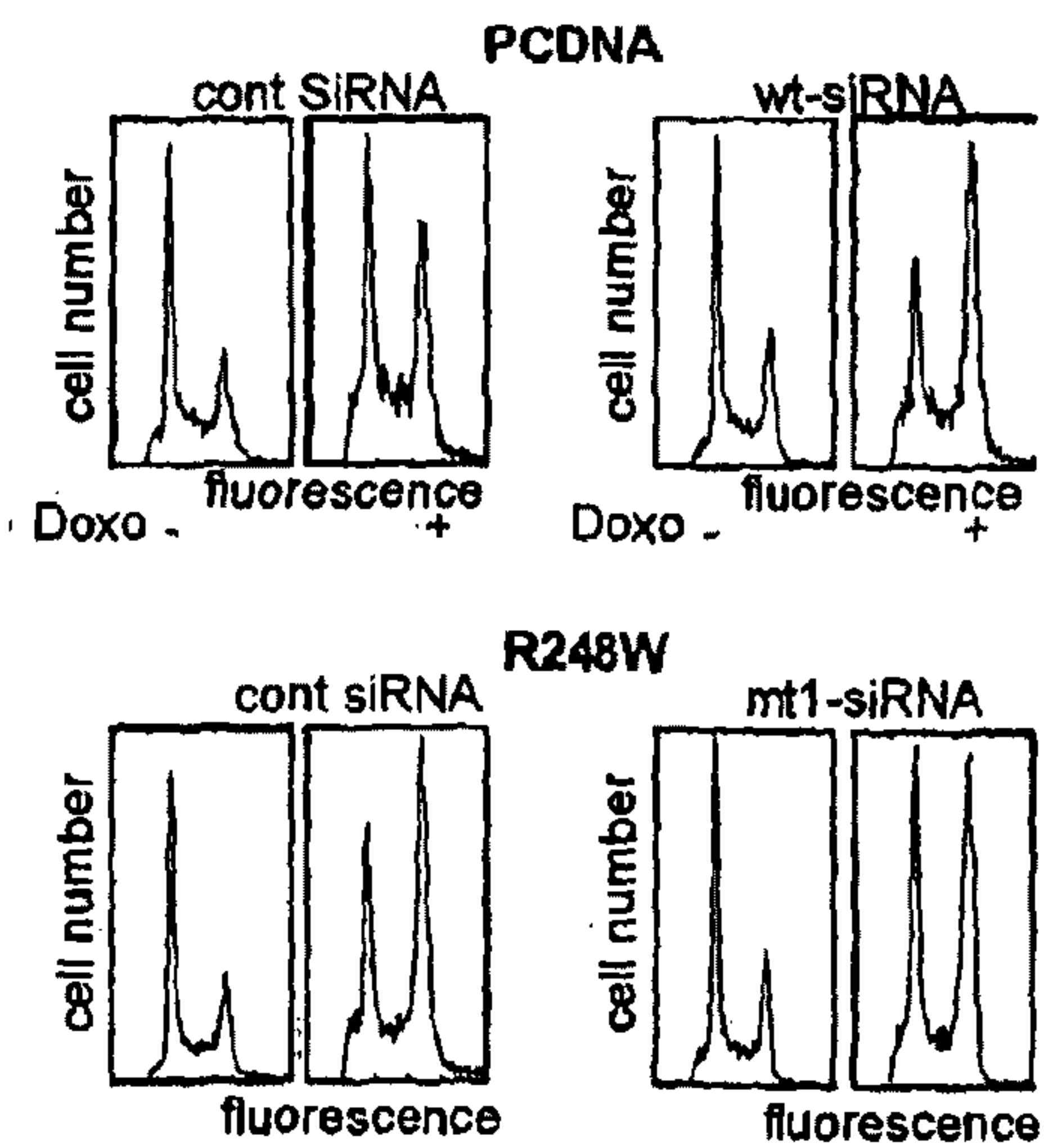


Fig. 5 E



WO 03/040366

PCT/FR02/03843

8/14

Fig. 5 F

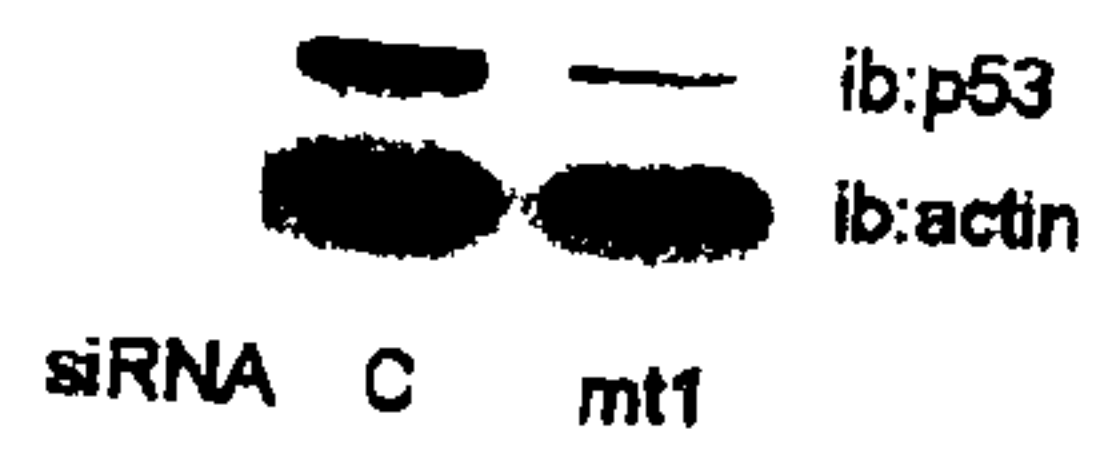


Fig. 5 G

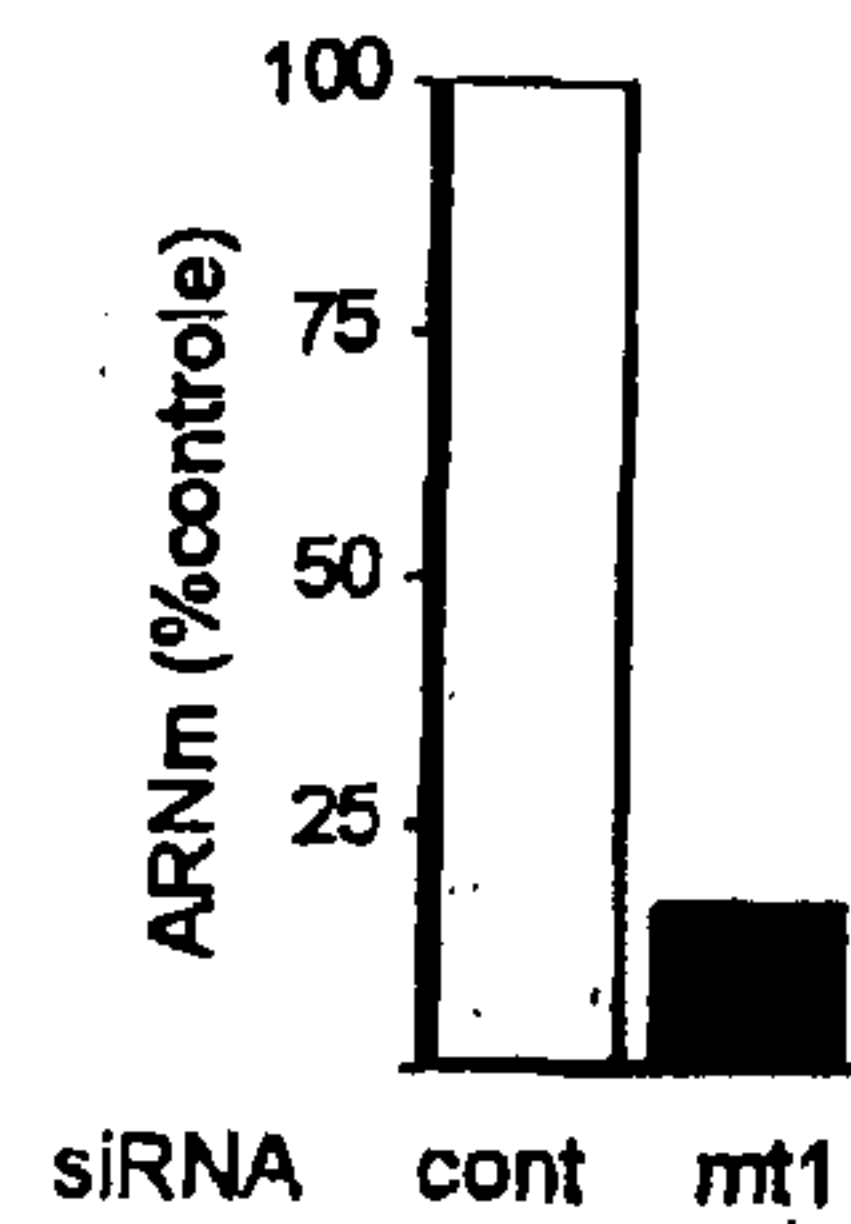


Fig. 5 H

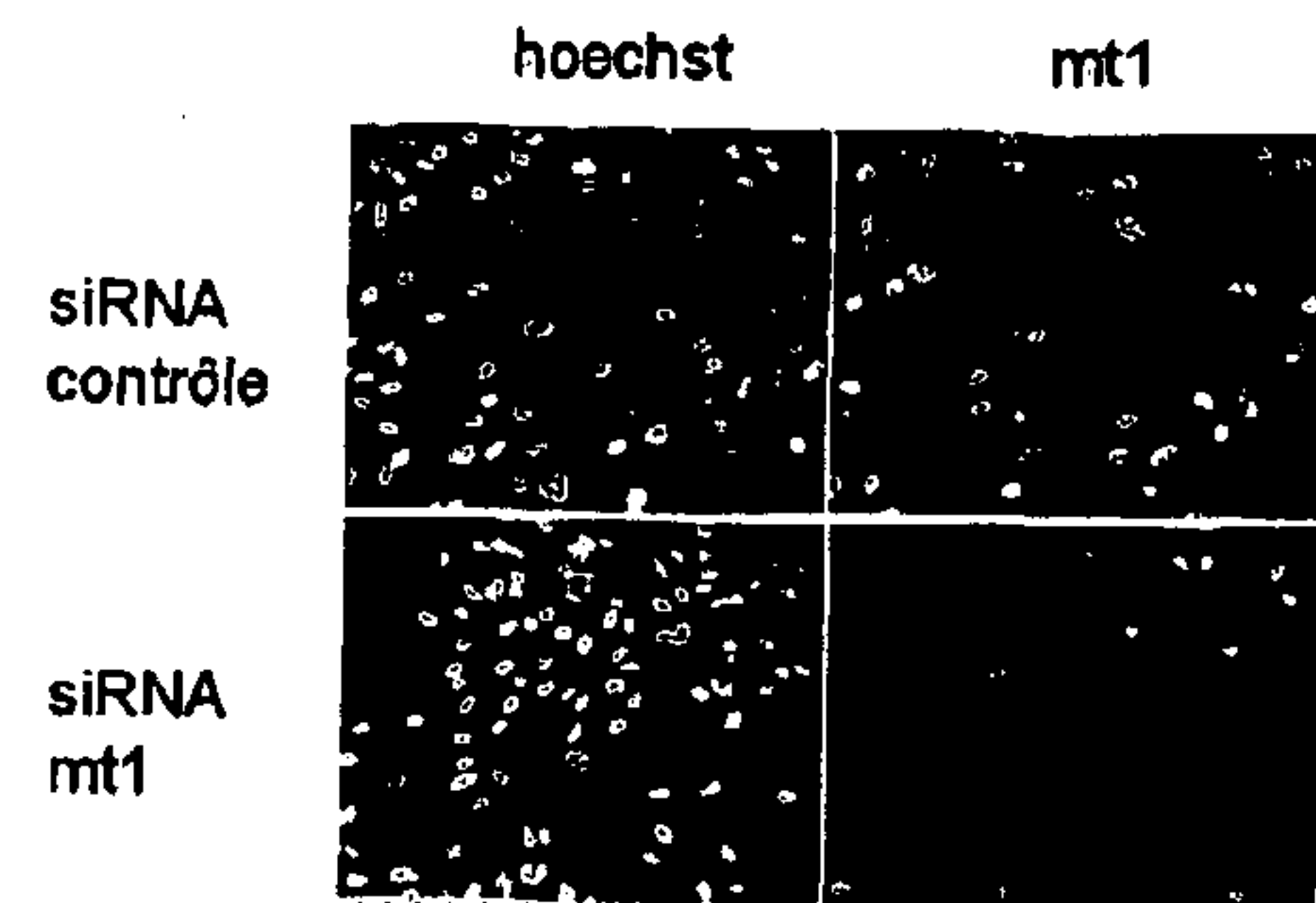


Fig. 5 I

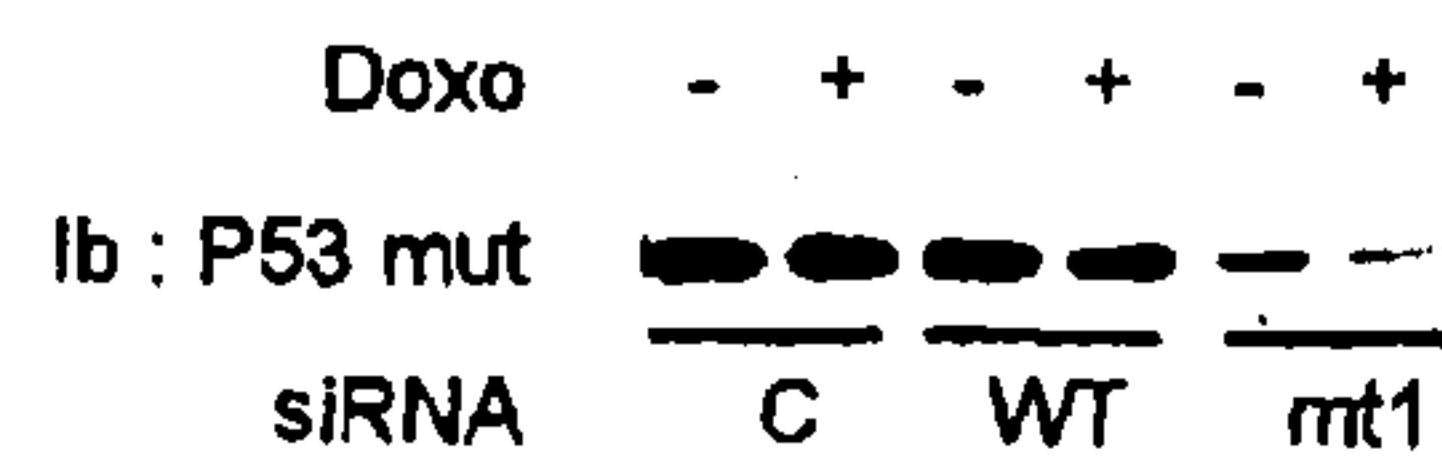


Fig. 5 J

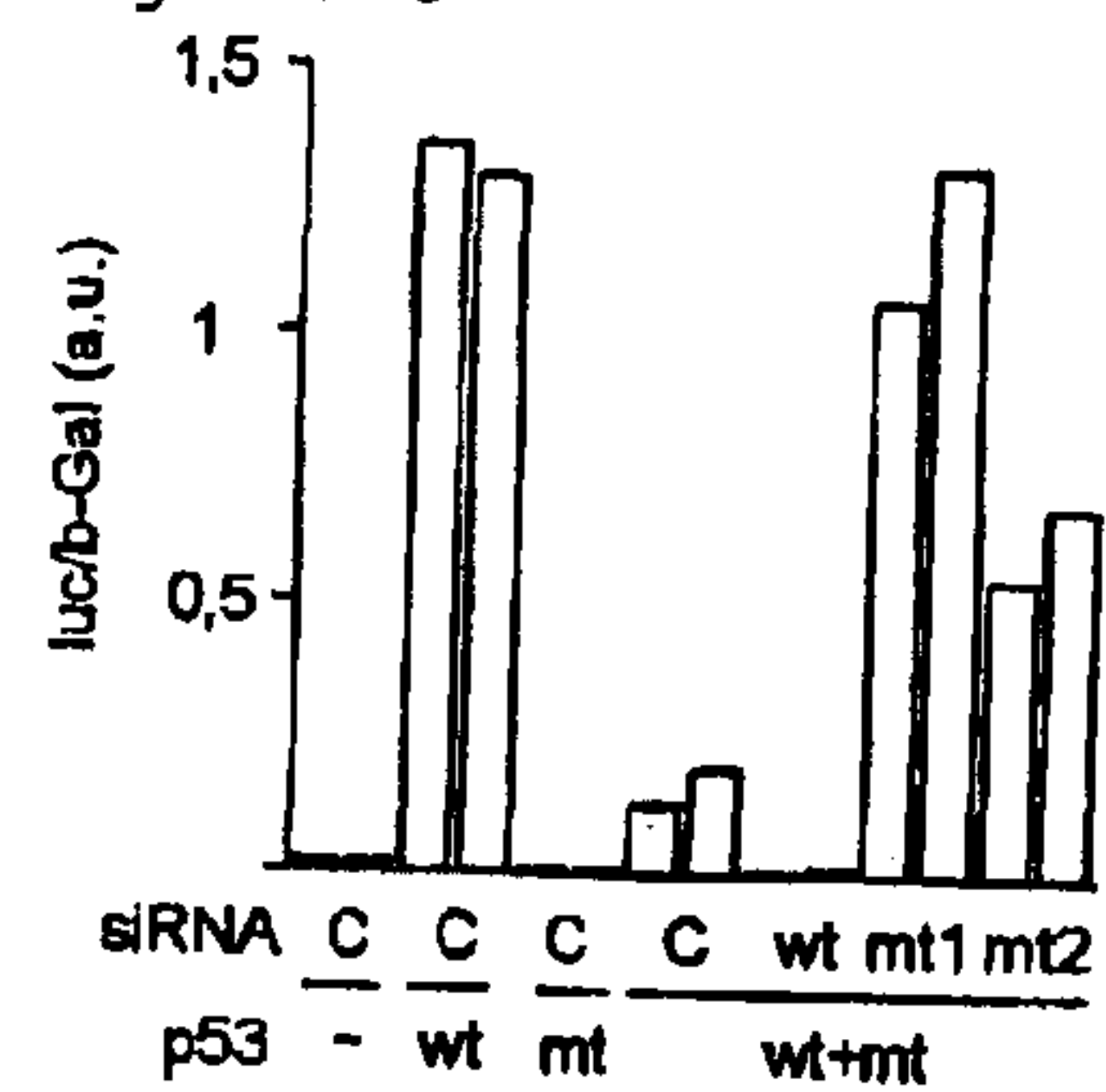
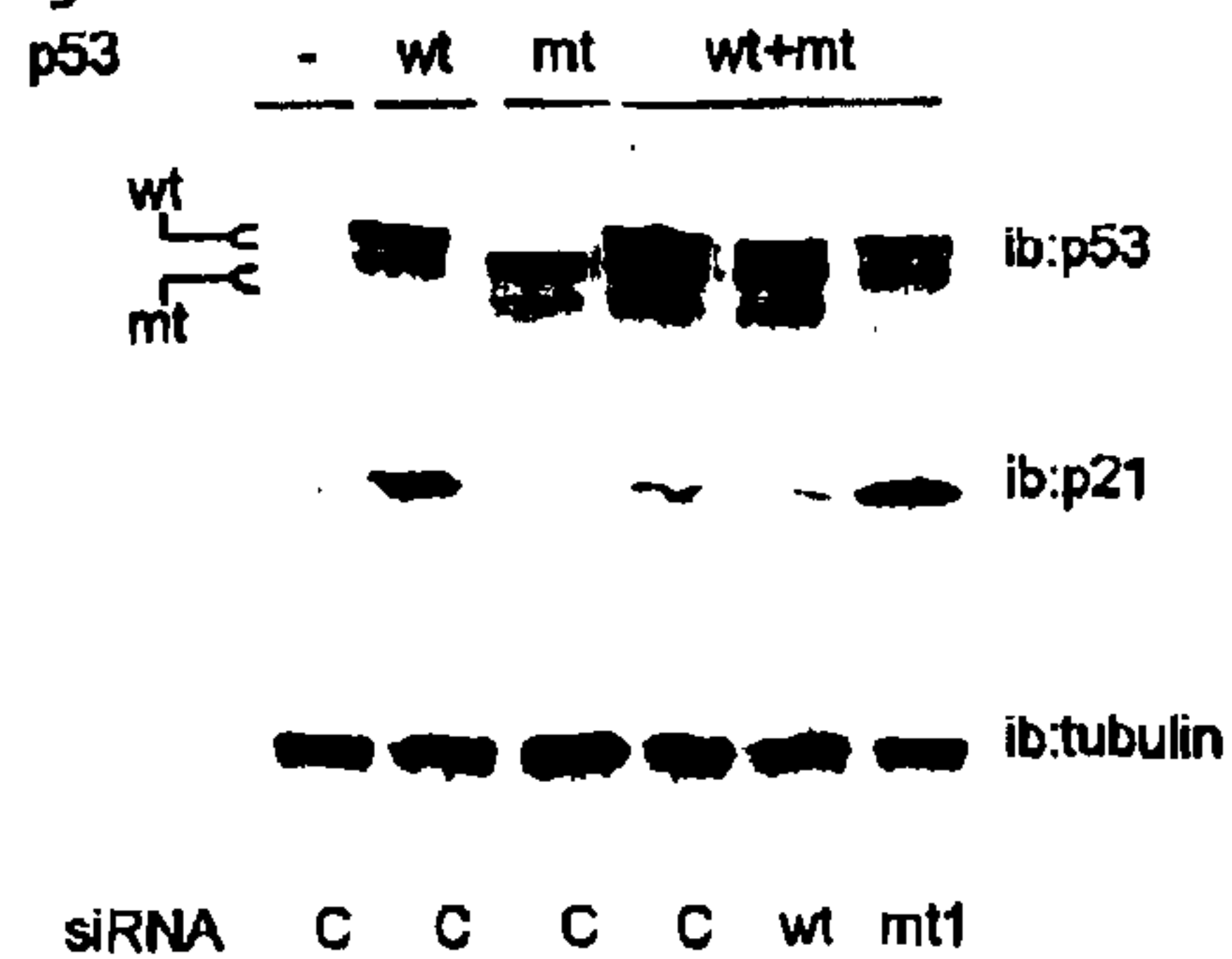


Fig. 5 K



9/14

Fig. 6 A

```

1 actacaataa ttcattgtata aaactaaggg cgtaaccgaa atcggttgaa ccgaaaccgg
61 ttagtataaaa agcagacatt ttatgcacca aaagaagaact gcaatgtttc aggaccacac
121 ggagcgaccc agaaagtac cacagttatg cacagagctg caaacaacta tacatgatat
181 aatattagaa tgtgtgtact gcaagcaaca gttactgcga cgtgaggtat atgactttgc
241 ttttcgggat ttatgcatag tatatagaga tgggaatcca tatgctgtat gtgataaatg
301 tttaaagttt tattctaaaa ttagtgaagta tagacattat tgttatagtt tgtatggaac
361 aacattagaa cagcaataca acaaacctgt gtgtgatttg ttaattaggt gtattaactg
421 tcaaaagcca ctgtgtcctg aagaaaagca aagacatctg gacaaaaagc aaagattcca
481 taatataagg ggtcggtgga ccggtcgatg tatgtcttgt tgcagatcat caagaacacg
541 tagagaaacc cagctgtaat catgcatgga gatacaccta cattgcatga atatattgta
601 gatttgcaac cagagacaac tgatctctac tggtaatgagc aattaatga cagctcagag
661 gaggaggatg aaatagatgg tccagctgga caagcagaac cggacagagc ccattacaat
721 attgtaacct tttgttgcaa gtgtgactct acgcttcggg tgtgcgtaca aagcacacac
781 gtagacattc gtactttgga agacctgtta atgggcacac taggaattgt gtgccccatc
841 tgttctcaga aaccataatc taccatggct gatcctgcag gtaccaatgg ggaagagggt
901 acgggatgta atggatgggt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaaaaac aggggatgct
961 atatcagatg acgagaacga aaatgacagt gatacagggt aagatttggt agattttata
1021 gtaaatgata atgattatit aacacaggca gaaacagaga cagcacatgc gttgtttact
1081 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacagggtc taaaacgaaa gtatttggtta
1141 gtccacttag tgatattagt ggatgtgtag acaataatat tagtcctaga ttaaaagcta
1201 tatgtataga aaaacaaagt agagctgcaa aaaggagatt atttgaaagc gaagacagcg
1261 ggtatggcaa tactgaagtg gaaactcagc agatgttaca ggtagaaggg cgcctatgaga
1321 ctgaaacacc atgtagtcag tatagtgggt gaagtggggg tggttgcagt cagtacagta
1381 gtggaagtgg gggagagggt gttagtgaag gacacactat atgccaacaa ccacttacaa
1441 atatttttaa tgtactaaaa actaggaatg caaaggcagc aatgttagca aaattttaa
1501 agttatacgg ggtgagtttt tcagaattag taagaccatt taaaagtaat aaatcaacgt
1561 gttgcgattg gtgtattgct gcatttggac ttacacccag tatagctgac agtataaaaa
1621 cactattaca acaatattgt ttatatttac acattcaaaag tttagcatgt tcatggggaa
1681 tgggtgtgtt actattagta agatataaat gtggaaaaaa tagagaaaca attgaaaaat
1741 tgctgtctaa actattatgt gtgtctccaa tgtgtatgat gatagagcct ccaaaattgc
1801 gtagtcacag agcagcatta tattgtgtata aaacagggtat atcaaatatt agtgaagtgt
1861 atggagacac gccagaatgg atacaaagac aaacagtatt acaacatagt ttaaatgatt
1921 gtacatttga attatcacag atggtacaat gggcctacga taatgacata gtagacgata
1981 gtgaaattgc atataaatat gcacaattgg cagacactaa tagtaatgca agtgcctttc
2041 taaaaagtaa ttcacaggca aaaattgtaa aggattgtgc aacaatgtgt agacattata
2101 aacgagcaga aaaaaaacia atgagtatga gtcaattggat aaaatataga tgtgataggg
2161 tagatgatgg aggtgattgg aagcaaatgt ttatgttttt aaggtatcaa ggtgtagagt
2221 ttatgtcatt tttactgca ttaaaaagat ttttgcaagg catacctaaa aaaaattgca
2281 tattactata tgggtgcagct aacacaggta aatcattatt tggatgagt ttaatgaaat
2341 ttctgcaagg gtctgttaata tgttttgtaa attctaaaag ccatttttgg ttacaacctat
2401 tagcagatgc caaaataggt atgttagatg atgctacagt gccctgttgg aactacatag
2461 atgacaattt aagaaatgca ttggatggaa atttagtttc tatggatgta aagcatagac
2521 cattgggtaca actaaaatgc cctccattat taattacatc taacattaat gctggtacag
2581 attctaggtg gccttattta cataatagat tgggtggtgt tacatttcct aatgagtttc
2641 catttgacga aaacggaaat ccagtgtatg agcttaatga taagaactgg aaatcctttt
2701 tctcaaggac gtggtccaga ttaagtttgc acgaggacga ggacaaggaa aacgatggag
2761 actctttgcc aacgtttaaa tgtgtgtcag gacaaaatac taacacatta tgaaaatgat
2821 agtacagacc tacgtgacca tatagactat tggaaacaca tgcgcctaga atgtgctatt
2881 tattacaagg ccagagaaat gggattttaa accaagtggg gccaacactg
2941 gctgtatcaa agaataaagc attacaagca attgaactgc aactaacgtt agaaacaata
3001 tataactcac aatatagtaa tgaaaagtgg acattacaag acgttagcct tgaagtgtat
3061 ttaactgcac caacaggatg tataaaaaaa catggatata cagtggaggt gcagtttgat
3121 ggagacatat gcaatacaat gcattatata aactggacac atatatatat ttgtgaagaa
3181 gcatcagtaa ctgtggtaga gggccaagtt gactattatg gtttatatta tgttcatgaa
3241 ggaatacga catattttgt gcagttttaa gatgatgcag aaaaatatag taaaaataaa
3301 gtatgggaag ttcattgcggg tggtcaggta atattatgtc ctacatctgt gtttagcagc
3361 aacgaagtat cctctcctga aattattagg cagcacttgg ccaaccacc cgcgcgacc
3421 cataccaaa cggctgcctt gggcaccgaa gaaacacaga cgactatcca gcgaccaaga
3481 tcagagccag acaccggaaa cccctgccac accactaagt tgttgacag agactcagt
3541 gacagtgtc caatcctcac tgcatttaac agctcacaca aaggacggat taactgtaat
3601 agtaacacta caccatagt acatttaaaa ggtgatgcta atactttaa atgtttaaga
3661 tatagattta aaaagcattg tacattgtat actgcagtgt cgtctacatg gcattggaca
3721 ggacataatg taaaacataa aagtgcatt gttacactta catatgatag tgaatggcaa
3781 cgtgaccaat tttgtctca agttaaata ccaaaaacta ttacagtgtc tactggattt
3841 atgtctatat gacaaatctt gatactgcat ccacaacatt actggcgtgc tttttgcttt
3901 gctttgtgtg cttttgtgtg tctgcctatt aatacgtccg ctgcttttgt ctgtgtctac
3961 atacacatca ttaataatat tggattact attgtggata acagcagcct ctgcttttag

```

10/14

Fig. 6 A (suite)

```

4021 gtgtttttatt gtatatatta tatttggtta tataaccatta tttttaatac atacacatgc
4081 acgctttttta attacataat gtatatgtac ataagttaat tgttacatat aattggtgta
4141 taccataact tactatTTTT tcttttttat ttccatatat aatttttttt tttgtttggt
4201 tgtttgtttt ttaataaact gttattactt aacaatgcga cacaacggtt ctgcadaacg
4261 cacaacacgt gcatcggcta cccaacttta taaaacatgc aaacaggcag gtacatgtcc
4321 acctgacatt atacctaaagg ttgaaggcaa aactattgct gaacaaatat tacaatatgg
4381 aagtatgggt gtattttttg gtgggttagg aattggaaca gggcgggta caggcggacg
4441 cactgggtat attccattgg gaacaaggcc tcccacagct acagatacac ttgctcctgt
4501 aagacccctt ttaacagtag atcctgtggg ccttctgat ccttctatag tttctttagt
4561 ggaagaaact agttttattg atgctgggtg accaacatct gtaccttcca ttccccaga
4621 tgtatcagga tttagtatta ctacttcaac tgataccaca cctgctatat tagatattaa
4681 taatactggt actactgtta ctacacataa taatccact ttcactgacc catctgtatt
4741 gcagcctcca acacctgcag aaactggagg gcattttaca ctttcatcat ccactattag
4801 tacacataat tatgaagaaa ttcctatgga tacatttatt gttagcacia accctaacac
4861 agtaactagt agcacaccca taccagggtc tgcgccagtg gcacgcctag gattatatag
4921 tgcacacaac caacagggtta agttgttaga ccttgccttt gtaaccactc ccactaaact
4981 tattacatat gataatcctg catatgaagg tatagatgtg gataatacat tatatttttc
5041 tagtaatgat aatagtatta atatagctcc agatcctgac tttttggata tagttgcttt
5101 acataggcca gcattaacct ctaggcgtac tggcattagg tacagtagaa ttggtaataa
5161 acaaacacta cgtactcgtg gtggaaaatc tataggtgct aaggtacatt attattatga
5221 ttttaagtact attgatcctg cagaagaaat agaattacaa actataacac cttctacata
5281 tactaccact tcacatgcag cctcacctac ttctattaat aatggattat atgatattta
5341 tgcagatgac tttattacag atactctac aaccocggtt ccatctgtac cctctacac
5401 tttatcaggt tatattcctg caattacaac aattcctttt ggtgggtgcat acaatattcc
5461 tttagtatca ggtcctgata taccatttaa tataactgac caagctcctt cattaattcc
5521 tatagtcca gggctctccac aatatacaat tattgctgat gcaggtgact tttatttaca
5581 tcctagtatt tacatgttac gaaaacgacg taaacgttta ccatattttt tttcagatgt
5641 ctctttgggt gcctagttag gccactgtct acttgcctcc tgtcccagta tctaagggtg
5701 taagcacgga tgaatatgtt gcacgcacia acatatatta tcatgcagga acatccagac
5761 tacttgcagt tggacatccc tatcttccca ttaaaaaacc taacaataac aaaatattag
5821 ttcctaaagt atcaggatta caattacagg tatttagaat acatttacct gacccaataa
5881 agttttggtt tcctgacacc tcattttata atccagatac acagcggctg gtttgggcct
5941 gtgtaggtgt tgaggtaggt cgtggtcagc cattaggtgt gggcattagt ggccatcctt
6001 tattaaataa attggatgac acagaaaatg ctagtgctta tgcagcaaat gcaggtgtgg
6061 ataatagaga atgtatatct atggattaca aacaaacaca attgtgttta attggttgca
6121 aaccacctat aggggaacac tggggcaaaag gatccccatg taccaatgtt gcagtaaate
6181 caggtgattg tccaccatta gacttaataa acacagttat tcaggatggt gatattgttc
6241 atactggctt tgggtgctatg gaotttacta cattacaggc taacaaaagt gaagttccac
6301 tggatatattg tacatctatt tgcaaatatc cagattatat taaaatgggtg tcagaaccat
6361 atggcgacag cttattttttt tatttacgaa ggaacaaat gtttggttaga catttattta
6421 atagggctgg tactgttggg gaaaatgtac cagacgattt atacattaaa ggctctgggt
6481 ctactgcaaa tttagccagt tcaaatattt ttcctacacc tagtggttct atggttacct
6541 ctgatgcca aatattcaat aaaccttatt ggttacaacg agcacagggc cacaataatg
6601 gcatttgttg gggtaaccaa ctatttggtt ctgttgttga tactacacgc agtacaataa
6661 tgtcattatg tgctgccata tctacttcag aaactacata taaaaatact aactttaagg
6721 agtacctacg acatggggag gaatatgatt tacagtttat ttttcaactg tgcaaaataa
6781 ccttaactgc agacgttatg acatacatat attctatgaa ttcactattt ttggaggact
6841 ggaatttttg tctacaacct ccccaggag gcacactaga agatacttat aggtttgtaa
6901 cccaggcaat tgcttgctaa aaacatacac ctccagcacc taaagaagat gatcccccta
6961 aaaaatacac tttttgggaa gtaaatttaa aggaaaagtt ttctgcagac ctagatcagt
7021 ttccttttagg acgcaaat tttactacaag caggattgaa ggccaaacca aaatttacat
7081 taggaaaacg aaaagctaca cccaccacct catctacctc tacaactgct aaacgcaaaa
7141 aacgtaagct gtaagtattg tatgtatgtt gaattagtgt tgtttgttgt gtatatgttt
7201 gtatgtgctt gtatgtgctt gtaaataatta agttgtatgt gtgtttgtat gtatggtata
7261 ataaacacgt gtgtatgtgt ttttaaatgc ttgtgtaact attgtgtcat gcaacataaa
7321 taaacttatt gtttcaacac ctactaatgt tggttggttt attcattgta tataaactat
7381 atttgctaca tcctgttttt gttttatata tactatattt tgtagegcca ggccattttt
7441 gtagcttcaa ccgaattcgg ttgcatgctt tttggcacia aatgtgtttt tttaaatagt
7501 tctatgtcag caactatggt ttaaacttgt acgtttcctg cttgccatgc gtgccaaate
7561 cctgttttcc tgacctgcac tgcttgccaa gctttccatt gttttttaca ctgcactatg
7621 tgcaactact gaatcactat gtacattgtg ccatataaaa taaatcacta tgcgccaacg
7681 ccttacatac cgtgttagg cacatatatt tggttggttt taactaacct aattgcatat
7741 ttggcataag gtttaaacct ctaaggccaa ctaaatgtca ccctagttca tacatgaact
7801 gtgtaaaggt tagtcataca ttgttcattt gtaaaactgc acatgggtgt gtgcaaacgg
7861 attttgggtt acacatttac aagcaactta tataataata ctaa

```

Fig. 6 B

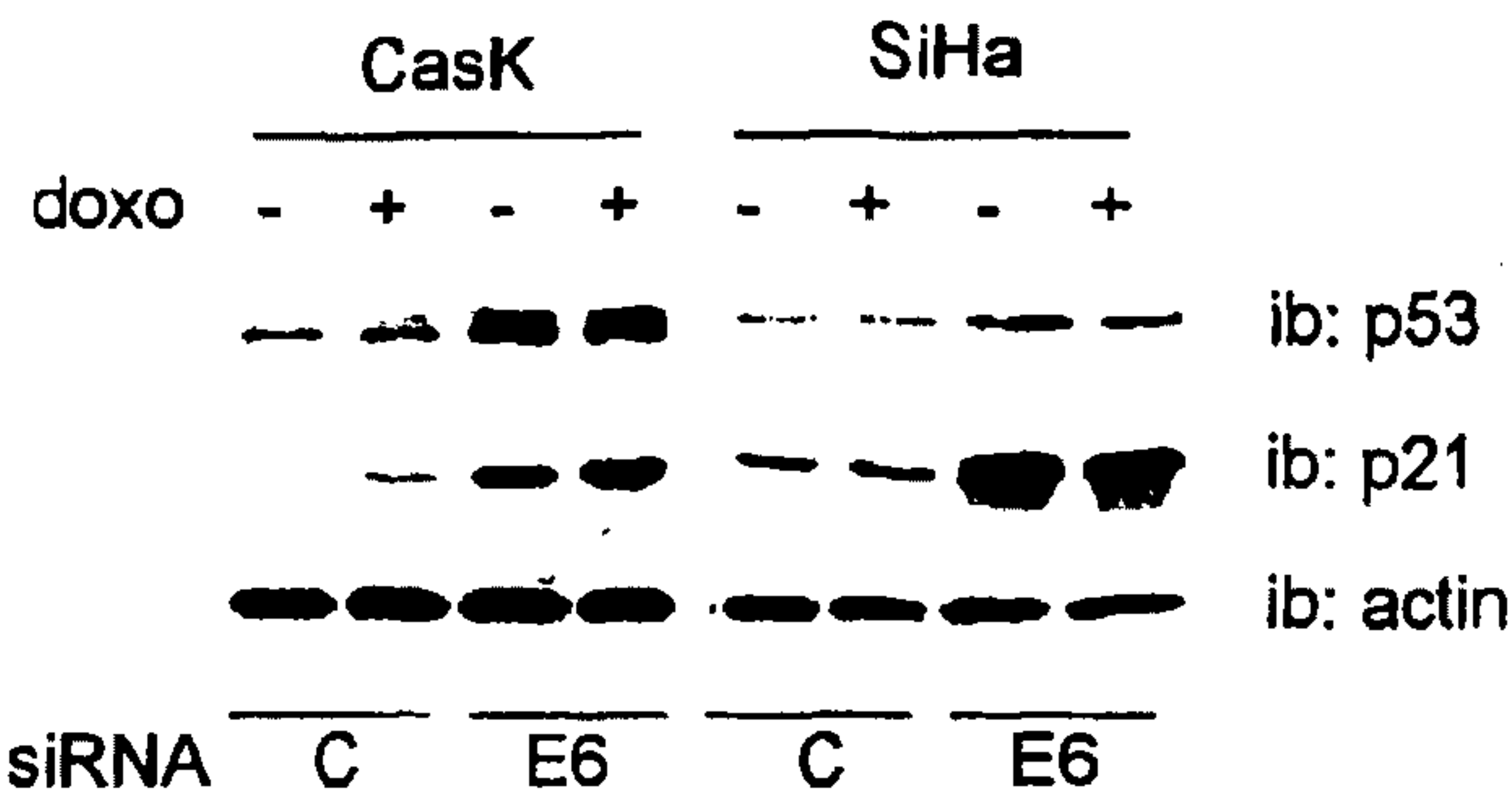


Fig. 6 C

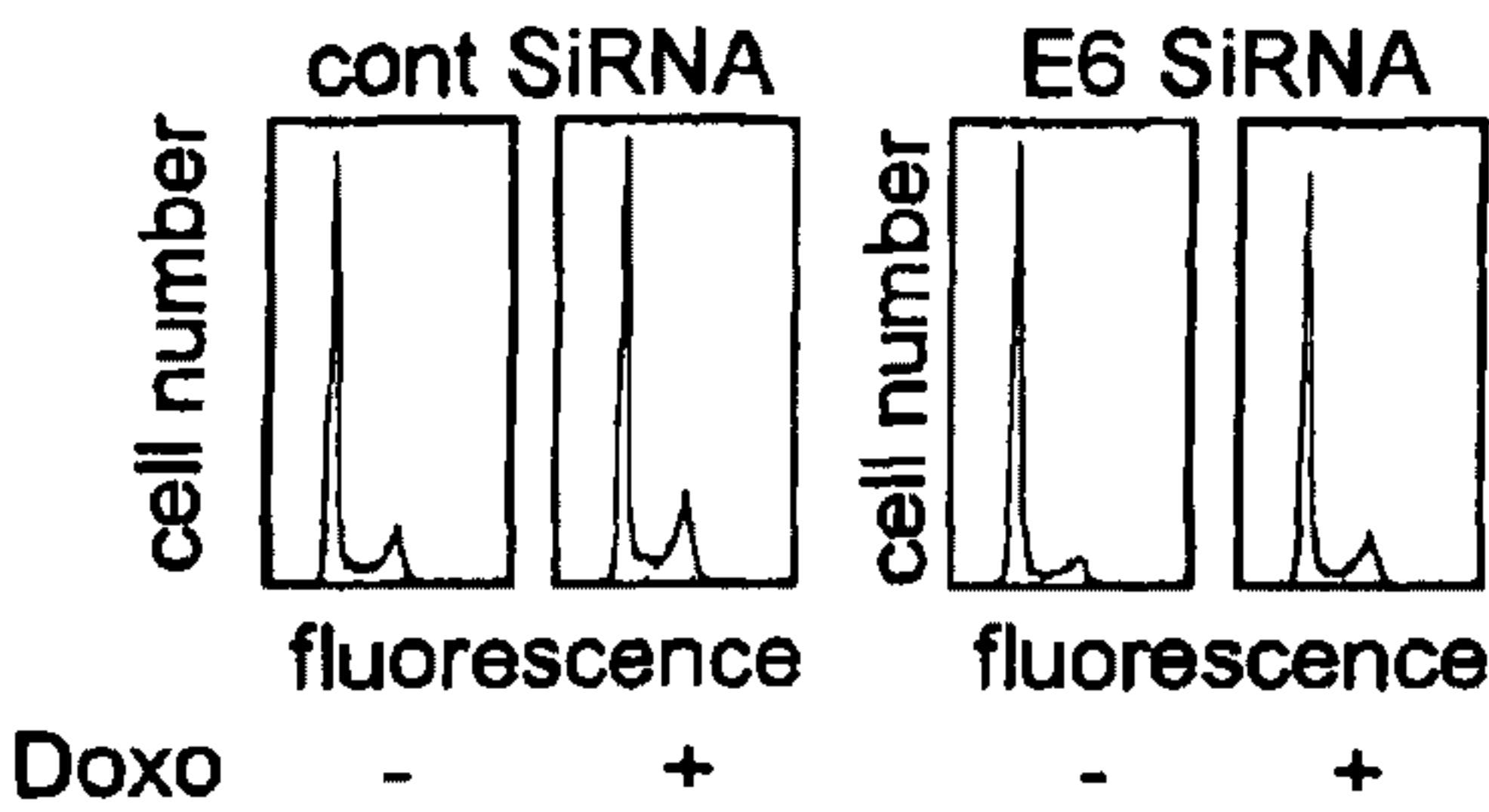
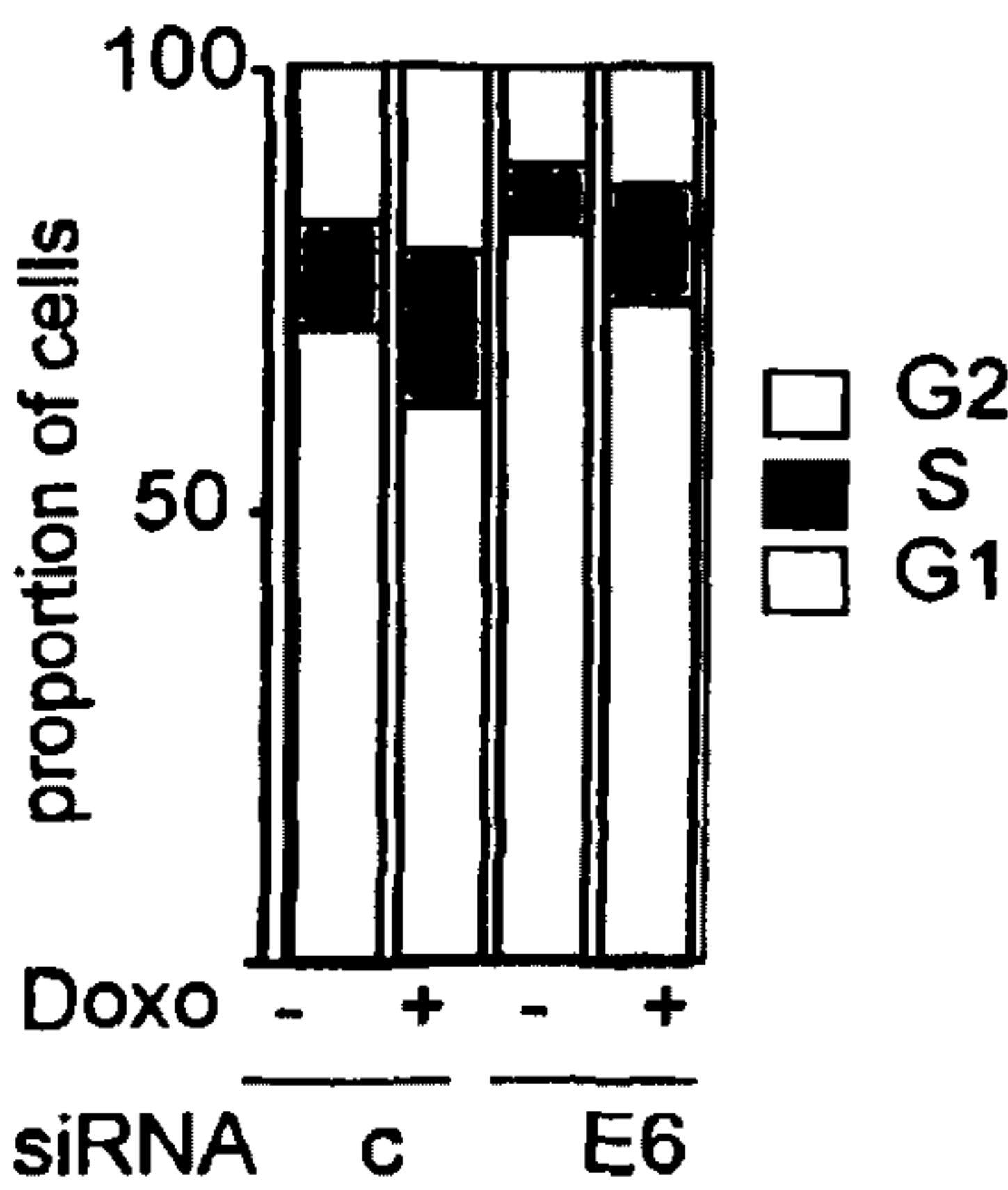


Fig. 6 D



12/14

Fig. 7 A

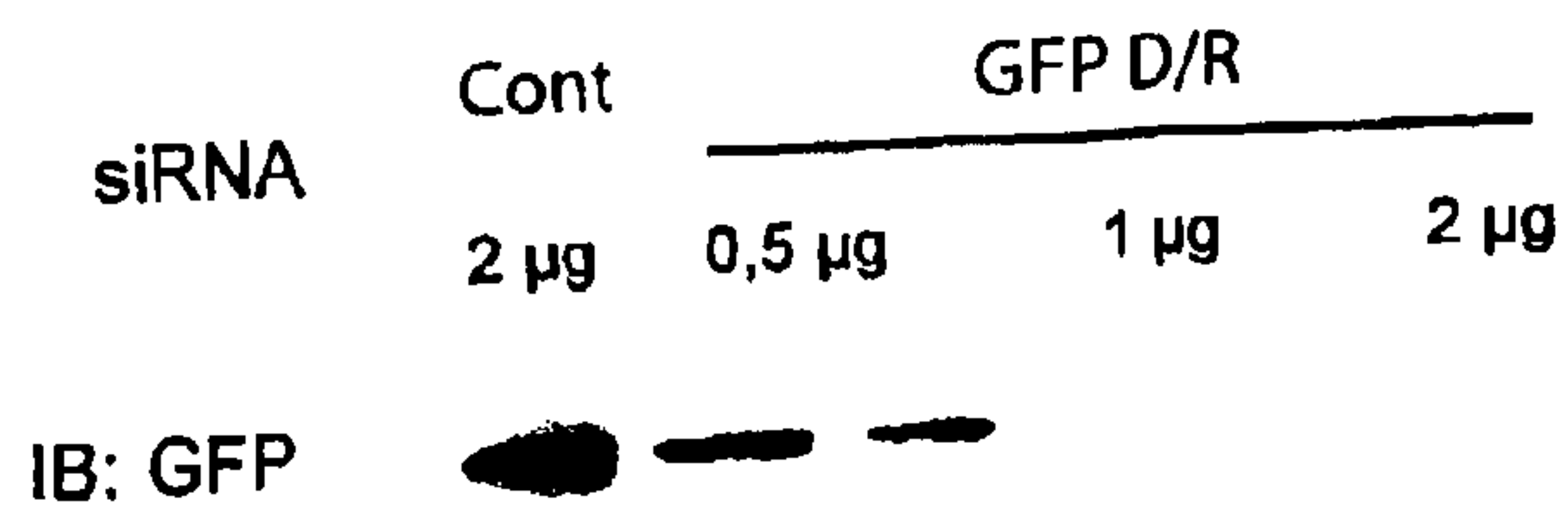


Fig. 7 B

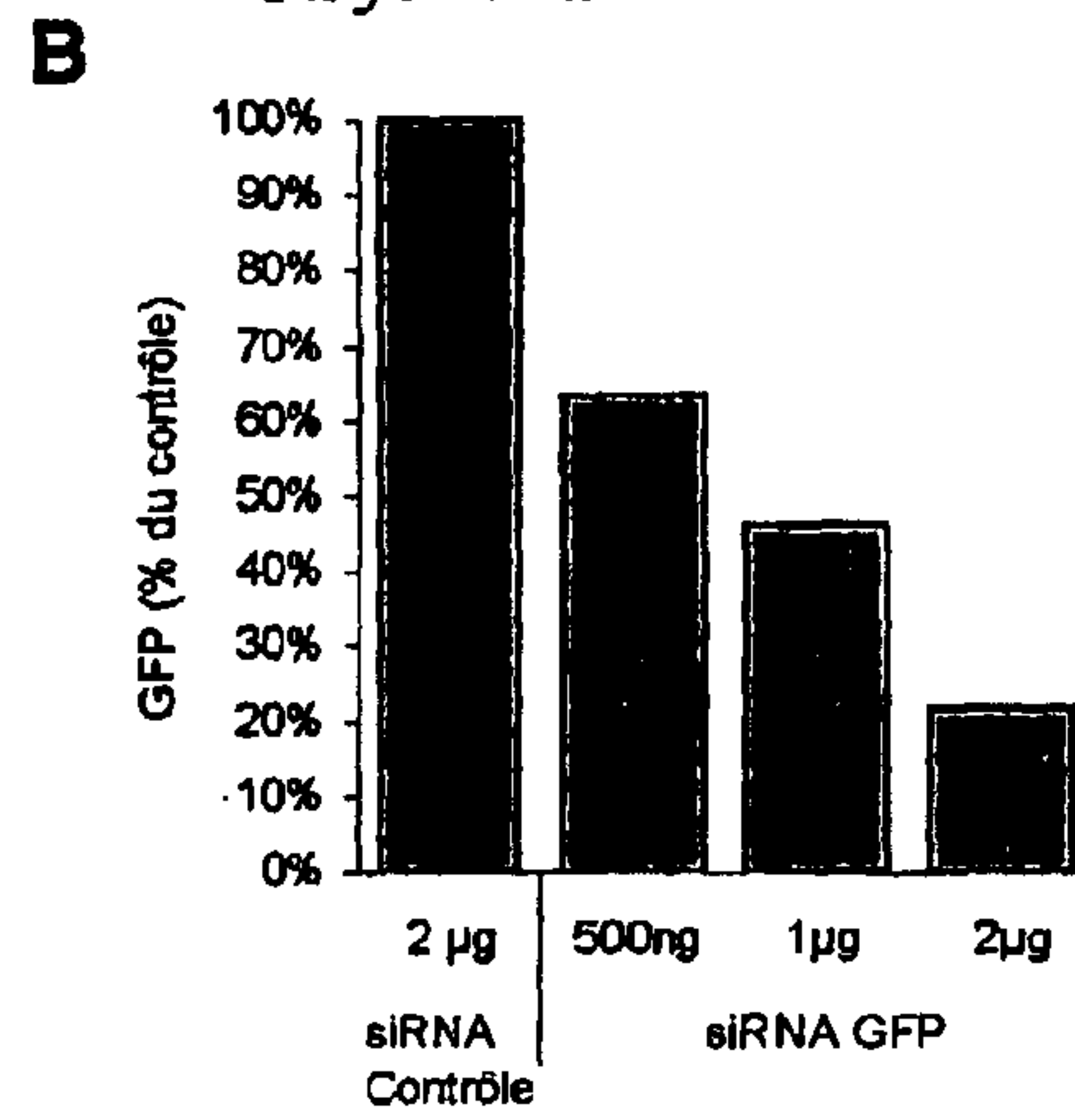


Fig.7 C

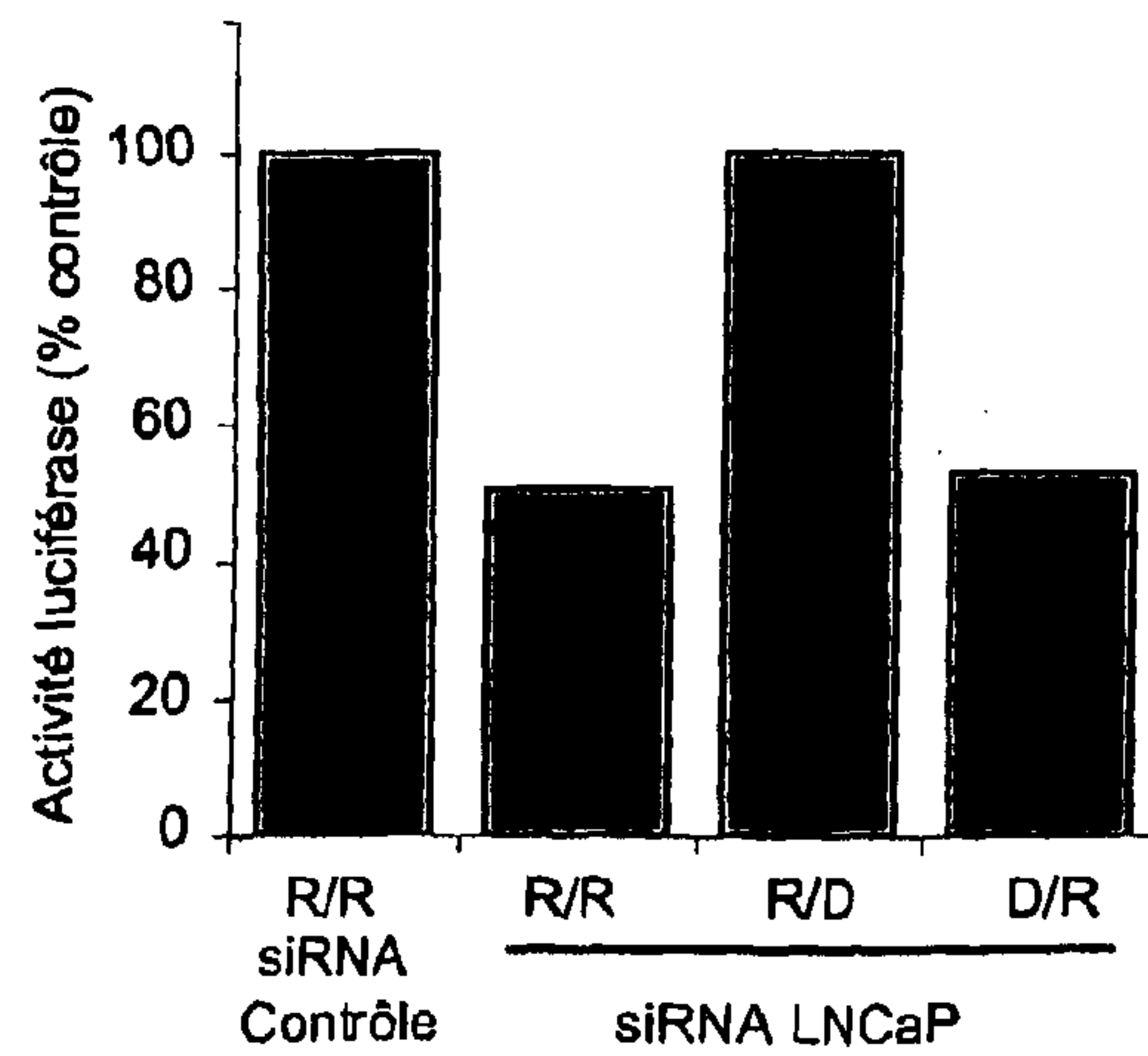


Fig. 7 D

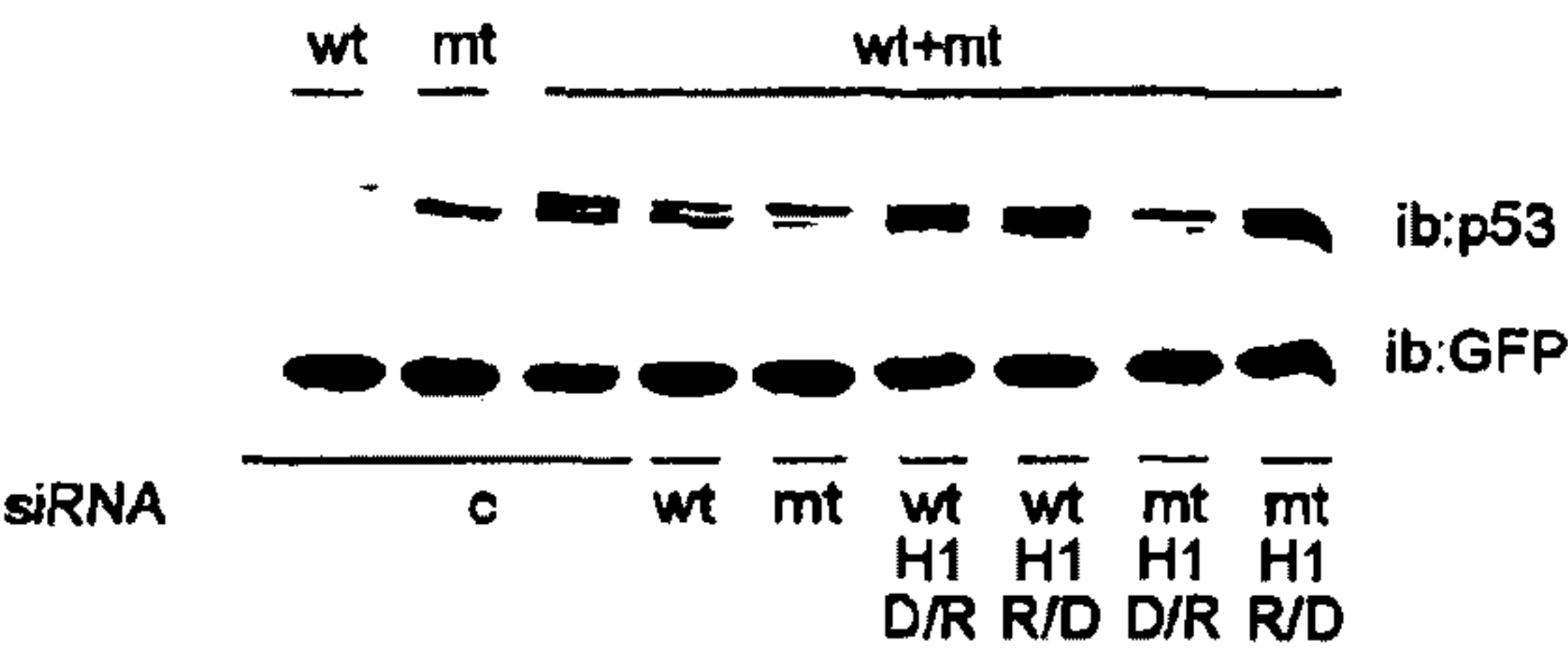
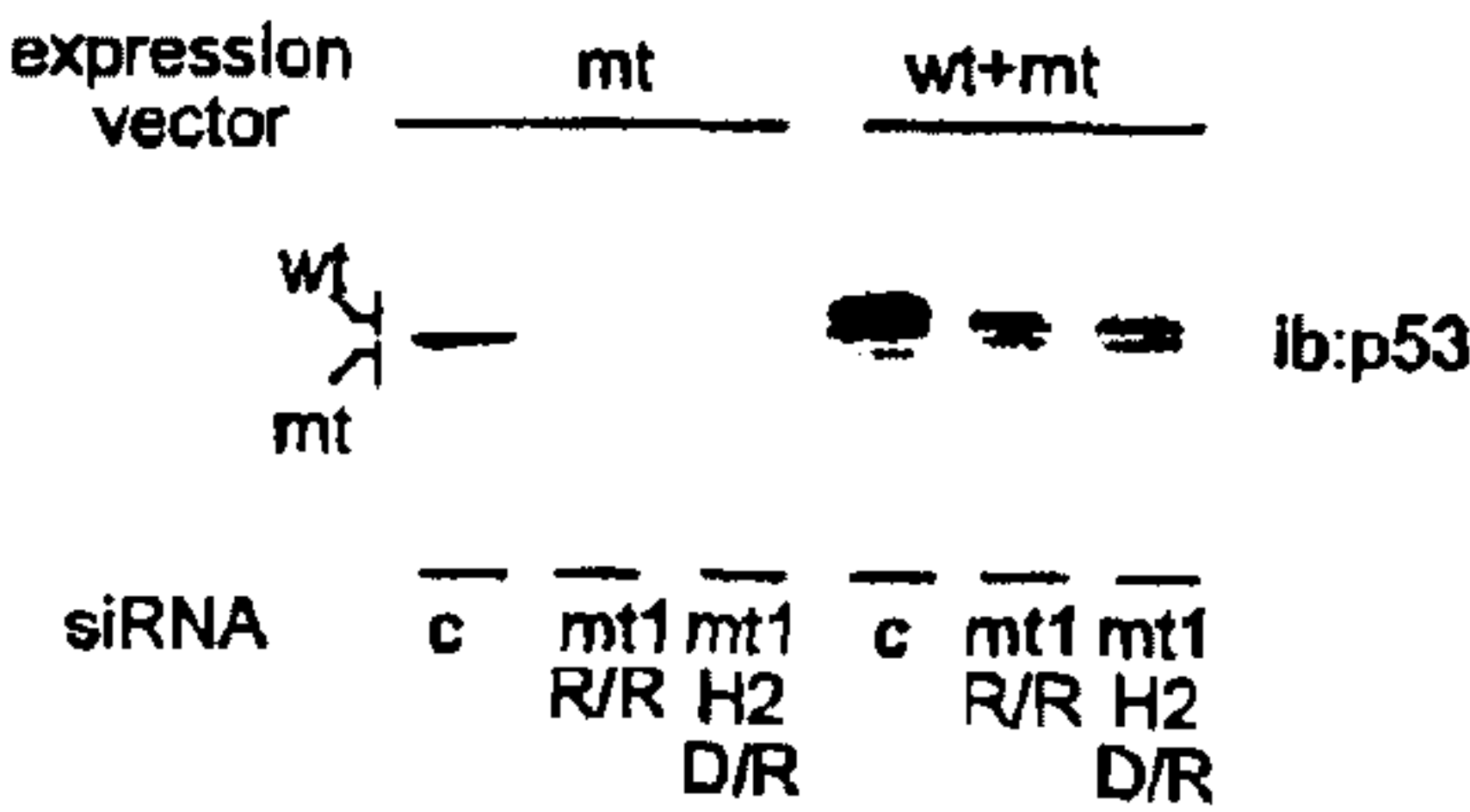


Fig. 7 E



14/14

Fig. 8

