

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3621401号
(P3621401)

(45) 発行日 平成17年2月16日(2005.2.16)

(24) 登録日 平成16年11月26日(2004.11.26)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/50
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 15/10
A 6 1 P 43/00
C 1 2 Q 1/02

GO 1 N 33/50 Z N A Z
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 15/10
A 6 1 P 43/00 1 1 1
C 1 2 Q 1/02

請求項の数 32 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-74464 (P2003-74464)
(22) 出願日 平成15年3月18日(2003.3.18)
(65) 公開番号 特開2003-337131 (P2003-337131A)
(43) 公開日 平成15年11月28日(2003.11.28)
審査請求日 平成15年7月11日(2003.7.11)
(31) 優先権主張番号 10211915.5
(32) 優先日 平成14年3月18日(2002.3.18)
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)
(31) 優先権主張番号 60/365, 371
(32) 優先日 平成14年3月18日(2002.3.18)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 300049958
シエーリング アクチエンゲゼルシャフト
ドイツ連邦共和国 デー-13353 ベ
ルリン ミューラーシュトラッセ 178
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者 ディーター ミュラー
ドイツ国 20249 ハンブルク, シ
ュラムスヴェク 19ハー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的に活性な化合物を同定するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的に活性な化合物を同定するためのキットであって、該キットは、以下：

a) 潜在的な薬学的に活性な化合物を投与された哺乳動物由来の陰茎組織中の、インスリンレセプターの E x 1 1⁺ - スプライス改変体および/または E x 1 1⁻ - スプライス改変体の量をインビトロ分析するための手段；ならびに

b) 該インスリンレセプターの E x 1 1⁺ - スプライス改変体の量の増加および/または E x 1 1⁻ - スプライス改変体の量の減少を引き起こす化合物を選択することを指示することを指示する、指示書

を含む、キット。

【請求項2】

前記状態が勃起機能不全である、請求項1に記載のキット。

【請求項3】

請求項2に記載のキットであって、前記勃起機能不全が、急性勃起機能不全、病的状態の勃起機能不全、加齢依存性の勃起機能不全または勃起機能不全の疾病素質である、キット。

【請求項4】

請求項1～3のうちの1項に記載のキットであって、前記サンプルが、前記動物由来の陰茎組織サンプル、血液サンプルまたは血清サンプルである、キット。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のうちの 1 項に記載のキットであって、ここで、前記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量が、相対量または絶対量である、キット。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のキットであって、ここで、前記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量が、前記サンプル中の該 $E \times 11^+$ - 改変体の量または GAPDH の量に対して、該 $E \times 11^-$ - 改変体の量を比較することによって決定される相対量である、キット。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のうちの 1 項に記載のキットであって、ここで、前記インビトロ分析が、前記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体をコードする核酸の分析を含む、キット。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のキットであって、ここで、前記インビトロ分析が、前記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体をコードする mRNA の分析を含む、キット。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のうちの 1 項に記載のキットであって、ここで、前記インビトロ分析が、 $E \times 11^+$ - スプライス改変体タンパク質および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体タンパク質の分析を含む、キット。

【請求項 10】

請求項 7 ~ 9 のうちの 1 項に記載のキットであって、ここで、前記分析が、PCR、RT-PCR、サザンブロット、ウエスタンブロット、もしくはノーザンブロット、または免疫結合アッセイを介して実行される、キット。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のうちの 1 項に記載のキットであって、ここで、前記哺乳動物がげっ歯類である、キット。

【請求項 12】

前記げっ歯類がラットである、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のうちの 1 項に記載のキットであって、前記指示書は、前記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量を、前記潜在的な薬学的化合物の投与前に同じ動物において決定された同じスプライス改変体の量と比較することをさらに指示する、キット。

【請求項 14】

インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的組成物を調製するための方法であって、該方法は、以下：

a) 請求項 1 ~ 13 のうちの 1 項に従って、薬学的に活性な化合物を同定する工程；および

b) 該化合物を薬学的に受容可能なキャリアと処方する工程
を包含する、方法。

【請求項 15】

前記薬学的組成物が非経口投与のために処方される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記薬学的組成物が注射による投与のために処方される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記薬学的組成物が、局所投与のために処方される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記薬学的組成物が、経口投与のために処方される、請求項 14 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

前記薬学的組成物が、投薬量単位形態で処方される、請求項 14 ~ 18 のうちの 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

哺乳動物におけるインスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態を検出する方法であって、該哺乳動物の陰茎組織におけるインスリンレセプタースプライス改変体の量をインビトロ分析する工程を包含する、方法。

【請求項 21】

前記インスリンレセプタースプライス改変体が、 $E \times 11^{-}$ - 改変体および / または $E \times 11^{+}$ - 改変体である、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 22】

前記状態が勃起機能不全である、請求項 20 ~ 21 のうちの 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記勃起機能不全が、急性勃起機能不全、加齢依存的勃起機能不全、または勃起機能不全に対する疾病素質である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 20 ~ 23 のうちの 1 項に記載の方法であって、前記哺乳動物から陰茎組織サンプル、血液サンプルまたは血清サンプルのようなサンプルを取り出す工程、ならびに該サンプル中のインスリンレセプタースプライス改変体の量を分析する工程をさらに包含する、方法。

20

【請求項 25】

請求項 20 ~ 24 のうちの 1 項に記載の方法であって、ここで、分析される前記インスリンレセプタースプライス改変体の量が、相対量または絶対量である、方法。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の方法であって、ここで、分析される前記インスリンレセプタースプライス改変体の量が、前記サンプル中の、 $E \times 11^{+}$ - スプライス改変体の量または GAPDH の量に対する、 $E \times 11^{-}$ - スプライス改変体の量の比較によって決定される相対量である、方法。

【請求項 27】

請求項 20 ~ 26 のうちの 1 項に記載の方法であって、ここで、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプター改変体をコードする核酸の分析を含む、方法。

30

【請求項 28】

請求項 27 に記載の方法であって、ここで、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプター改変体をコードする mRNA の分析を含む、方法。

【請求項 29】

請求項 20 ~ 28 のうちの 1 項に記載の方法であって、ここで、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプタータンパク質の分析を含む、方法。

【請求項 30】

請求項 27 ~ 29 のうちの 1 項に記載の方法であって、ここで、前記分析が、PCR、RT-PCR、サザンブロット、ウエスタンブロット、もしくはノーザンブロット、または免疫結合アッセイを介して実行される、方法。

40

【請求項 31】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

請求項 20 ~ 31 のうちの 1 項に記載の方法であって、前記インスリンレセプタースプライス改変体の量を、前記状態に罹患していないコントロール哺乳動物のインスリンレセプタースプライス改変体の量と比較する工程をさらに包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

50

(発明の分野)

本発明は、インスリンレセプターの変更された発現によって引き起こされる状態の処置のための、薬学的に活性な化合物を同定する方法に関する。本発明はさらに、インビトロのアッセイを使用する、哺乳動物における状態を診断する方法に関する。本発明はまた、インスリンレセプターの変更された発現によって引き起こされる状態の処置のための、薬学的組成物を調製するための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

(発明の背景)

陰茎の勃起応答は、性的刺激に応答して首尾よい貫入および性交を可能にする、十分な硬さを増大および到達する能力に依存する。このプロセスは、同時の静脈閉塞と組み合わせた、陰茎海綿体および陰茎小動脈中の平滑筋細胞の弛緩の結果として生じ、陰茎海綿体における血液の保持をもたらす。非アドレナリン作用性の、非コリン作用性の神経伝達物質および血管作用性の物質は、平滑筋の緊張の局所的制御を媒介する。能動的な平滑筋の弛緩は、正常な勃起における中心的な段階であると考えられ、そして血管性インポテンスのほとんどの場合に存在する勃起機能不全に関与する重要な段階であり得る(例えば、非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3を参照のこと)。

【0003】

勃起機能不全は、少なくとも50%の試みにおいて、性交に十分な勃起を一貫して獲得または維持できないこととして、定義される(例えば、非特許文献4を参照のこと)。現在、勃起機能不全は、患者の病歴または陰茎のプレチスモグラフィによって決定される。

【0004】

勃起機能不全の重要な危険因子の1つは、年齢であり、これは、一般に、性欲の減少と関連する(例えば、非特許文献5を参照のこと)。この状態において通常見出される問題は、陰茎腫脹の持続時間および程度の減少である。勃起機能不全は、しばしば、血管疾患(例えば、動脈硬化および高血圧)を同時に示すが、海綿体組織における変性性の超微細構造的な細胞変化もまた、勃起不全と関連することが公知である(例えば、非特許文献5、非特許文献6を参照のこと)。

【0005】

アンドロゲンは、男性の性的挙動(陰茎勃起を含む)のいくつかの局面に対する、主な刺激効果を有することが、長く知られてきた。性機能の低下した男性のアンドロゲン処置は、性的な関心および活動を回復することが示されている(例えば、非特許文献7、非特許文献8を参照のこと)。過去数年、いくつかの研究が、ラットの勃起応答に対する、去勢およびテストステロン置換の影響を調査してきた(例えば、非特許文献7を参照のこと)。陰茎において、アンドロゲンの枯渇は、平滑筋のアポトーシス、結合組織含量の相対的増加、および陰茎における機能の低下した弛緩能力を生じる(例えば、非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11を参照のこと)。さらに、アンドロゲンは、ラットにおいて、NO誘導性の勃起活性に最も重要であることが示された(例えば、非特許文献12を参照のこと)。勃起のNO媒介性の刺激に関与する、主なアンドロゲンは、ジヒドロテストステロンである(例えば、非特許文献13、非特許文献14を参照のこと)。従って、加齢が関連する循環アンドロゲンレベルの低下は、加齢が関連する勃起機能不全に寄与し得る可能性があるが、その証拠は、これまでいまだ入手できていない。

【0006】

勃起機能に重要な関連性を有する別のホルモンは、インスリンであり、これは、血管平滑筋、血管内皮またはこれら両方のいずれかに関与する、多くの可能性のある機構によって引き起こされる血管拡張を誘導し得る(例えば、非特許文献15、非特許文献16、非特許文献17、非特許文献18を参照のこと)。インスリンは、過分極および減少したカルシウム流入によって、血管平滑筋に対する直接的な弛緩効果を有することが示されている。インスリンは、培養内皮細胞においてeNOSの発現を調節することによって、NOの生成を増加させ得ることがさらに示唆され、このことは、インスリンレセプターを介した

10

20

30

40

50

NO_sの活性化を示す(例えば、非特許文献19、非特許文献20を参照のこと)。従って、インスリンは、血管緊張を調節し得る。血管損傷から主に生じる、糖尿病に関連する勃起機能不全は、十分調査されている(例えば、非特許文献21、非特許文献22、非特許文献23を参照のこと)。

【0007】

勃起機能不全は、糖尿病に一般的であるので、勃起機能におけるインスリンの関与は、十分実証されている(例えば、非特許文献21、非特許文献24を参照のこと)。ラット陰茎の平滑筋細胞の、一酸化窒素制御された血管拡張および血管収縮の系における、インスリンの可能な役割はまた、インスリンをeNO_sの活性化と関連させる大動脈内皮細胞におけるインスリンの血管拡張効果を実証することによって、提案されてきた(例えば、非特許文献19、非特許文献20、非特許文献25を参照のこと)。

10

【0008】

インスリンの生物学的効果は、膜糖タンパク質によって媒介され、この膜糖タンパク質は、インスリンを結合する2つの細胞外 - サブユニット、および2つの膜貫通 - サブユニットから構成され、細胞内のインスリン誘導性シグナルを伝達するための、固有のチロシンキナーゼ活性を保有する(例えば、非特許文献26、非特許文献27を参照のこと)。ヒトインスリンレセプターは、22個のエキソンからなり、これは、 - サブユニット(エキソン1~11)および - サブユニット(エキソン12~22)をコードする(例えば、非特許文献28を参照のこと)。成熟インスリンレセプターは、2つのアイソフォームとして存在し、これらは、 - サブユニットのカルボキシ末端で12アミノ酸が存在するか存在しないかによって異なる。これらの2つのレセプターアイソフォームは、36塩基対のエキソン11の組織特異的な選択的スプライシングによって生成される(例えば、非特許文献29、非特許文献30、非特許文献31を参照のこと)。これら2つのスプライスアイソフォーム($E \times 11^+$ / $E \times 11^-$)の発現は、ヒト、ラットおよびサルにおいて、組織型に依存して変化する(例えば、非特許文献29、非特許文献30、非特許文献31、非特許文献32を参照のこと)。培養細胞中に発現された2つのインスリンレセプターは、異なる機能的特性を示す。エキソン11を欠くレセプター改変体($E \times 11^-$)は、エキソン11を含む改変体($E \times 11^+$)よりも、インスリンに対するより高い親和性(例えば、非特許文献34、非特許文献35を参照のこと)、およびより高い内部移行速度(例えば、非特許文献36を参照のこと)を示す。対照的に、 $E \times 11^+$ アイソフォームは、より高いインスリン刺激されたチロシンキナーゼ活性を有する(例えば、非特許文献37を参照のこと)。

20

30

【0009】

レセプターの特性は、基本的にスプライシングによって影響されることが報告されている(例えば、非特許文献31、非特許文献32、非特許文献33を参照のこと)。一方では、 $E \times 11^+$ は、増強されたレセプターの自己リン酸化およびレセプターの基質リン酸化を示し、この形態が、 $E \times 11^-$ よりもより効率的にシグナル伝達することを示唆する(例えば、非特許文献37を参照のこと)。他方では、 $E \times 11^-$ レセプタータンパク質は、インスリンに対するより高い親和性および増加した内部移行速度を示す(例えば、非特許文献34、非特許文献35、非特許文献36を参照のこと)。

40

【0010】

肝臓、筋肉および心臓におけるインスリンレセプターの発現に対する加齢の影響は、Vidalらによって分析された(例えば、非特許文献38を参照のこと)。この著者らは、加齢が、肝臓および心臓において、総インスリンレセプターmRNAレベルの有意な減少を誘導することを実証したが、筋肉については変更が記載されなかった。3つ全ての組織において、 $E \times 11^+$ mRNAの割合は、有意に減少した。Wiersmaらによる研究(例えば、非特許文献39を参照のこと)は、12月齢のラットが、肝臓、心臓および脛骨筋における $E \times 11^+$ mRNAの相対的発現の有意な減少によって特徴付けられたことを明らかにした(例えば、非特許文献39を参照のこと)。他方では、彼らは、加齢の影響が、 $E \times 11^-$ mRNAの改変なしに、これらの組織中の $E \times 11^+$ mRNA

50

の絶対レベルの減少に一致することを示した。

【0011】

現在、勃起機能不全を処置するための医薬は、ほとんど存在しない。しかし、これらの医薬は、全ての患者において効果的であるわけではない。さらに、この化合物の副作用が、処置を必要とする多くの患者に対して、この化合物を使用することを不可能にしている。

【0012】

結果的に、勃起機能不全の処置において有用な新規化合物を同定する必要性がなお存在する。しかし、現在まで、化合物がこのような状態の処置において有効であるか否かを評価することを可能にする、信頼できるスクリーニング方法は存在しない。

【0013】

【非特許文献1】

Andersson K - E , Wagner G . 1995 Physiol Rev 75 : 191 - 236

【0014】

【非特許文献2】

Lue T , Dahiya M . 1997 Mol Urol 1 : 35 - 48

【0015】

【非特許文献3】

Udelson D , Nehra A , Hatzichristou D , Azadoi A , Moreland RB , Krane RJ , Saenz de Tejada I , Goldstein I . 1998 Int J Impot Res 10 : 15 - 24

【0016】

【非特許文献4】

Fran E , Kaiser MD . 1999 Med Clin North Am 83 : 1267 - 1278

【0017】

【非特許文献5】

Monga M . 1999 Geriatr Nephrol Urol 9 : 27 - 37

【0018】

【非特許文献6】

Morgentaler A . 1999 Lancet 354 : 1713 - 1718

【0019】

【非特許文献7】

Mills TM , Dai Y , Stopper VS , Lewis RW . 1999 Steroids 64 : 605 - 609

【0020】

【非特許文献8】

Aversa A , Isidori AM , De Martino MU , Caprio M , Fabbri A , Rocchietti - March M , Frajese G , Fabbri A . 2000 Clin Endocrinol 53 : 517 - 522

【0021】

【非特許文献9】

Baskin LS , Sutherland RS , Di Sandro MJ , Hayward SW , Lipschultz J , Cunha GR . 1997 J Urol 158 : 1113 - 1118

【0022】

【非特許文献10】

10

20

30

40

50

- Shabsigh R. 1997 World J Urol 15:21-26
 【0023】
 【非特許文献11】
- Traish AT, Park K, Kim NN, Moreland RB, Goldstein I. 1999 Endocrinology 140:1861-1868
 【0024】
 【非特許文献12】
- Reilly CM, Zamorano P, Stopper VS, Mills TM. 1997 J Androl 18:110-115
 【0025】 10
 【非特許文献13】
- Lugg JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. 1995 Endocrinology 136:1495-1501
 【0026】
- 【非特許文献14】
- Schirar A, Bonnefond C, Meusnier C, Devinoy E. 1997 Endocrinology 138:3093-3102
 【0027】
- 【非特許文献15】
- Feener EP, King GL. 1997 Lancet 350(suppl 1) :SI9-SI13 20
 【0028】
- 【非特許文献16】
- Scherrer U, Sartorio C. 1997 Circulation 96:4104-4113
 【0029】
- 【非特許文献17】
- Baron AD, Brechtel-Hook C, Johnson A, Cronin J, Learning R, Steinberg HO. 1996 Am J Physiol 271:E1067-E1072 30
 【0030】
- 【非特許文献18】
- Yki-Jarvinen H, Utriainen T. 1998 Diabetologia 41:369-379
 【0031】
- 【非特許文献19】
- Zeng G, Quon MJ. 1996 J Clin Invest 98:894-898
 【0032】
- 【非特許文献20】 40
- Kuboki K, Jiang ZH, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. 2000 Circulation 101:676-681
 【0033】
- 【非特許文献21】
- El-Rufaie OEF, Bener A, Abuzeid MSO, Ali TA. 1997 J Psychosom Res 43:605-612
 【0034】
- 【非特許文献22】 50

- McKendrick JD, Salas E, Dube GP, Murat J, Russell JC, Radomski MW, 1998 B J Urol 124:361-369
 【0035】
 【非特許文献23】
- Honing MLH, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ESG, Rabelink TJ. 1998 Diabetes Metab Rev 14:241-249
 【0036】
 【非特許文献24】 10
- Rehman J, Chenven E, Brink P, Peterson B, Walcott B, Wen YW, Melman A, Christ G. 1997 Am J Physiol (Heart Circ Physiol 41):H1960-1971
 【0037】
 【非特許文献25】
- Kahn AM, Husid A, Allen JC, Seidel C, Song T. 1997 Hypertension 30:928-933
 【0038】
 【非特許文献26】 20
- Rosen OM. 1987 Science 237:1452-1458
 【0039】
 【非特許文献27】
- White MF, Kahn CR. 1994 J Biol Chem 269:1-4
 【0040】
 【非特許文献28】
- Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:114-118
 【0041】 30
 【非特許文献29】
- Seino S, Bell GI. 1989 Biochem Biophys Res Commun 159:312-316
 【0042】
 【非特許文献30】
- Goldstein BJ, Dudley AL. 1990 Mol Endocrinol 4:235-244
 【0043】
 【非特許文献31】
- Sugimoto K, Murakawa Y, Zhang W, Xu G, Sima AAF. 2000 Diabetes/Metab Res Rev 16:354-363
 【0044】 40
 【非特許文献32】
- Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. 1989 Mol Endocrinol 3:1263-1269
 【0045】
 【非特許文献33】
- Huang Z, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Hansen BC, Shuldiner AR. 1994 J Clin Invest 14:1289-1 50

296

【0046】

【非特許文献34】

Mostaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ulrich A, McClain DA. 1990 EMBO J 9:2409-2413

【0047】

【非特許文献35】

McClain DA. 1991 Mol Endocrinol 5:734-739

【0048】

【非特許文献36】

Kellerer M, Lammers R, Ermel B, Tippmer S, Vogt B, Obermaier-Kusser B, Ulrich A, Haring HU. 1992 Biochemistry 13:4588-4598

【0049】

【非特許文献37】

Yamaguchi Y, Flier JS, Yokota A, Benecke H, Backer JM, Moller DE. 1991 Endocrinology 129:2058-2066

【0050】

【非特許文献38】

Vidal H, Auboeuf D, Beylot M, Riou JP. 1995 Diabetes 44:1196-1201

【0051】

【非特許文献39】

Wiersma MML, Auboeuf D, Nieuwenhuizen-Bakker IM, Radder JK, Riou JP, Vidal H. 1997. Am J Physiol 272:E607-E615

【0052】

【発明が解決しようとする課題】

従って、勃起機能不全を処置する方法、勃起機能不全を処置するための医薬を提供すること、勃起機能不全の処置において有用な新規化合物を同定すること、そしてこのような化合物がこのような状態の処置において有効であるか否かを評価することを可能にする、信頼できるスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0053】

【課題を解決するための手段】

(発明の要旨)

この問題は、インスリンレセプターの変更された発現によって引き起こされる状態の処置のための、薬学的に活性な化合物を同定する方法によって解決され、この方法は、以下の工程：

- a) 可能性のある薬学的に活性な化合物を、哺乳動物に投与する工程；ならびに
- b) 続いて、この哺乳動物の陰茎組織におけるインスリンレセプターの $E \times 11^+$ スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体の量をインピトロで分析する工程；ならびに
- c) インスリンレセプターの $E \times 11^+$ スプライス改変体の量の増加および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体の量の減少を生じる化合物を選択する工程、を包含する。

【0054】

1つの局面において、本発明は、インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的に活性な化合物を同定するためのキットであって、上記キットは、以下：

- a) 潜在的な薬学的に活性な化合物を投与された哺乳動物由来のサンプル中の、インスリ

10

20

30

40

50

ンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量をインビトロ分析するための手段 ; ならびに

b) 上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体の量の増加および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量の減少を引き起こす化合物を選択することを指示することを指示する、指示書を含む、キットを提供する。

【0055】

1つの実施形態において、上記状態が勃起機能不全である、上記のキットを提供する。

【0056】

1つの実施形態において、上記勃起機能不全が、急性勃起機能不全、病的状態の勃起機能不全、加齢依存性の勃起機能不全または勃起機能不全の疾病素質である、上記キットを提供する。

10

【0057】

1つの実施形態において、上記サンプルが、上記動物由来の陰茎組織サンプル、血液サンプルまたは血清サンプルである、上記キットを提供する。

【0058】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量が、相対量または絶対量である、上記キットを提供する。

【0059】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量が、上記サンプル中の上記 $E \times 11^+$ - 改変体の量または GAPDH の量に対して、上記 $E \times 11^-$ - 改変体の量を比較することによって決定される相対量である、上記キットを提供する。

20

【0060】

1つの実施形態において、上記インビトロ分析が、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体をコードする核酸の分析を含む、上記キットを提供する。

【0061】

1つの実施形態において、上記インビトロ分析が、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体をコードする mRNA の分析を含む、上記キットを提供する。

30

【0062】

1つの実施形態において、上記インビトロ分析が、 $E \times 11^+$ - スプライス改変体タンパク質および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体タンパク質の分析を含む、上記キットを提供する。

【0063】

1つの実施形態において、上記分析が、PCR、RT-PCR、サザンブロット、ウエスタンブロット、もしくはノーザンブロット、または免疫結合アッセイを介して実行される、上記キットを提供する。

40

【0064】

1つの実施形態において、上記哺乳動物がげっ歯類である、上記キットを提供する。

【0065】

1つの実施形態において、上記げっ歯類がラットである、上記キットを提供する。

【0066】

1つの実施形態において、上記指示書は、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および / または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量を、上記潜在的な薬学的化合物の投与前に同じ動物において決定された同じスプライス改変体の量と比較することをさらに指示する、上記キットを提供する。

【0067】

50

1つの局面において、インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的組成物を調製するための方法であって、上記方法は、以下：

a) 上記に従って、薬学的に活性な化合物を同定する工程；および

b) 上記化合物を薬学的に受容可能なキャリアと処方する工程

を包含する、方法を提供する。

【0068】

1つの実施形態において、上記薬学的組成物が非経口投与のために処方される、上記方法を提供する。

【0069】

1つの実施形態において、上記薬学的組成物が注射による投与のために処方される、上記方法を提供する。 10

【0070】

1つの実施形態において、上記薬学的組成物が、局所投与のために処方される、上記方法を提供する。

【0071】

1つの実施形態において、上記薬学的組成物が、経口投与のために処方される、上記方法を提供する。

【0072】

1つの実施形態において、上記薬学的組成物が、投薬量単位形態で処方される、上記方法を提供する。 20

【0073】

1つの局面において、哺乳動物におけるインスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態を検出する方法であって、上記哺乳動物の陰茎組織におけるインスリンレセプタースプライス改変体の量をインビトロ分析する工程を包含する、方法を提供する。

【0074】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプタースプライス改変体が、 $E \times 11^{-}$ - 改変体および/または $E \times 11^{+}$ - 改変体である、上記方法を提供する。

【0075】

1つの実施形態において、上記状態が勃起機能不全である、上記方法を提供する。 30

【0076】

1つの実施形態において、上記勃起機能不全が、急性勃起機能不全、加齢依存的勃起機能不全、または勃起機能不全に対する疾病素質である、上記方法を提供する。

【0077】

1つの実施形態において、上記哺乳動物から陰茎組織サンプル、血液サンプルまたは血清サンプルのようなサンプルを取り出す工程、ならびに上記サンプル中のインスリンレセプタースプライス改変体の量を分析する工程をさらに包含する、上記方法を提供する。

【0078】

1つの実施形態において、分析される上記インスリンレセプタースプライス改変体の量が、相対量または絶対量である、上記方法を提供する。 40

【0079】

1つの実施形態において、分析される上記インスリンレセプタースプライス改変体の量が、上記サンプル中の、 $E \times 11^{+}$ - スプライス改変体の量またはGAPDHの量に対する、 $E \times 11^{-}$ - スプライス改変体の量の比較によって決定される相対量である、上記方法を提供する。

【0080】

1つの実施形態において、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプター改変体をコードする核酸の分析を含む、上記方法を提供する。

【0081】

1つの実施形態において、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプター改変体をコ 50

ードする mRNA の分析を含む、上記方法を提供する。

【0082】

1つの実施形態において、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプタータンパク質の分析を含む、上記方法を提供する。

【0083】

1つの実施形態において、上記分析が、PCR、RT-PCR、サザンブロット、ウエスタンブロット、もしくはノーザンブロット、または免疫結合アッセイを介して実行される、上記方法を提供する。

【0084】

1つの実施形態において、上記哺乳動物がヒトである、上記方法を提供する。

10

【0085】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプタースプライス改変体の量を、上記状態に罹患していないコントロール哺乳動物のインスリンレセプタースプライス改変体の量と比較する工程をさらに包含する、上記方法を提供する。

【0086】

1つの局面において、インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的に活性な化合物を同定するための方法であって、上記方法は、以下：

a) 潜在的な、薬学的に活性な化合物を哺乳動物に投与する工程；

b) 引続いて、上記哺乳動物由来の陰茎組織中のインスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量をインビトロ分析する工程；ならびに

20

c) 上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体の量の増加および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量の減少を引き起こす化合物を選択する工程、を包含する、方法を提供する。

【0087】

1つの実施形態において、上記状態が勃起機能不全である、上記方法を提供する。

【0088】

1つの実施形態において、上記勃起機能不全が、急性勃起機能不全、病的状態の勃起機能不全、加齢依存性の勃起機能不全または勃起機能不全の疾病素質である、上記方法を提供

30

【0089】

1つの実施形態において、上記動物から陰茎組織サンプル、血液サンプルまたは血清サンプルのようなサンプルを取り出す工程、ならびに上記サンプル中の上記 $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または上記 $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量を分析する工程をさらに包含する、上記方法を提供する。

【0090】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量が、相対量または絶対量である、上記方法を提供する。

40

【0091】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量が、上記サンプル中の、上記 $E \times 11^+$ - 改変体の量または GAPDH の量に対する、 $E \times 11^-$ - 改変体の量の比較によって決定される相対量である、上記方法を提供する。

【0092】

1つの実施形態において、上記インビトロ分析する工程が、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体をコードする核酸の分析を含む、上記方法を提供する。

【0093】

50

1つの実施形態において、上記インビトロ分析する工程が、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体をコードする mRNA の分析を含む、上記方法を提供する。

【0094】

1つの実施形態において、上記インビトロ分析する工程が、 $E \times 11^+$ - スプライス改変体タンパク質および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体タンパク質の分析を含む、上記方法を提供する。

【0095】

1つの実施形態において、上記分析が、PCR、RT-PCR、サザンブロット、ウエスタンブロット、もしくはノーザンブロット、または免疫結合アッセイを介して実行される、上記方法を提供する。 10

【0096】

1つの実施形態において、上記哺乳動物がげっ歯類である、上記方法を提供する。

【0097】

1つの実施形態において、上記げっ歯類がラットである、上記方法を提供する。

【0098】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプターの $E \times 11^+$ - スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量を、上記潜在的な薬学的化合物の投与前に同じ動物において決定された同じスプライス改変体の量と比較する工程をさらに包含する、上記方法を提供する。 20

【0099】

1つの局面において、哺乳動物においてインスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の診断方法であって、上記哺乳動物の陰茎組織におけるインスリンレセプタースプライス改変体の量をインビトロ分析する工程を包含する、方法を提供する。

【0100】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプタースプライス改変体が、 $E \times 11^-$ - 改変体および/または $E \times 11^+$ - 改変体である、上記方法を提供する。

【0101】

1つの実施形態において、上記状態が勃起機能不全である、上記方法を提供する。

【0102】

1つの実施形態において、上記勃起機能不全が、急性勃起機能不全、加齢依存的勃起機能不全、または勃起機能不全に対する疾病素質である、上記方法を提供する。 30

【0103】

1つの実施形態において、上記哺乳動物から陰茎組織サンプル、血液サンプルまたは血清サンプルのようなサンプルを取り出す工程、ならびに上記サンプル中のインスリンレセプタースプライス改変体の量を分析する工程をさらに包含する、上記方法を提供する。

【0104】

1つの実施形態において、分析される上記インスリンレセプタースプライス改変体の量が、相対量または絶対量である、上記方法を提供する。

【0105】

1つの実施形態において、分析される上記インスリンレセプタースプライス改変体の量が、上記サンプル中の、 $E \times 11^+$ - スプライス改変体の量または GAPDH の量に対する、 $E \times 11^-$ - スプライス改変体の量の比較によって決定される相対量である、上記方法を提供する。 40

【0106】

1つの実施形態において、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプター改変体をコードする核酸の分析を含む、上記方法を提供する。

【0107】

1つの実施形態において、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプター改変体をコードする mRNA の分析を含む、上記方法を提供する。 50

【0108】

1つの実施形態において、インビトロ分析する工程が、インスリンレセプタータンパク質の分析を含む、上記方法を提供する。

【0109】

1つの実施形態において、ここで、上記分析が、PCR、RT-PCR、サザンブロット、ウエスタンブロット、もしくはノーザンブロット、または免疫結合アッセイを介して実行される、上記方法を提供する。

【0110】

1つの実施形態において、上記上記哺乳動物がヒトである、上記方法を提供する。

【0111】

1つの実施形態において、上記インスリンレセプタースプライス改変体の量を、上記状態に罹患していないコントロール哺乳動物のインスリンレセプタースプライス改変体の量と比較する工程をさらに包含する、上記方法を提供する。

【0112】

【発明の実施の形態】

驚くべきことに、現在、加齢の間の、陰茎組織におけるインスリンレセプターmRNAのスプライシング機構の変更が、本質的に、去勢された若齢の被験体における変更と一致することが見出された。このことは、観察されたスプライシングパターンを逆にする薬学的に活性化化合物の能力によって、このような状態の処置において有用な化合物を同定する、改善された可能性を提供する。

【0113】

本出願において、用語「E x 1 1⁺ 改変体」は、その配列内にエキソン11を含むインスリンレセプターのスプライス改変体をいうために使用される。本明細書中で使用される場合、エキソン11は、インスリンレセプタータンパク質の - サブユニットのC末端部分をコードするエキソンを定義する。哺乳動物において、エキソン11は、12アミノ酸をコードする36bpのフラグメントを含む。

【0114】

用語「E x 1 1⁻ 改変体」は、本発明に従って使用されて、その配列内にエキソン11を欠くインスリンレセプターのスプライス改変体をいう。

【0115】

本発明の好ましい実施形態において、インスリンレセプターの変更された発現によって引き起こされる状態は、勃起機能不全である。本発明の文脈において、勃起機能不全は、急性勃起機能不全、病理学的状態、加齢依存性の勃起機能不全、または勃起機能不全の素因であり得る。

【0116】

本明細書中で使用される場合、勃起機能不全は、勃起の障害、すなわち、陰茎が、性的刺激に応答して首尾よい貫入のための十分な硬さを増大および到達するか、または維持する能力がないことを定義する。この機能不全は、一次的（すなわち、恒久的な）機能不全または二次的機能不全（すなわち、別個の状況において同時に生じる機能不全）であり得る。

【0117】

勃起機能不全はまた、動脈の（arterial）異常に起因する組織の不十分な血液供給のような器官的原因；海綿体の不十分な遮断（例えば、筋細胞変性による）、神経学的疾患（例えば、手術の結果としての神経の機械的損傷）；またはホルモン障害（例えば、テストステロンの枯渇など）に起因し得る。本明細書中で使用される場合、年齢依存性の勃起機能不全は、その発症が、哺乳動物の加齢に関連する勃起機能不全である。

【0118】

本発明において使用される場合、勃起機能不全の素因とは、哺乳動物の生理学的状態および遺伝的状态をいい、これは、上記のような勃起機能不全または勃起機能不全に関連する症状の発症の危険性を示す。

10

20

30

40

50

【0119】

本発明のさらなる実施形態において、サンプル（例えば、陰茎組織サンプル、血液または血清）は、哺乳動物から採取される。サンプルを採取し、そして、インスリンレセプターの $E \times 11^+$ スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体の量を続いて分析する。レセプタータンパク質またはそれをコードする核酸を細胞から放出するため、サンプルの細胞を、当業者に公知の方法によって溶解させ得る。これらの方法としては、例えば、溶解酵素または界面活性剤（SDSなど）の細胞サンプルへの添加、ならびに超音波処理または凍結および引き続く解凍によって細胞を破壊することが挙げられる。本発明に従って、サンプルとして、直接陰茎組織を取り巻く血液または血清を使用することもまた可能であり得る。

10

【0120】

分析されるべきインスリンレセプターの $E \times 11^+$ スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体の量は、相対量または絶対量であり得る。本明細書中で使用される場合、インスリンレセプタースプライス改変体の絶対量とは、規定されたサンプル単位（例えば、 μg 当たり）で検出されるような、この分子の数または重量をいう。分子数は、定量的検出方法（例えば、当業者に公知の RT-PCR または分光測定など）から推測され得る。サンプル単位は、 mg または ml のような、測定の標準的な IUPAC 単位によって規定され得る。

【0121】

本発明に従って、インスリンレセプタースプライス改変体の相対量は、同じかまたは異なるサンプル由来の、内部コントロールとして使用される第二の分子の量に対して、分子の量を分析することによって決定され得る。

20

【0122】

この目的のために、同時検出は、インスリンレセプタースプライス改変体の検出に使用される条件と同じ条件下で実行され得る。組織サンプルを使用する場合、同時検出は、細胞において構成的に発現される参照分子に関し得る。同時検出に適切な分子は、当該分野で周知であり、そしてとりわけ、グロブリンをコードする mRNA を含む。特に好ましい実施形態において、インスリンレセプターの $E \times 11^+$ スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体の相対量は、 $E \times 11^-$ スプライス改変体の量を、インスリンレセプターの $E \times 11^+$ スプライス改変体の量、または酵素（グリセリンアルデヒド - 3 - ホスフェート - デヒドロゲナーゼ (GAPDH)) の量と比較することによって、決定される。好ましくは、これら両方は、インスリンスプライス改変体を使用される方法と同じ方法を使用して検出される。

30

【0123】

本発明のさらなる実施形態において、インスリンレセプターの $E \times 11^+$ スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体の量をインビトロで分析する工程は、 $E \times 11^+$ スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体コード核酸の分析を包含し得る。好ましくは、分析する工程は、 $E \times 11^+$ スプライス改変体および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体をコードする mRNA の量の決定を包含する。あるいは、分析する工程は、 $E \times 11^+$ スプライス改変体タンパク質および/または $E \times 11^-$ スプライス改変体タンパク質の量の決定を包含する。

40

【0124】

検出される分子の性質に依存して、分析する工程は、PCR もしくは RT-PCR のような核酸増幅、または異なるスプライス改変体を特異的に検出し得るプローブを使用するザンプロット、ウエスタンプロット、もしくはノーザンプロットのようなプロット法を包含し得る。分析する工程はさらに、当業者に公知の免疫結合アッセイを包含し得る。例えば、 $E \times 11^+$ 改変体を特異的に検出するために、エキソン 11 によってコードされた 12 アミノ酸フラグメントに対するモノクローナル抗体が産生され得、そしてフルオレセイン - イソチオシアネートのような色素に結合され得る。検出に適した基質に抗体を結合させるための多くの方法は、当該分野で利用可能である。

50

【0125】

もちろん、スプライス改変体を単離し、そしてクロマトグラフ的測定または分光学的測定により（例えば、NMR分光法またはHPLCによって）改変体の相対量または絶対量を分析する手順によって、インスリンレセプタースプライス改変体を検出および単離することもまた、可能である。このような検出に適した方法は、当業者に周知である。

【0126】

本発明に従って、薬学的に潜在的に活性な化合物が投与される哺乳動物は、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはモルモット）であり得る。好ましくは、げっ歯類は、ラットである。

【0127】

本発明のさらなる実施形態において、薬学的に活性な化合物を同定するための方法は、インスリンレセプターのE_x11⁺スプライス改変体および/またはE_x11⁻スプライス改変体の量を、薬学的に潜在的に活性な化合物の投与の前に同じ哺乳動物において決定された同じインスリンレセプタースプライス改変体の量と比較する工程をさらに包含する。潜在的に活性な化合物の投与の前および後に、特定のインスリンレセプタースプライス改変体の量を比較することは、この化合物が、罹患した哺乳動物における上記スプライス改変体の量を増加および/または減少させ得るか否かに関する直接的な評価を可能にする。

【0128】

本発明は、インスリンレセプターの変更された発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的組成物を調製するための方法にさらに関し、この方法は、以下：

- a) 本発明の方法に従って薬学的に活性な化合物を同定する工程；および
 - b) 上記化合物を薬学的に受容可能なキャリアと混合する工程、
- を包含する。

【0129】

本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、例えば、薬物投与に適する、溶媒、分散媒体、コーティング剤および吸収遅延剤を含む。本発明に従って、水、生理食塩水、プロピレングリコール、グリセリン、リンガー液、デキストロース溶液、ヒト血清アルブミンを含む溶液、ならびに揮発性油が、適切なキャリアとして使用され得る。これらのキャリアの使用は、当業者に周知である。

【0130】

本発明の1つの実施形態に従って、薬学的組成物は、非経口投与のために処方される。例えば、この組成物は、注射による投与のために処方され得る。注射用途に適切な組成物は、一般的に、滅菌水溶液または分散剤を含む。静脈内適用のために、適切なキャリアは、静菌水、またはリン酸緩衝化生理食塩水を含む。この組成物は、微生物の増殖を防止するための薬剤をさらに含み得る。

【0131】

あるいは、薬学的組成物は、局所投与について処方され得る。これらの組成物は、通常、界面活性剤のような浸透剤または活性化合物が通過すべき障壁（例えば、皮膚の経皮障壁）を通過して浸透するのを可能にするのに有用な他の物質を含む。局所投与のために、薬学的組成物は、標準的な方法に従って、軟膏（ointment）、軟膏（salve）、ゲルまたはクリームの形態で処方され得る。

【0132】

他方、薬学的組成物は、経口投与のために処方され得る。これらの組成物は、一般に、不活性または食用のキャリアを含む。経口投与のための組成物は、例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルの形態で提供され得る。

【0133】

本発明の好ましい実施形態に従って、薬学的組成物は、投薬単位形態で処方される。

【0134】

本明細書中で使用される場合、「投薬単位形態」は、処置される哺乳動物のための単位投薬量として適した物理的に別々の単位に関する。1単位は、所望の治療効果を生成するた

10

20

30

40

50

めに十分な所定の量の薬学的組成物を含む。単位投薬形態に寄与する所定の活性化化合物の正確な量は、特定の化合物ならびに使用されるキャリアに明確に依存する。

【0135】

本発明はさらに、哺乳動物中のインスリンレセプターの変更された発現によって引き起こされる状態の診断の方法に関し、この方法は、この哺乳動物の陰茎組織におけるインスリンレセプタースプライス改変体の量をインビトロで分析する工程を包含する。

【0136】

本発明の好ましい実施形態において、陰茎組織において決定されるインスリンレセプタースプライス改変体は、 $E \times 11^-$ 改変体および/または $E \times 11^+$ 改変体である。

【0137】

診断される状態は、勃起機能不全であり得る。好ましくは、これは、急性、加齢依存性、または勃起機能不全の素因である。

【0138】

この診断方法はさらに、哺乳動物からサンプル（例えば、陰茎組織サンプル、血液サンプルまたは血清サンプル）を取り出す工程、およびサンプル中のインスリンスプライス改変体の量を分析する工程を包含する。

【0139】

分析されるインスリンレセプタースプライス改変体の量は、相対量または絶対量であり得る。好ましい実施形態に従って、分析されるインスリンレセプタースプライス改変体の量は、サンプル中の $E \times 11^-$ スプライス改変体の量の、 $E \times 11^+$ スプライス改変体の量 20
または GAPDH の量に対する比較によって決定される相対量である。

【0140】

上記の方法と同様に、分析は、インスリンレセプター改変体をコードする核酸（例えば、インスリンレセプター改変体をコードする mRNA）の分析ならびに PCR、RT-PCR、サザンブロット、ウエスタンブロット、もしくはノーザンブロットまたは免疫結合アッセイによるインスリンレセプタータンパク質の分析を包含し得る。

【0141】

本発明に従って、診断が適用される哺乳動物は、哺乳動物、最も好ましくは、ヒトであり得る。

【0142】

本発明の代替的な実施形態に従って、哺乳動物において決定されたインスリンレセプタースプライス改変体の量は、勃起機能不全に罹患していないコントロール哺乳動物のインスリンレセプタースプライス改変体の量と比較される。加齢依存性勃起機能不全を検出するために、コントロール哺乳動物が有利に使用され、これは、診断されるべき哺乳動物よりも若い。好ましくは、その生物学的種に関して、コントロール哺乳動物は、実質的に最大の性活動が予測され得る年齢であるべきである。診断がヒトに適用されるべき限り、コントロール哺乳動物は、好ましくは、18~25歳の間であるべきである。

【0143】

本発明の過程において、 $E \times 11^+$ 改変体は、若年ラット（3か月齢）において主に発現されるが、 $E \times 11^-$ 改変体は、23か月の老年ラット中に最も豊富な改変体を示すことが示された（図2a）。さらに、この変更は、心臓、肝臓または筋肉のような他の組織において観察され得ないため、陰茎組織に特異的であることが示された（図3）。本質的に同じ発現パターンが、若年去勢ラット（3か月）について見出された。

【0144】

加齢および去勢から生じるスプライス改変体の相対的分布における変化は、陰茎特異的影響であるので、この変化は、陰茎組織の低下したインスリン感受性の原因となり、局所的なインスリン耐性を生じ、それにより、勃起機能不全を発症する。従って、インスリンレセプター mRNA スプライシングの特定のパターンは、スプライス改変体の1つまたは両方を検出し得るインビトロアッセイを使用して、哺乳動物における勃起機能不全を診断する可能性、およびインスリンレセプターの変更された発現によって引き起こされる状態の 50

10

20

30

40

50

処置のための薬学的に活性な化合物を同定する可能性を提供する。

【0145】

本発明は、インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的に活性な化合物を同定する方法に関する。本発明はさらに、インビトロアッセイを用いて哺乳動物の状態を診断する方法に関する。本発明はまた、インスリンレセプターの変化した発現によって引き起こされる状態の処置のための薬学的組成物を調製するための方法に関する。

【0146】

【実施例】

(実施例1)

(動物および組織)

雄のwistarラット(Charles River, Sulzfeld, Germany)を、標準的な実験用ラット飼料および水を適時与えて、標準の飼育条件(12時間の日照、12時間の暗闇の周期、23)で維持した。

【0147】

ラットを各々4匹づつを含む3つの群に分けた。A群は、3ヶ月齢からなり、B群は、14ヶ月齢からなり、そしてC群は、23ヶ月齢のラットを含んだ。陰茎、心臓、肝臓、脳および筋肉の組織片を、動物の屠殺直後に回収した。これらの組織の一部を組織学的評価のためにBouin溶液中で固定し、別の部分を、後のRNA調製のために液体窒素中で凍結した。血液を、ラジオイムノアッセイを用いての、全および遊離テストステロンの決定のために回収した。このアッセイを、製造業者の指示書に従って実施した(Testosterone^{1 2 5} IRIAキット、ICN Biomedicals Inc.、USA)。

【0148】

(実施例2)

(RNA調製)

組織サンプル(100~200mg)を液体窒素中で粉砕した。総RNAをチオシアン酸グアニジウム(guanidium thiocyanate)、フェノール-クロロホルム抽出(pecLab, Erlangen, Germany)を用いて単離した。RNAをイソプロパノールを用いて、-20 で2時間、沈降させ、75%エタノールで洗浄し、ジエチルピロカーボネート水中に溶解し、260nmで分光測定的に定量した。全ての調製物の吸光度比は、1.8と2.0との間であった。濃度が、各サンプル中で同一であることを確実にするために、エチジウムブロマイド染色後の1%アガロースゲル電気泳動上で28sRNAの強度を比較した。総RNAを-80 にて、さらに使用するまで保存した。

【0149】

(実施例3)

(cDNA合成およびポリメラーゼ連鎖反応増幅)

第1鎖cDNA合成を、市販のキット(Gibco BRL)を用いて実施した。簡潔には、4μgの総RNAを、0.5μgのオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用いてプライムし、70 で10分間インキュベートした。各サンプルについて、1×第1鎖緩衝液(bufffer)、0.2M DTT、10mM dNTPおよび200UのSuperscript II逆転写酵素を添加した。逆転写を、42 で50分間実施し、70 で15分間加熱することにより終了した。得られたcDNAテンプレートを-20 で保存するか、またはPCRに直接用いた。

【0150】

3分間の変性期間の後に、60秒間95 、60秒間60 および60秒間72 の35サイクルによるPCR反応を続けた。PCRを、6μl cDNA、10mM各dNTP、5U Taqポリメラーゼ(Biotherm)ならびに50pmolのセンスおよびアンチセンスの両方のプライマーを用いて、PCR緩衝液中で実施した。各反応物の最終

10

20

30

40

50

容量は、50 μ lであった。反応生成物(15 μ l)を2.5%アガロースゲル上で電気泳動した。PCRに用いたプライマーは、以下の通りである：

・5' - A A G A A G C T T A G G C A G A G T G A C A A G T G A C - 3' (配列番号1；アンチセンス、2438位で開始するインスリンレセプターcDNA配列に相補的であり(下線)、HindIII制限酵素認識部位も含む)；および

・5' - G A A G A A T T C A T T C A G G A A G A C C T T C G A - 3' (配列番号2；センス、2181位からのラットインスリンレセプターcDNA配列に同一であり(下線)、EcoRI制限酵素認識部位を含む；25)。

【0151】

インスリンレセプターmRNAスプライス改変体レベルの濃度測定分析を、Image Quant 5.0ソフトウェアを用いて実施した。 10

【0152】

2つのインスリンレセプターmRNA改変体のmRNAレベルの割合について、平均値の差の有意性を独立学生t-検定により決定した。有意性の閾値を、 $p < 0.05$ に設定した。

【0153】

(実施例4)

(ラットの多様な組織中でのインスリンレセプターmRNAの選択的スプライシング)
ラットの異なる組織由来の総RNAを用いたRT-PCR分析を、実施例1~3に従って実施して、若年ラット(3ヶ月齢)の多様な組織中で選択的にスプライシングされたインスリンレセプターmRNA改変体の相対量を決定した。ラットインスリンレセプターのエキソン11スプライス部位に対応するドメインに隣接するオリゴヌクレオチドプライマーを選択し、アイソフォームEx11⁺(273bp)およびアイソフォームEx11⁻(237bp)を示した。スプライシング機構における改変を、濃度測定評価を用いた定量分析により確認した。グリセリンアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)mRNAを内部標準として用いた。GAPDHの増幅に用いたPCR-オリゴヌクレオチドプライマーは、以下の通りであった：

プライマー GAPDH-1：5' - T C C T G C A C C A C C A A C T G C T T A - 3' (配列番号3)；および

プライマー GAPDH-2：5' - C G C C T G C T T C A C C A C C T T C T T - 3' (配列番号4)。 30

【0154】

PCR反応の結果を、アガロースゲル電気泳動により試験した。図1において見られるように、肝臓においてのみ、より長い改変体が発現していることが観察され、このことは、既に公開されたデータ(27、28)と一致する。心臓において、両方の改変体が発現していることが見出され、ex11⁺アイソフォームがまた優性であった。骨格筋において、両方の改変体は、同程度に発現した。脳において、Ex11⁻改変体の独占的な発現が目された(図1)。

【0155】

(実施例5)

(インスリンレセプタースプライス改変体の陰茎における相対的発現および加齢の影響)
陰茎組織のRT-PCR分析を、実施例1~3に従って実施した。この結果を図2aに示す。若年ラット(3ヶ月齢)の陰茎において、より長いEx11⁺アイソフォームが、ほぼ独占的に発現されることが見出された。対照的に、老年ラット(23ヶ月齢)の陰茎組織において、より短いEx11⁻改変体が優先的に発現した。中年の動物(14ヶ月齢)における2つのスプライス改変体の分布は、老年ラットと同様であった(図2a)。しかし、Ex11⁻インスリンレセプターの最も高い発現レベルは、老年ラットにおいて検出され得た(図2a)。

【0156】

若年ラット対老年ラットの、陰茎組織におけるインスリンレセプターEx11⁺mRNA 50

の定量測定は、若年ラットの陰茎における最も優勢なインスリンレセプター形態が、 $E \times 11^+$ であることを確証した(85.9%)。対照的に、中年および老年ラットは、若年ラットと比較して、陰茎における $E \times 11^+$ mRNAの相対的発現が減少していることによって、特徴付けられた。インスリンレセプターアイソフォームの発現のより短い形態が優勢になる切り替えは、図2bに示すように、中年ラット(79.9%)および老年ラット(78.4%)の両方において、顕著であった。

【0157】

従って、類似した年齢依存性のインスリンレセプターmRNA発現パターンのバリエーションが、他の組織において、同様に観察され得るか否かを調査することに興味を持たれた。しかし、陰茎と対照的に、このようなアイソフォーム特異的な分布の年齢依存性の変化は、肝臓、心臓、骨格筋および脳において観察され得なかった(図3a、3b)。従って、インスリンレセプターmRNA発現パターンの加齢と関連した変化は、陰茎組織特異的であった。

【0158】

(実施例6)

(ラット陰茎におけるインスリンレセプターmRNA発現パターンの、加齢と関連したバリエーションのアンドロゲン依存性についての、去勢術およびテストステロン置換による試験)

テストステロン移植またはプラセボ移植のためのペレットを、Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USAから入手した。去勢術およびテストステロン置換の影響を評価するため、雄のwistarラット(3ヶ月齢、 $n = 21$)を3群に分けた：1群、インタクト(偽手術、背部の皮膚下にプラセボ小片を移植した、 $n = 7$)、2群、去勢した(プラセボ小片の移植、 $n = 7$)、および3群、去勢したが15mgのテストステロン移植をした($n = 7$)。処置の3週間後に、ラットを屠殺し、陰茎組織および血液サンプルを、実施例1に記載のように処理した。試験研究を、実験動物の取り扱いおよび使用に対する一般的な合衆国の法律に従って実施した。

【0159】

若年ラット対老年ラットの血清中のテストステロンのレベルは、それぞれ $4.436 \pm 1.1 \text{ ng/ml}$ および $0.57 \pm 0.17 \text{ ng/ml}$ (平均 \pm SD、 $n = 4$)である点に着目し、老化した動物の循環中のテストステロンレベルの低下を示した。これは、Zirkinsの研究室と一致する(40、41)。インスリンレセプターmRNAの2つのスプライス改変体の発現における、加齢に関連した観察される変化が、加齢したラット中のアンドロゲンレベルが低下することに起因し得るか否かを判別するために、本発明者らは、睾丸摘出術を若年ラットに実施した。去勢したラットの1群は、アンドロゲンを放出する皮下移植片を受けた。去勢後に、体重に対する陰茎の相対重量は、コントロール動物と比較して劇的に減少した($77.3 \pm 7.3 \text{ mg/100g}$ 体重 対 $46.8 \pm 4.3 \text{ mg/100g}$ 体重)。同様の影響が、コントロール動物および去勢した動物の前立腺重量で観察された(96.7 ± 30.4 対 7.4 ± 2.4 ;表1)。しかし、テストステロン置換は、両方の器官でのこの影響の逆転を誘導した(表1)。去勢およびアンドロゲン置換の、若年ラットの陰茎組織におけるインスリンレセプターmRNA発現における影響は、図4aに示される。インタクトな動物において、より長い改変体のみが発現していることが見出された。去勢した後に、より短いスプライス改変体の出現が観察され、このパターンは、老年動物のものと類似していた。このアイソフォームが、アンドロゲン補充を受けた去勢動物においてさえも持続したことに注目した。

【0160】

インタクト、去勢、去勢およびアンドロゲン置換を受けた若年ラットの陰茎におけるインスリンレセプターmRNA改変体の相対的発現の定量分析を、図4bに示す。インタクトコントロールの陰茎において、インスリンレセプターをコードするmRNAのほぼ全ては、 $E \times 11^+$ (85.9%)改変体で構成された。対照的に、去勢したラットにおいて、

10

20

30

40

50

$E \times 11^+$ 改変体は、総レセプター mRNA の 19.2% のみを占め、一方、インスリンレセプター mRNA のほとんど (80.8%) は、 $E \times 11^-$ 改変体により提示される。去勢したラットについてのアンドロゲン補充は、 $E \times 11^-$ に対する $E \times 11^+$ の相対的な割合 (それぞれ 22.8% および 77.2%) を変更し得なかった。両方の組織において、 $E \times 11^+$ mRNA の割合は、若年コントロールラットに比較した場合、顕著に減少した。

【0161】

【表1】

	CON (mg/100g 体重)	CASTR(mg/100g 体重)	TESTO(mg/100g 体重)
陰茎	77.3 ± 7.3	46.8 ± 4.3	78.55 ± 5.54
前立腺	96.7 ± 30.4	7.4 ± 2.4	92.37 ± 33.89

10

(表1: 若年コントロールラット (CON)、去勢した若年ラット (CASTR) および去勢したがテストステロンで置換した若年ラット (TESTO) の体重に対する器官重量 (mg / 100g 体重))

加齢依存性のインスリンレセプター発現における変化は、インスリンレセプターに共役したシグナル伝達機構が最適に機能しない状態へと導き、インスリン抵抗性症候群について記載される状態に類似した病態生理学的状態へと導き得る。このような症候群において、循環中に十分な量でかまたは増加した量でインスリンが存在するにも関わらず、糖尿病様状態が発症する。糖尿病は、加齢においても観察されるインポテンスの発生の増加に関する。加齢におけるインスリンレセプタースプライズ改変体の変更された発現パターンが、陰茎におけるインスリン抵抗性症候群に類似した局所状態を導くことが提案される。インスリン抵抗性症候群は、今までのところ有効に処置されていなかった。しかし、チアゾリジンジオンインスリン感作物質様化合物 (Goldstein BJ, Diabetes Technol. Ther., 3, 267~275 (1999); および Alicia di Rado, www.usc.edu/hsc/info/pr/lvl7/721/insulin.html, 2001 による報告を参照のこと) は、インスリン抵抗性症候群の処置を提案した。これらの薬物は、多くの副作用を有し (www.diabetis-drug.net, 2001 を参照のこと)、そしてより有効で副作用がより少ない関連化合物を開発するために、さらなる研究が必要である。

20

30

【0162】

それ故に、類似した処置レジメン、または新たな化合物もしくはよりよい処方物に基づいて改善された処置レジメンを使用して、加齢に関連したインポテンス状態 (この病態生理は、インスリン抵抗性症候群に類似した状態により決定されるように思われる) を改善し得ることが考えられる。

【0163】

【表2】

40

1. Andersson K-E, Wagner G. 1995 The physiology of penile erection. *Physiol Rev* 75:191-236.
2. Lue T, Dahiya M. 1997 Molecular biology of erectile function and dysfunction. *Mol Urol* 1:35-48.
3. Udelson D, Nehra A, Hatzichristou D, Azadot A, Moreland RB, Krane RJ, Saenz de Tejada I, Goldstein I. 1998. Engineering analysis of penile hemodynamic and structural dynamic relationships. Part-I-Clinical implications of penile tissue mechanical properties. *Int J Impot Res* 10:15-24. 10
4. Fran E, Kaiser MD. 1999 Erectile dysfunction in the aging man. *Med Clin North Am* 83:1267-1278.
5. Monga M. 1999 The aging penis: Erectile dysfunction. *Geriatr Nephrol Urol* 9:27-37.
6. Morgentaler A. 1999 Male impotence. *Lancet* 354:1713-1718.
7. Mills TM, Dai Y, Stopper VS, Lewis RW. 1999 Androgenic maintenance of the erectile response in the rat. *Steroids* 64:605-609. 20
8. Aversa A, Isidori AM, De Martino MU, Caprio M, Fabbri E, Rocchietti-March M, Frajese G, Fabbri A. 2000 Androgens and penile erection: evidence for a direct relationship between free testosterone and cavernous vasodilation in men with erectile dysfunction. *Clin Endocrinol* 53:517-522.
9. Baskin LS, Sutherland RS, Di Sandro MJ, Hayward SW, Lipschutz J, Cunha GR. 1997 The effect of testosterone on androgen receptors and human penile growth. *J Urol* 158:1113-1118.
10. Shabsigh R. 1997 The effects of testosterone on the cavernous tissue and erection. *World J Urol* 15:21-26. 30
11. Traish AT, Park K, Kim NN, Moreland RB, Goldstein I. 1999 Effects of castration and androgen replacement on erectile function in a rabbit model. *Endocrinology* 140:1861-1868.
12. Reilly CM, Zamorano P, Stopper VS, Mills TM. 1997 Androgenic regulation of NO availability in rat penile erection. *J Androl* 18:110-115.

【 0 1 6 4 】

【 表 3 】

13. Lugg JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. 1995 Dihydrotestosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Endocrinology* 136:1495-1501.
14. Schirar A, Bonnefond C, Meusnier C, Devinoy E. 1997 Androgens modulate nitric oxide messenger ribonucleic acid expression in neurons of the major pelvic ganglion in the rat. *Endocrinology* 138:3093-3102.
15. Feener EP, King GL. 1997 Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 350(suppl1):S19-S113. 10
16. Scherrer U, Sartorio C. 1997 Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity and cardiovascular mortality. *Circulation* 96:4104-4113.
17. Baron AD, Brechtel-Hook C, Johnson A, Cronin J, Learning R, Steinberg HO. 1996 Effect of perfusion rate on the time course of insulin-mediated glucose uptake. *Am J Physiol* 271:E1067-E1072.
18. Yki-Jarvinen H, Utriainen T. 1998 Insulin-induced vasodilation: physiology or pharmacology? *Diabetologia* 41:369-379. 20
19. Zeng G, Quon MJ. 1996 Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin: direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98:894-898.
20. Kuboki K, Jiang ZH, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. 2000 Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells in vivo. *Circulation* 101:676-681.
21. El-Rufaie OEF, Bener A, Abuzeid MSO, Ali TA. 1997 Sexual dysfunction among type II diabetic men: a controlled study. *J Psychosom Res* 43:605-612.
22. McKendrick JD, Salas E, Dube GP, Murat J, Russell JC, Radomski MW. 1998 Inhibition of nitric oxide generation unmasks vascular dysfunction in insulin-resistant, obese JCR:LA-cp rats. *B J Urol* 124:361-369. 30
23. Honing MLH, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ESG, Rabelink TJ. 1998 Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 14:241-249.

【 0 1 6 5 】

【 表 4 】

- 24、Rehman J, Chenven E, Brink P, Peterson B, Walcott B, Wen YW, Melman A, Christ G. 1997 Diminished neurogenic but not pharmacological erections in the 2- to 3-month experimentally diabetic F-344 rat. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol 41)*:H1960-1971.
- 25、Kahn AM, Husid A, Allen JC, Seidel C, Song T. 1997 Insulin acutely inhibits cultured vascular smooth muscle cell contraction by a nitric oxide synthase-independent pathway. *Hypertension 30*:928-933.
- 26、Rosen OM. 1987 After insulin binds. *Science 237*:1452-1458. 10
- 27、White MF, Kahn CR. 1994 The insulin signalling system. *J Biol Chem 269*: 1-4.
- 28、Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. 1989 Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA 86*:114-118.
- 29、Seino S, Bell GI. 1989 Alternative splicing of human receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun 159*:312-316.
- 30、Goldstein BJ, Dudley AL. 1990 The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissue-specific alternative splicing. *Mol Endocrinol 4*:235-244.
- 31、Sugimoto K, Murakawa Y, Zhang W, Xu G, Sima AAF. 2000 Insulin receptor in rat peripheral nerve: its localization and alternatively spliced isoforms. *Diabetes/Metab Res Rev 16*:354-363. 20
- 32、Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. 1989 Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs. *Mol Endocrinol 3*:1263-1269.
- 33、Huang Z, Bodkin NL, Ortmeier HK, Hansen BC, Shuldiner AR. 1994 Hyperinsulinemia is associated with altered insulin receptor mRNAs splicing in muscle of the spontaneous obese diabetic rhesus monkey. *J Clin Invest 14*: 1289-1296.
- 34、Mostaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. 1990 Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J 9*:2409-2413. 30
- 35、McClain DA. 1991 Different ligand affinities of the two human insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol Endocrinol 5*:734-739.
- 36、Kellerer M, Lammers R, Emmel B, Tippmer S, Vogt B, Obermaier-Kusser B, Ullrich A, Häring HU. 1992 Distinct α -subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry 13*: 4588-4598. 40

【 0 1 6 6 】

【 表 5 】

- 37、Yamaguchi Y, Flier JS, Yokota A, Benecke H, Backer JM, Moller DE. 1991 Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 129:2058-2066.
- 38、Vidal H, Auboeuf D, Beylot M, Riou JP. 1995 Regulation of insulin receptor mRNA splicing in rat tissues. *Diabetes* 44:1196-1201 10
- 39、Wiersma MML, Auboeuf D, Nieuwenhuizen-Bakker IM, Radder JK, Riou JP, Vidal H. 1997. Insulin receptor mRNA splicing and altered metabolic control in aged and mildly insulin-deficient rats. *Am J Physiol* 272:E607-E615.
- 40、Zirkin BR, Chen H, Luo L. 1997 Leydig cell steroidogenesis in aging rats. *Exp Gerontol* 32:529-537.
- 41、Zirkin BR, Chen H. 2000 regulation of leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 63:977-981. 20
- 【 0 1 6 7 】
- 【 発明の効果 】
- 本発明により、勃起機能不全を処置する方法、勃起機能不全を処置するための医薬、勃起機能不全の処置において有用な新規化合物の同定、このような化合物がこのような状態の処置において有効であるか否かを評価することを可能にする、信頼できるスクリーニング方法などが提供される。
- 【 0 1 6 8 】
- 【 配列表 】 30

SEQUENCE LISTING

<110> JENAPHARM GmbH & Co. KG

<120> Method of identifying a pharmaceutically active compound for the treatment of a condition caused by altered expression of the insulin receptor

10

<130> P057042

<160> 4

<210> 1

20

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR oligonucleotide primer

30

<400> 1

aagaagccta ggcagagtga caagtgac

28

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

40

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR oligonucleotide primer

<400> 2

gaagaattca ttcaggaaga ccttcga 27

10

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR oligonucleotide primer

20

<400> 3

tcctgcacca ccaactgctt a 21

<210> 4

30

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> PCR oligonucleotide primer

40

<400> 4

cgccctgcttc accaccttct t 21

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、R T - P C R によって示されるように、ラットの種々の組織における 2 つの選択的にスプライシングされた I R m R N A 転写物の発現を示す。c D N A の増幅を、選択的にスプライシングされたエキソン 1 1 に隣接するプライマーセットを使用して

50

実施した。2つの主な増幅産物は、273bpおよび/または237bpであり、それぞれ、エキソン11を有するかまたは有さない2つのIR mRNA種を表す。GAPDH mRNAを、内部標準として増幅した。反応産物を、2.5%臭化エチジウム染色したアガロースゲル中での電気泳動によって分析した。

【図2a】図2aは、RT-PCRによって示されるように、若年(y)ラット、中年(ma)ラットおよび老年(o)ラットの陰茎組織における2つの選択的にスプライシングされたIR mRNA転写物の発現を示す。cDNAの増幅を、選択的にスプライシングされたエキソン11に隣接するプライマーセットを使用して実施した。2つの主な増幅産物は、273bpおよび/または237bpであり、それぞれ、エキソン11を有するかまたは有さない2つのIR mRNA種を表す。GAPDH mRNAを、内部標準として増幅した。反応産物を、2.5%臭化エチジウム染色したアガロースゲル中での電気泳動によって分析した。M = 100bp DNAラダー。

10

【図2b】図2bは、若年ラット、中年ラット、および老年ラットの陰茎組織における2つのインスリンレセプターmRNAスプライス変体の相対量を示す。エキソン11(EX11+) mRNA形態の割合を、左側のこの割合の平均±SDと共に、バーの濃い部分によって表す。* 若年コントロール動物に対して $p < 0.05$ 。

【図3a】図3aは、RT-PCRによって表されるように、若年(y)ラットおよび老年(o)ラットの陰茎組織における2つの選択的にスプライシングされたIR mRNA転写物の発現を示す。cDNAの増幅を、選択的にスプライシングされたエキソン11に隣接するプライマーセットを使用して実施した。2つの主な増幅産物は、273bpおよび/または237bpであり、それぞれ、エキソン11を有するかまたは有さない2つのIR mRNA種を表す。GAPDH mRNAを、内部標準として増幅した。反応産物を、2.5%臭化エチジウム染色したアガロースゲル中での電気泳動によって分析した。M = 100bp DNAラダー。

20

【図3b】図3bは、若年(y)ラットおよび老年(o)ラットの種々の組織における2つのインスリンレセプターmRNAスプライス変体の相対量を示す。エキソン11(EX11+) mRNA形態の割合を、上部のこの割合の平均±SDと共に、バーの濃い部分によって表す。* 若年コントロール動物に対して $p < 0.05$ 。

【図4a】図4aは、RT-PCRによって表されるように、若年(y)ラット、老年(o)ラット、若年去勢(ca)ラット、ならびに去勢およびテストステロン置換(te)ラットの陰茎組織における2つの選択的にスプライシングされたIR mRNA転写物の発現を示す。cDNAの増幅を、選択的にスプライシングされたエキソン11に隣接するプライマーセットを使用して実施した。2つの主な増幅産物は、273bpおよび/または237bpであり、それぞれ、エキソン11を有するかまたは有さない2つのIR mRNA種を表す。GAPDH mRNAを、内部標準として増幅した。反応産物を、2.5%臭化エチジウム染色したアガロースゲル中での電気泳動によって分析した。M = 100bp DNAラダー。

30

【図4b】図4bは、若年ラット、老年ラット、若年去勢ラット(castrate)、ならびに去勢したがテストステロン置換した若年ラット(testo)の陰茎組織における2つのインスリンレセプターmRNAスプライス変体の相対量を示す。エキソン11(EX11+) mRNA形態の割合を、上部のこの割合の平均±SDと共に、バーの濃い部分によって表す。* 若年コントロール動物に対して $p < 0.05$ 。

40

【 図 1 】

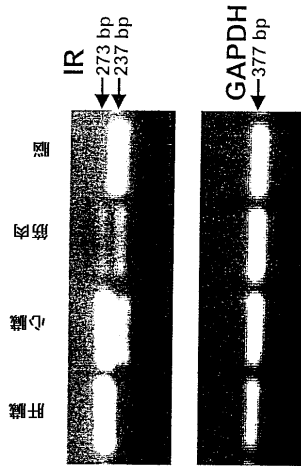


Fig. 1

【 図 2 a 】

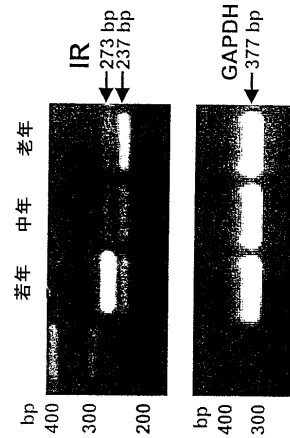


Fig. 2a

【 図 2 b 】

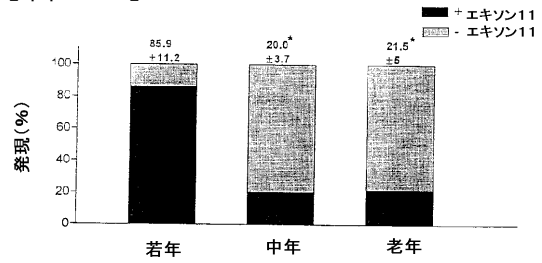


Fig. 2b

【 図 3 a 】

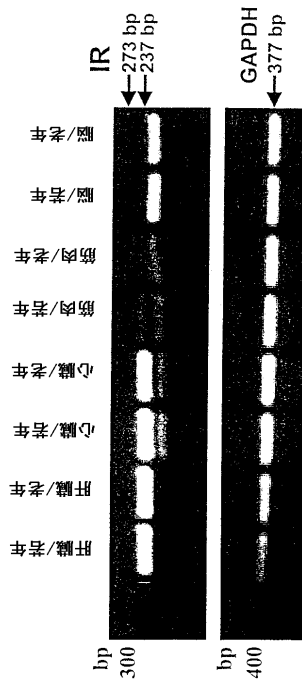


Fig. 3a

【 図 3 b 】

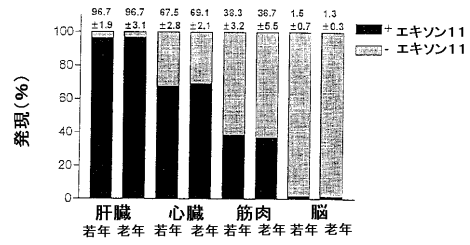


Fig. 3b

【 図 4 a 】

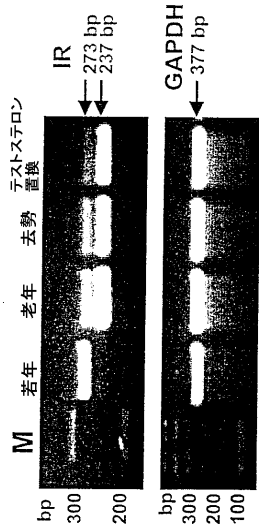


Fig. 4a

【 図 4 b 】

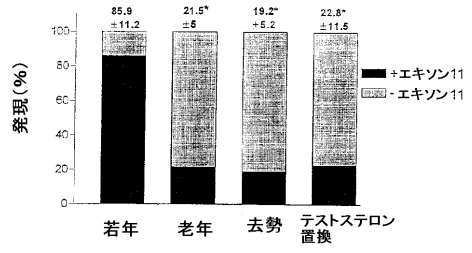


Fig. 4b

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷		F I	
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/53	M
// C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/566	
(C 1 2 Q 1/02		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 Q 1/02	
(C 1 2 Q 1/68		C 1 2 R 1:91	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 Q 1/68	A
		C 1 2 R 1:91	

(72)発明者 アマル ケイ . ムコパディエイ
ドイツ国 2 2 5 2 3 ハンブルク , エルプガウシュトラーセ 7 1

(72)発明者 ジュディス ヴェッセルス
ドイツ国 2 0 2 5 5 ハンブルク , シュテリンガー ヴェク 5 3

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特表平09 - 501921 (J P , A)
Molecular Cell , 2 0 0 1年 , vol.7 , p.559-570,

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷ , D B名)

G01N 33/50 ZNA
A61K 45/00
A61P 15/10
A61P 43/00 111
C12Q 1/02
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/53
G01N 33/566
C12N 15/09
C12Q 1/02
C12R 1:91
C12Q 1/68
C12R 1:91

专利名称(译)	鉴定用于治疗由胰岛素受体表达改变引起的病症的药物活性化合物的方法		
公开(公告)号	JP3621401B2	公开(公告)日	2005-02-16
申请号	JP2003074464	申请日	2003-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	詹娜农场GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu UND命令避蚊胺GESELLSCHAFT		
申请(专利权)人(译)	詹娜农场GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru GMBH UND命令避蚊胺GESELLSCHAFT		
当前申请(专利权)人(译)	先灵股份公司		
[标]发明人	ディーターミユラー アマルケイムコパディエイ ジュディスヴェッセルス		
发明人	ディーター ミユラー アマル ケイ. ムコパディエイ ジュディス ヴェッセルス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P15/10 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P15/10 A61P43/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	G01N33/50.ZNAZ A61K45/00 A61P15/10 A61P43/00.111 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A C12R1/91 C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z G01N33/50.ZZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZC412		
代理人(译)	夏木森下		
审查员(译)	宫泽浩		
优先权	10211915 2002-03-18 DE 60/365371 2002-03-18 US		
其他公开文献	JP2003337131A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及鉴定药理学活性化合物的方法，所述药理学活性化合物用于治疗由胰岛素受体的表达改变引起的病症。本发明还涉及使用体外测定法诊断哺乳动物病症的方法。本发明还涉及制备药物组合物的方法，所述药物组合物用于治疗由胰岛素受体的表达改变引起的病症。

	CON (mg/100g体重)	CASTR(mg/100g体重)	TESTO(mg/100g 体重)
雄鼠	77.3 ± 7.3	46.8 ± 4.3	78.55 ± 5.54
前立腺	96.7 ± 30.4	7.4 ± 2.4	92.37 ± 33.89