



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 36 432 T2 2007.03.01

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 939 621 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 36 432.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/18348

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 910 067.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1998/014172

(86) PCT-Anmeldetag: 03.10.1997

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 09.04.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.09.1999

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 02.08.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 01.03.2007

(51) Int Cl.⁸: A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

726211 04.10.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Board of Regents, The University of Texas
System, Austin, Tex., US

(72) Erfinder:

TORMO, Mar, E-Valencia, ES; TARA, M., Ana,
Houston, TX 77030, US; LOPEZ-BERESTEIN,
Gabriel, Bellaire, TX 77602, US; MCDONNEL, J.,
Timothy, Houston, TX 77077, US

(74) Vertreter:

Dehmel & Bettenhausen, Patentanwälte, 80331
München

(54) Bezeichnung: HEMMUNG DER BCL-2 PROTEIN EXPRESSION DURCH LIPOSOMALE ANTISENSE-OLIGODEO-
XNUKLEOTIDE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Feld der Krebstherapie, insbesondere die Behandlung von Bcl-2-Erkankungen. Diese Behandlungen beziehen insbesondere die Verwendung von Antisense-Oligodesoxynukleotiden und liposomale Formulierungen davon mit ein.

[0002] Bcl-2 ist mit einer großen Vielzahl an Erkrankungen wie hämatologische bösartige Tumoren, sowohl Leukämien als auch Lymphome, einschließlich follikulären und nicht-follikulären Lymphomen, chronischer lymphozytischer Leukämie, und Plasmazell-Dyskrasien (Campos et al., Blood, 84:595, 1994), festen Tumoren wie jenen, die mit Brust-, Prostata- und Darmkrebs assoziiert sind, und Immunstörungen in Verbindung gebracht werden. Eine besondere mit Bcl-2 in Verbindung stehende Erkrankung ist das follikuläre nicht-Hodgkin-Lymphom (FL). FL ist der häufigste lymphoide bösartige Tumor in Europa und den Vereinigten Staaten. Typischerweise ist es eine nicht-schmerzhafte Erkrankung geringen Stadiums, die aus der Ansammlung von kleinen, ruhenden B-Zellen besteht. Obwohl die Reaktion auf Chemotherapie anfänglich gut ist, sind Rückfälle unvermeidlich mit der Transformation in einen histologisch aggressiveren Typus und die Entwicklung von Wirkstoffresistenz (Aisenberg, J. Clin. Oncol., 13:2656, 1995; Johnson et al., J. Clin. Oncol., 13:140, 1995). In über 90 % der FL-Patienten findet man eine t(14;18)-Translokation, die das bcl-2-Gens von Chromosom 18q21 in Nachbarschaft bringt zu dem Lokus der schweren Immunglobulinkette auf Chromosom 14q323 (Tsujimoto et al., Science, 299:1390, 1985; Graninger et al., J. Clin. Invest., 80:1512, 1987). Als Konsequenz davon kommt das bcl-2-Gen unter den Einfluss des Enhancers der schweren Immunglobulinkette, und das Bcl-2-Protein wird überexprimiert (Bakhshi et al., Cell, 41:899, 1985; Tsujimoto et al., Oncogene, 2:3, 1987). Das tumorogene Potenzial von Bcl-2 steht in Verbindung mit seiner Kapazität physiologische Todesreaktionen zu stören, wodurch die Langlebigkeit der Zelle verstärkt wird (Nunez et al., J. Immunol., 144:3602, 1990). Das Bcl-2-Protein blockiert apoptotische Stimuli wie Wachstumsfaktorentzug, Strahlung, Hitzeschock, Virus, und die meisten chemotherapeutischen Agenzien (Reed, Hematol. Oncol. Clin. North Am., 9:451, 1995; Hockenberry et al., Nature, 348:334, 1990). In bcl-2-Ig-transgenen Mäusen wird anfänglich eine polyklonale follikuläre Lymphproliferation bestehend aus einer Expansion von reifen B-Lymphozyten beobachtet (McDonnell et al., Cell, 57:79, 1989). Anschließend entwickeln sich monoklonale hochgradige Lymphome vom großen immunblastischen Typ, wobei 50 % von diesen Umrordnungen des C-MYC aufweisen. Das legt nahe, dass eine zweite genetische Veränderung für die Entwicklung und den Fortschritt des bösartigen Lymphoms notwendig ist (McDonnell und Korsmeyer, Nature, 349:254, 1991).

[0003] Kürzlich wurde eine sich rasch vergrößernde Familie an mit Bcl-2 in Verbindung stehenden Proteinen identifiziert. Diese schließt Bax, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Bad, Bak, Mcl-1, A-1 und mehrere offene Leseraster in DNA-Viren mit ein (Oltvai et al., Cell, 74:609, 1993; Boise et al., Cell, 74:597, 1993; Yang et al., Cell, 80:285, 1995; Chittenden et al., Nature, 374:733, 1995; Kiefer et al., Nature, 374:736, 1995; Kozopas et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90:3516, 1993; Lin et al., J. Immunol., 151:1979, 1993; Pearson et al., Virology, 160:151, 1987; Neilan et al., J. Virol., 67:4391, 1993). Die Mitgliedschaft in der Bcl-2-Proteinfamilie ist im Prinzip durch Homologie mit den BH1- und BH2-Domänen definiert, die helfen, die Dimerisierung zwischen den Mitgliedern zu regulieren (Sato et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 91:9238, 1994). Bax, das mit Bcl-2 eine 21 %-ige Aminosäureidentität teilt, kann an das Bcl-2-Protein binden und seine Fähigkeit neutralisieren, den Zelltod zu blockieren. Daher denkt man, dass das Verhältnis von Bcl zu Bax die Anfälligkeit der Zelle für Tod infolge von apoptotischen Stimuli bestimmt (Oltvai et al., 1993; Yin et al., Nature, 369:321, 1994).

[0004] Phosphodiester-Antisense-Oligodesoxynukleotide, die komplementär zu spezifischen Sequenzen der Translations-Initiationsstelle der Bcl-2-mRNA sind, sind in der Lage, die Herstellung des Bcl-2-Proteins und das Wachstum der Zellen, die eine t(14;18)-Translokation tragen, zu stören (Kitada et al., Antisense Res. Dev., 3:157, 1993). Die therapeutische Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden wurde jedoch von ihrer geringen zellulären Aufnahme und ihrem raschem Abbau durch Nukleasen und anderen Serum- oder zellulären Bestandteilen erschwert. Für Phosphorthioat-Oligonukleotide, die resistent gegenüber Nukleaseabbau sind, wurde herausgefunden, dass sie FL-Zellwachstum in Konzentrationen 10 Mal niedriger als Phosphodiester-Oligonukleotide stören (Reed et al., Cancer Research, 50:6565, 1990a; Cotter et al., Oncogene, 9:3049, 1994). Diese Herangehensweise leidet jedoch unter der geringen zellulären Aufnahme der Oligonukleotide. Beispielsweise mussten Reed et al. Konzentrationen von mehr als 25 μ M an Phosphorthioaten verwenden, um eine 50 %-ige Wachstumsinhibition von Zelllinien, die von B-Zell-Lymphomen abgeleitet sind, beispielsweise 697 und Su-Dhl-4-Zellen, zu erreichen. Der liposomale Einbau führte zur verstärkten Aufnahme von Oligonukleotiden in Leukämiezellen (Akhtar et al., Nucleic Acids Res., 19:5551, 1991; Tari et al., Blood, 84:601, 1994). Die Verwendung von kanonischen Lipiden durch Reed et al., um Phosphorthioat-Antisense-Oligonukleotide zuzuführen, erlaubte es ihnen, die Konzentration an Oligonukleotiden auf 0,075 bis 0,3 μ M zu verringern und dennoch Wachstumsinhibition in Su-Dhl-4-Zellen zu induzieren.

[0005] Es besteht jedoch immer noch ein Bedarf an Verfahren und Zusammensetzungen für die Behandlung von Bcl-2-assoziierten Erkrankungen wie hämatologischen bösartigen Tumoren, sowohl Leukämien als auch Lymphomen, einschließlich follikulären und nicht-follikulären Lymphomen, chronischer lymphozytischer Leukämie, und Plasmazell-Dyskrasien, festen Tumoren wie jenen, die mit Brust-, Prostata- und Darmkrebs assoziiert sind, und Immunstörungen.

[0006] Die vorliegende Erfindung wurde entworfen, um die Nachteile des Stands der Technik zu überwinden, indem verbesserte Zusammensetzungen, die nützlich bei der Behandlung von Bcl-2-assoziierten Erkrankungen wie hämatologischen bösartigen Tumoren, sowohl Leukämien als auch Lymphomen, einschließlich follikulären und nicht-follikulären Lymphomen, chronischer lymphozytischer Leukämie, und Plasmazell-Dyskrasien, festen Tumoren wie jenen, die mit Brust-, Prostata- und Darmkrebs assoziiert sind, und Immunstörungen, zur Verfügung zu stellen. Diese Zusammensetzungen umfassen neue Antisense-Oligonukleotide um spezifische Nukleinsäuren in die Zellen von Patienten zu lenken.

[0007] Daher wird in einer Ausführungsform eine Zusammensetzung zur Verfügung gestellt, die ein erstes Polynukleotid umfasst, das mit einem zweiten Bcl-2-kodierenden Polynukleotid unter intrazellulären Bedingungen hybridisiert. Intrazelluläre Bedingungen, wie hierin definiert, schließen monovalente Kationen in einer Konzentration von ungefähr 160 mM (10 mM Na⁺; 150 mM K⁺) und eine Konzentration von zweiwertigen Kationen zu ungefähr 20 mM (18 mM Mg²⁺; 2 mM Ca²⁺ mit ein. Die intrazellulären Bedingungen können auch eine Proteinkonzentration mit einschließen, die dazu dienen würde, das Hybridisierungsvolumen zu verringern und daher die wirksame Konzentration der Nukleinsäurespezies auf ungefähr 150 mg/ml anzuheben. Weitere Inhaltsstoffe und Anforderungen solcher Zusammensetzungen sind wie in Anspruch 1 definiert.

[0008] Die ersten Polynukleotide können Oligonukleotide mit einer Länge von ungefähr 8–50 Basen sein. Die Polynukleotide können Phosphodiester-Polynukleotide sein, wie sie in der Natur gefunden werden, oder können vorzugsweise abgeleitete Polynukleotide oder sogar Polynukleotidanaloge sein. Beispielhafte Polymere wären p-Ethoxy- oder Methylphosphonat-Polynukleotide. Andere Analoga, die verwendet werden können, schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf C-5 Propyne Pyrimidin-Polynukleotide (Wagner et al., *Science*, 260:1510–1513, 1993) oder Polynukleotide wie in US 5,138,045 oder EP-A 431,523 beschrieben. Bevorzugte Analoga sind Nuklease-resistant, haben eine hohe Schmelztemperatur, (binden stark an RNA), und in bestimmten Ausführungsformen sind bevorzugte Polynukleotide hydrophob für eine effizientere Assozierung mit einer Lipidformulierung wie einem Liposom.

[0009] In einer weiteren Ausführungsform hybridisiert das Polynukleotid mit bcl-2 mRNA und vorzugsweise mit der Translationsinitiationsstelle der Bcl-2 mRNA. Es versteht sich jedoch, dass die Antisense-Moleküle der vorliegenden Erfindung mit jedem Abschnitt des bcl-2-Transkripts hybridisieren können, der bewirken kann, dass die Expression des Bcl-2-Proteins herunterreguliert wird. Es gibt bestimmte Vorteile das erste offene Leseraster anzusteuern, und wie bereits erwähnt, ist die Transkriptionsinitiationsstelle insbesondere bevorzugt. In bestimmten spezifischen Ausführungsformen kann das Polynukleotid ein Oligonukleotid mit der Sequenz 5' CAGCGTGCGCCATCCTTC 3' (SEQ ID NO:1).

[0010] Die Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung umfasst ein Lipid wie in Anspruch 1 spezifiziert. Das Lipid steht in Verbindung mit dem ersten Polynukleotid. Ein Polynukleotid, das mit einem Lipid assoziiert ist, kann als verkapstelt im wässrigen Inneren eines Liposoms, verteilt innerhalb der Lipiddoppelschicht eines Liposoms, angeheftet an das Liposom über ein Verbindungsmolekül, das sowohl mit dem Liposom als auch dem Polynukleotid assoziiert ist, komplexiert mit einem Lipid, verteilt in einer Lösung, die ein Lipid enthält, gemischt mit einem Lipid, kombiniert mit einem Lipid, als eine Suspension in einem Lipid beinhaltet, in einer Mizelle beinhaltet oder mit einer Mizelle komplexiert, oder auf andere Art und Weise mit einem Lipid assoziiert beschrieben werden.

[0011] Der Ausdruck „Lipide“, wie er in dieser Beschreibung und den Ansprüchen verwendet wird, bezeichnet jede Form sowohl natürlich vorkommender als auch synthetischer Lipide oder Liposomen. Lipide sind fettige Substanzen und sind dem Fachmann gut bekannt. Die Lipide gemäß der vorliegenden Erfindung sind nicht beschränkt auf irgendeine bestimmte Struktur in Lösung. Beispielsweise können sie in einer Doppelschichtstruktur vorliegen, als Mizellen, oder als „kollabierte“ Struktur. Sie können auch einfach in einer Lösung verteilt sein, eventuell Aggregate bilden, die entweder in Größe oder Form nicht einheitlich sind. Die Lipide sind neutral in ihrer Nettoladung und können vorzugsweise sich aus Lipid-Dioleoylphosphatidylcholin zusammensetzen, jedoch können auch andere Lipide wie andere Phosphatidylcholine, Phosphatidylglyzerine, und Phosphatidylethanolamine eingesetzt werden.

[0012] In noch einer weiteren Ausführungsform wird eine Zusammensetzung zur Verfügung gestellt, die ein Expressionskonstrukt umfasst, das für ein erstes Polynukleotid kodiert, das mit einem zweiten für Bcl-2-kodierenden Polynukleotid hybridisiert, wobei das erste Polynukleotid unter der Kontrolle eines Promoters steht, der in eukaryotischen Zellen aktiv ist. Weitere Inhaltsstoffe und Anforderungen solcher Zusammensetzung sind in Anspruch 11 definiert.

[0013] Diese Erfindung umfasst auch die Verwendung solcher Zusammensetzungen für die Herstellung eines Medikaments zur Inhibierung der Proliferation einer Krebszelle, wobei ein solches Medikament vorteilhaft in Fällen einer Vielzahl von Krebszellen wie in den Beispielen unten gezeigt angewandt werden kann. Für die Medikamente wird gezeigt, dass sie auf Krebszellen wirken, die bcl-2 überexprimieren oder auf hohen Niveaus exprimieren und auch das Bax-Protein exprimieren, als auch in Zellen, in denen die Translokation von p53 in den Nukleos nach gentoxischem Schaden durch bcl-2 inhibiert wird. Solche Zellen würden einschließen, aber nicht beschränkt sein auf, hämatologische bösartige Tumoren, sowohl Leukämien als auch Lymphome, einschließlich follikulären und nicht-follikulären Lymphomen, chronischer lymphozytischer Leukämie, und Plasmazell-Dyskrasien, festen Tumoren wie jenen, die mit Brust-, Prostata- und Darmkrebs assoziiert sind; und Immunstörungen. Die Zusammensetzung kann ein neutrales Lipid umfassen, das mit dem Polynukleotid assoziiert ist, beispielsweise ein Polynukleotid ver kapselt in einem Liposom. In einer spezifischen Ausführungsform ist die Krebszelle in einem Patienten und in bestimmten Ausführungsformen in einem menschlichen Patienten. Die Zusammensetzung kann vorteilhaft an einen menschlichen Patienten in einem Volumen von 0,50–10,0 ml pro Dosis zugeführt werden oder in einer Menge von 5–30 mg Polynukleotid pro m². In einem bestimmten Verabreichungsschema wird die Zusammensetzung dreimal pro Woche für 8 Stunden verabreicht. Es können jedoch verschiedene Dosierungen verwendet werden, wie durch den behandelten Arzt bestimmt wird, ausgehend von der jeweiligen Erkrankung, Alter und Zustand des Patienten und anderen Faktoren, die eine Entscheidung des Arztes beeinflussen können.

[0014] Diese Erfindung betrifft die Antisense-Technologie, die angewendet werden kann, um mit Bcl-2 assoziierte Erkrankungen zu behandeln. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst sie eine Zusammensetzung, die ein Polynukleotid umfasst, das mit der Translationsinitiationsstelle der Bcl-2 mRNA hybridisiert. Ein Beispiel für ein nützliches Polynukleotid ist ein Oligonukleotid, das die Sequenz CAGCGTGCGCCATCCTTC (SEQ ID NR:1) umfasst.

[0015] Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung schließen auch Zusammensetzungen mit ein, wo aus dem Lipid Liposomen gebildet werden. In einigen Fällen kann es nützlich sein, eine Zusammensetzung zu haben, in der das Polynukleotid im Liposom ver kapselt ist. Lipide, die ganz besonders nützlich bei der vorliegenden Erfindung sind, schließen Phosphatidylcholine, Phosphatidylglyzerine, und Phosphatidylethanolamine mit ein, wobei ein Beispiel das Lipid Doleoylphosphatidylcholin ist, obwohl alle annehmbaren neutralen Lipide verwendet werden können.

[0016] Ein Verfahren, eine mit Bcl-2 assoziierte Erkrankung zu inhibieren, umfasst die Schritte des Erhaltens eines Polynukleotids, das mit einem für Bcl-2 kodierenden Polynukleotid hybridisiert, Mischen des Polynukleotids mit einem neutralen Lipid um eine Polynukleotid/Lipid-Assozierung zu bilden, und Verabreichen dieser Assozierung an eine Zelle. Die Zelle kann eine Krebszelle, beispielsweise eine follikuläre Lymphomzelle, sein. Dieses Verfahren setzt ein Polynukleotid ein, das ein Oligonukleotid mit einer Länge von zwischen 8 und 50 Basen umfasst. Das Lipid kann ein Liposom umfassen. Falls dem so ist, dann kann das Liposom zudem das Polynukleotid ver kapseln.

[0017] Das In-Kontakt-Bringen kann in einem Tier, beispielsweise einem Menschen, stattfinden. Beispielsweise kann die Zusammensetzung an den Menschen in einem Volumen von 0,50–10,0 ml pro Dosis oder in einer Menge von ungefähr 5 bis ungefähr 30 mg Polynukleotid pro m² zugeführt werden. Sie kann auch dreimal pro Woche für 8 Wochen verabreicht werden.

[0018] Die folgenden Zeichnungen bilden einen Teil der vorliegenden Beschreibung und wurden eingeschlossen, um bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung noch weiter zu zeigen. Die Erfindung kann besser verstanden werden mit Verweis auf eine oder mehrere dieser Zeichnungen in Kombination mit der detaillierten Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen, die hierin dargestellt werden:

[0019] Fig. 1: Wachstumsinhibierung von lymphoiden Zellen mittels liposomalem bcl-2-Antisense-Oligonukleotiden („L-bcl-2“). Endkonzentrationen von 3 µmol/L (Punkte), 4 µmol/L (horizontal), 5 µmol/L (vertikal) und 6 µmol/L (diagonal) von L-bcl-2 wurden zu Johnson-, Jurkat-, Raji- und Daudi-Zellen zugesetzt. Nach 5 Tagen wurde die Lebendigkeit der Tumorzellen mittels alamarBlue-Farbstoff gemessen. Die Lebendigkeit wurde aus-

gedrückt als Prozentsatz der unbehandelten Zellen.

[0020] [Fig. 2](#): Nicht-spezifische Toxizität in 1 lymphoiden Zellen bei 6 $\mu\text{mol/L}$ an liposomalen Oligonukleotiden. Leere Liposomen (diagonal) und zwei verschiedene liposomale Kontrolloligonukleotide („L-Kontroll-Oligos“) (grau, schwarz) wurden zu Johnson-, Jurkat-, Raji- und Daudi-Zellen zu 6 $\mu\text{mol/L}$ als Endkonzentration zugegeben. Nach 5 Tagen wurde die Lebendigkeit der Tumorzellen mittels alamarBlue-Farbstoff gemessen. Die Lebendigkeit wurde ausgedrückt als Prozentsatz der unbehandelten Zellen.

[0021] [Fig. 3](#): Western-Blot-Analyse von Bcl-2-Protein in vier Zelllinien. Johnson-, Jurkat-, Daudi- und Raji-Zellen wurden in Probenpuffer lysiert und auf den Gesamtproteingehalt normalisiert. Fünfundzwanzig Gramm an Gesamtprotein wurden pro Spur geladen. Die Membranen wurden mit einem monoklonalen Antikörper aus Hamster gegen humanes Bcl-2 inkubiert. In Johnson-Zellen, eine Zelllinie, die die t(14;18)-Translokation trägt, wurde die Überexpression von Bcl-2-Protein beobachtet. In Jurkat- und Raji-Zellen, denen die t(14;18)-Translokation fehlt, ist die Expression von Bcl-2 niedrig. In Daudi-Zellen wurde die Expression von Bcl-2 nicht beobachtet.

[0022] [Fig. 4A](#) & [Fig. 4B](#): Spezifische Inhibition des Bcl-2-Proteins in Johnson- und Jurkat-Zellen mittels L-bcl-2.

[0023] [Fig. 4A](#): 1×10^5 Johnson-Zellen/mL in 3 mL wurden mit 3 und 4 $\mu\text{mol/L}$ an L-bcl-2 oder L-Kontroll-Oligos behandelt. Nach 3 Kulturtagen wurden Protein-enthaltende Lysate zubereitet und 5 μg an Gesamtprotein der SDS-PAGE unterworfen und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Blots wurden in Abschnitte geschnitten und mit Antikörpern inkubiert, die entweder für Bcl-2 oder Aktin spezifisch sind (links). Um die Inhibition des bcl-2-Proteins abzuschätzen, wurden die Daten abgeschätzt mittels Abtastungsdichtemessung quantifiziert und als Verhältnis von Bcl-2:Aktin ausgedrückt (rechts). L-bcl-2: gefüllte Quadrate; L-Kontrolle: (offene Kreise).

[0024] [Fig. 4B](#): 1×10^5 Jurkat-Zellen/mL in 3 mL wurden mit 3 und 4 $\mu\text{mol/L}$ an L-bcl-2 oder L-Kontroll-Oligonukleotiden behandelt. Nach 3 Kulturtagen wurden Protein-enthaltende Lysate zubereitet und 20 μg an Gesamtprotein der SDS-PAGE unterworfen und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Blots wurden in Abschnitte geschnitten und mit Antikörpern inkubiert, die entweder für Bcl-2 oder Aktin spezifisch sind (links). Um die Inhibition des bcl-2-Proteins abzuschätzen, wurden die Daten mittels Abtastungsdichtemessung quantifiziert und als Verhältnis von Bcl-2:Aktin ausgedrückt (rechts). L-bcl-2: (gefüllte Quadrate); L-Kontrolle: (offene Kreise).

[0025] [Fig. 5](#): Western-Blot-Analyse des Bax-Proteins in den vier Zelllinien. Johnson-, Jurkat-, Daudi- und Raji-Zellen wurden in Probenpuffer lysiert und auf Gesamtproteingehalt normalisiert. Fünfzig μg an Gesamtprotein wurden pro Spur geladen. Die Membranen wurden mit polyklonalem Antikörper aus dem Kaninchen gegen humanes Bax inkubiert.

[0026] [Fig. 6A](#) & [Fig. 6B](#): Das Bcl-2/Bax-Verhältnis wird in Johnson-Zellen durch L-bcl-2 verringert.

[0027] [Fig. 6A](#): 1×10^5 Johnson-Zellen/mL in 3 mL wurden mit 2, 3 und 4 $\mu\text{mol/L}$ an L-bcl-2- oder L-Kontroll-Oligos behandelt. Nach 3 Kulturtagen wurden die proteinhaltigen Lysate SDS-PAGE unterworfen und auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Blots wurden in Abschnitte geschnitten und mit Antikörpern inkubiert, die entweder für Bax oder Aktin spezifisch waren. Dieses Experiment wurde durchgeführt unter Verwendung der gleichen Lysate, die in dem in [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) gezeigten Experiment erhalten wurden.

[0028] [Fig. 6B](#): Die Daten wurden mittels Abtastungsdichtemessung quantifiziert und als Verhältnis von Bcl-2:Bax ausgedrückt. L-bcl-2: (gefüllte Quadrate); L-Kontroll-Oligo: (offene Kreise).

[0029] [Fig. 7](#): DNA-Fragmentierung in Johnson-Zellen, die mit L-bcl-2 inkubiert wurden. Johnson-Zellen wurden mit 4 $\mu\text{mol/L}$ an L-bcl-2 und zwei L-Kontroll-Oligos inkubiert. Nach 3 Inkubationstagen wurde die DNA extrahiert, durch ein 2 %-iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Spuren 1, unbehandelte Zellen; Spur 2, Zellen, die mit L-Kontroll-(durcheinander) Oligo behandelt wurden; Spur 3, Zellen, die mit L-Kontroll-(Zufalls)Oligo behandelt wurden; Spur 4, Zellen, die mit L-bcl-2 behandelt wurden.

[0030] [Fig. 8A](#) & [Fig. 8B](#): Apoptotische Johnson-Zellen, die mit L-bcl-2 inkubiert wurden.

[0031] [Fig. 8A](#): Fluoreszenzaufnahme von Johnson-Zellen, die mit dem DNA-Bindefarbstoff Acridin Orange

nach 3 Inkubationstagen mit 5 μ mol/L an L-bcl-2 (rechts) oder ohne liposomale Oligonukleotide („L-OS“) (links) eingefärbt wurden.

[0032] [Fig. 8B](#): Apoptotischer Index von Johnson-Zellen, die mit 4 und 5 μ M an L-bcl-2 (Punkte) L-Kontroll-Oligo (horizontal) oder leeren Liposomen (durchgehend) behandelt wurden. Apoptotischer Index = (Gesamtanzahl an Zellen mit apoptotischen Nuklei/Gesamtanzahl an gezählten Zellen) \times 100 %.

[0033] [Fig. 9A](#) & [Fig. 9B](#): Bewertung des Zelltodes infolge von Bestrahlung einer LNCaP-Kontrolle und bcl-2-transfizierter Zellen.

[0034] [Fig. 9A](#): Fluoreszenz-mikroskopische Bewertung der Zelltodinduktion infolge von Bestrahlung einer LNCaP-Kontrolle und bcl-2-transfizierter Zellen (LNCaP-bcl-2). Unbehandelte Kontrolle (oben links), LNCaP-bcl-2-Zellen unbehandelt (unten links), Kontroll-Zellen 24 Stunden nach γ -Bestrahlung mit 20 Gy (oben rechts) und LNCaP-bcl-2-Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung (unten rechts). Die Zellen wiesen die charakteristischen Merkmale der Apoptose auf, die im Allgemeinen in dieser Kontrolle beobachtet werden, aber nicht in LNCaP-bcl-2-Zellen nach Bestrahlung.

[0035] [Fig. 9B](#): Durchflusszytometrische Analyse der Zelltodinduktion infolge von 20 Gy an γ -Strahlung in LNCaP-Zellen. Apoptotische Zellen umfassen ungefähr 30 % der LNCaP-Vektorkontrollzellpopulation 8 Stunden nach Bestrahlung und < 5 % der nicht-bestrahlten LNCaP-bcl-2-Zellen.

[0036] [Fig. 10A](#) & [Fig. 10B](#) & [Fig. 10C](#): p53-Induktion, subzelluläre Lokalisation und Transkriptionskontrolle.

[0037] [Fig. 10A](#): Western-Blot-Analyse der Induktion des p53-Proteins und nukleärer Import infolge von γ -Bestrahlung in LNCaP-Kontrollzellen und LNCaP-bcl-2-Zellen. Subkonfluente Kulturen von Kontroll-LNCaP- und LNCaP-bcl-2-Zellen wurden mit 20 Gy bestrahlt. Gesamtzell- oder Kernextrakte, die aus ganzen Zellen isoliert wurden, wurden 2 und 4 h nach Bestrahlung zubereitet. Äquivalente Mengen an Lysat wurden mittels Immunblots mit p53-Antikörper (Santa Cruz) analysiert. Entsprechende Abtastungsdicthenmessungen zeigten an, dass die Menge an p53-Protein, die infolge von Bestrahlung induziert wurde, ungefähr äquivalent der in Gesamtzellextrakten von LNCaP-Kontroll- und LNCaP-bcl-2-Zellen ist. Die Kernakkumulation von p53-Protein wird jedoch nur in den Kernen beobachtet, die von bestrahlten LNCaP-Kontrollzellen isoliert wurden.

[0038] [Fig. 10B](#): Konfokale Mikroskopieanalyse der subzellulären Lokalisation von p53 infolge von Bestrahlung. LNCaP-Kontroll-(links) und LNCaP-bcl-2-(rechts)Zellen wurden mit 20 Gy bestrahlt, nach 4 Stunden fixiert, und das p53-Protein wurde mittels abtastender Mikroskopie mit konfokalem Laser abgelichtet. Die Kernlokalisation des p53-Proteins wird nur in den LNCaP-Kontrollzellen beobachtet.

[0039] [Fig. 10C](#): Bcl-2-Inhibition der Transkriptionsaktivierung durch wt-p53. NIH3T3-Zellen wurden mit dem Effektor-Wildtyp-(p53 WT) oder mutierten p53 (p53-MUT)-Plasmid (10 μ g), Reporterplasmid P2mdm2-Luc (4 μ g) und β -Galaktosidase (β gal) Expressionsplasmid (3 μ g) mit oder ohne den bcl-2-Expressionsvektor (BCL-2) (20 μ g) unter Verwendung des Kalziumphosphatverfahrens transfiziert. Die Ko-Transfektion mit leerem Effektorvektor (VECTOR) diente als eine Negativ-Kontrolle. Die Daten stellen das Vielfache des Zuwachs an Luciferase-Aktivität dar. Bcl-2 inhibierte signifikant die Fähigkeit des Wildtyp p53-Proteins, den mdm2-Promotor zu transaktivieren (* $p \leq 0,02$).

[0040] [Fig. 11A](#) & [Fig. 11B](#): Herunterregulierung von bcl-2 in RKO-Darmkrebszellen durch Antisense-Oligonukleotide und Lokalisierung von p53.

[0041] [Fig. 11A](#): Selektive Herunterregulierung des bcl-2-Proteins in RKO-Darmkrebszellen. Western-Blot von Gesamtzellextrakten (40 μ g) wurden mittels Immunblot auf bcl-2-Protein analysiert. Eine graphische Darstellung der relativen Menge an bcl-2-Protein nach Normalisierung auf die Proteinbeladung ist gezeigt. Behandlung mit Antisense-bcl-2-Oligonukleotiden, aber nicht mit Kontroll-Oligonukleotiden oder leeren Liposomen resultierte in einer Verringerung der Menge an bcl-2-Protein.

[0042] [Fig. 11B](#): Konfokale Mikroskopie des p53-Proteins in bestrahlten RKO-Zellen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden (oben) oder Antisense-bcl-2-Oligonukleotiden (unten) behandelt wurden. Eine signifikante Kernlokalisation des p53-Proteins infolge von Bestrahlung wird nur in den mit Antisense-bcl-2 behandelten RKO-Zellen beobachtet.

[0043] bcl-2 ist aufgrund seiner Eigenschaft den programmierten Zelltod zu blockieren ein Onkogen mit tumo-

rogenem Potenzial. Die vorliegende Erfindung setzt liposomale Antisense-Oligodesoxynukleotide ein, um die Herstellung von Bcl-2 zu inhibieren, so dass die Tumorzellen die Eigenschaft, in den programmierten Zelltod einzutreten, zurückerhalten. Die vorliegende Erfindung kann auch verwendet werden, um hämatologische bösartige Erkrankungen, sowohl Leukämien als auch Lymphome, einschließlich follikulären und nicht-follikulären Lymphomen, chronisch lymphozytische Leukämie, und Plasmazelldyskrasien, feste Tumoren, wie jene, die mit Brust-, Prostata- und Darmkrebs assoziiert sind, und Immunstörungen, die mit Bcl-2-Expression assoziiert sind, zu behandeln. Solche Erkrankungen würde jene einschließen, die Zellen einbeziehen, die Bcl-2 überexprimieren, oder auf hohem Niveau exprimieren, und die auch Bax exprimieren.

[0044] Die vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die Antisense-Oligonukleotide und Polynukleotide, die gegen Teile des bcl-2-Gens gerichtet sind, umfassen, und deren Verwendung bei der Behandlung von Erkrankungen, die mit Bcl-2 in Verbindung stehen. Eine spezifische Krebsart, die mit den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen behandelt werden kann, ist FL. Über 90 % der Patienten mit follikulärem Lymphom haben eine t(14;18)-Translokation, die in der Translokation des bcl-2-Gens von seinem normalen Ort auf Chromosom 18 in den Genlokus der schweren Immunglobulinkette auf Chromosom 14 resultiert. Als Konsequenz davon gerät das bcl-2-Gen unter den Einfluss des Enhancers der schweren Immunglobulinkette, und das Bcl-2-Protein wird überexprimiert. Da bcl-2 ein Onkogen mit tumorigenem Potenzial ist aufgrund seiner Eigenschaft, den programmierten Zelltod zu blockieren, ist eine potenzielle Therapie für diese follikulären Lymphome, die Herstellung des Bcl-2-Proteins zu inhibieren. Die vorliegende Erfindung hofft erfolgreich zu sein, wo andere Herangehensweisen versagt haben, indem stabile, Nuklease-resistente Antisense-Oligonukleotide, die spezifisch für das erste offene Leseraster, und noch spezifischer für die Translationsinitiationsstelle der Bcl-2 mRNA sind, für die Zufuhr an die Zelle in neutrale Liposomen eingebaut werden, um die Herstellung des Bcl-2-Proteins zu inhibieren.

[0045] Insbesondere wird in Erwägung gezogen, dass durch die Verwendung dieser Antisense-Moleküle, entweder alleine oder in Verbindung mit anderen Antisense-Molekülen, es möglich ist, FL und möglicherweise andere Bcl-2-Krebsen wirksam zu behandeln. Beispielsweise inhibieren liposomale bcl-2-Antisense-Oligonukleotide, wie hierin gezeigt (L-bcl-2), das Wachstum von FL-Zellen und anderen Zellen, die das Bcl-2-Protein überexprimieren. In der Ausübung der Erfindung können die Oligo- oder Polynukleotide selbst oder Expressionsvektoren, die dafür kodieren, eingesetzt werden. Das bevorzugte Verfahren der Zufuhr dieser Nukleinsäuren ist über Liposomen, und insbesondere über Liposomen, die aus neutralen Lipiden bestehen. Die Erfindung wird, in ihren verschiedenen Ausführungsformen, unten in größerem Detail beschrieben.

A. Polynukleotide und Oligonukleotide

[0046] Der Begriff „Antisense“ soll sich auf Polynukleotidmoleküle beziehen, die komplementär zu einem Teil der Bcl-2-RNA oder der damit korrespondierenden DNA komplementär sind. „Komplementäre“ Polynukleotide sind jene, die in der Lage sind, gemäß den Standardkomplementaritätsregeln von Watson-Crick Basenpaarungen einzugehen. Das bedeutet, das größere Purine mit den kleineren Pyrimidinen Basenpaarungen eingehen, um Kombinationen von Guanin gepaart mit Cytosin (G:C) und Adenin gepaart mit entweder Thymin (A:T) im Fall von DNA oder Adenin gepaart mit Uracil (A:U) im Fall von RNA zu bilden. Das Einbeziehen von weniger gebräuchlichen Basen wie Inosin, 5-Methylcytosin, 6-Methyladenin, Hypoxanthin und anderen hybridisierenden Sequenzen kann bestimmte Vorteile in einigen Fällen bieten und stört nicht die Paarung.

[0047] Das Ansteuern von doppelsträngiger (ds) DNA mit Polynukleotiden führt zur Bildung einer Drei-fach-Helix; das Ansteuern von RNA wird zur Bildung einer Doppelhelix führen. Antisense-Polynukleotide binden, wenn sie in eine Zielzelle eingeführt werden, spezifisch an ihr Zielpolynukleotid und stören die Transkription, die RNA-Prozessierung, den Transport, die Translation und/oder die Stabilität. Antisense-RNA-Konstrukte, oder eine DNA, die solche Antisense-RNAs kodiert, können eingesetzt werden, um die Gentranskription oder Translation oder beides innerhalb einer Wirtszelle zu inhibieren, entweder in vitro oder in vivo, beispielsweise in einem Wirtstier, einschließlich einem Menschen.

[0048] Die intrazelluläre Konzentration einwertiger Kationen beträgt ungefähr 160 mM (10 mM Na^+ ; 150 mM K^+). Die intrazelluläre Konzentration von zweiwertigen Kationen beträgt ungefähr 20 mM (18 mM Mg^{2+} ; 2 mM Ca^{2+}). Die intrazelluläre Proteinkonzentration, die dazu dienen würde, das Hybridisierungsvolumen zu verringern und daher die wirksame Konzentration der Nukleinsäurespezies zu erhöhen, beträgt 150 mg/ml. Die Konstrukte können in vitro unter Bedingungen getestet werden, die diese in vivo-Bedingungen nachahmen.

[0049] Antisense-Konstrukte können entworfen werden, um an den Promotor und andere Kontrollbereich, Exons, Introns oder sogar Exon-Intron-Grenzen eines Gens zu binden. Es wird erwogen, dass die wirksamsten

Antisense-Konstrukte für die vorliegende Erfindung Bereiche einschließen werden, die komplementär zur mRNA-Startstelle sind. Man kann solche Konstrukte einfach testen, indem man einfach die Konstrukte in vitro testet, um zu bestimmen, ob die Konzentrationen des Zielproteins beeinflusst werden. Solch eine Überprüfung kann durchgeführt werden mittels des Transfers nackter Polynukleinsäuremoleküle in die Zelle über verschiedene Techniken, die im Stand der Technik bekannt sind, oder indem zuerst die Nukleinsäuremoleküle mit einem oder mehreren Lipiden assoziiert werden. In ähnlicher Weise kann auch die nachteilige nicht-spezifische Inhibition der Proteinsynthese durch Bestimmung der Lebendigkeit der Zielzellen in vitro gemessen werden.

[0050] Wie hierin verwendet, bezeichnen die Begriffe „komplementär“ oder „Antisense“ Polynukleotide, die im Wesentlichen über ihre gesamte Länge komplementär sind und nur sehr wenige Basenfehlpaarungen aufweisen. Beispielsweise können Sequenzen mit einer Länge von 15 Basen komplementär genannt werden, wenn sie ein komplementäres Nukleotid für 13 oder 14 Positionen von 15 haben. Natürlich werden Sequenzen, die „vollständig komplementär“ oder „Komplementäre voller Länge“ sind, Sequenzen sein, die über ihre gesamte Länge vollständig komplementär sind und keine Basenfehlpaarungen aufweisen.

[0051] Andere Sequenzen mit einem geringeren Homologiegrad werden ebenfalls erwogen. Beispielsweise könnte ein Antisense-Konstrukt entworfen werden, dass beschränkte Bereiche hoher Homologie hat, aber ebenfalls einen nicht-homologen Bereich (z.B. ein Ribozym) beinhaltet. Diese Moleküle würden, obwohl sie weniger als 50 % Homologie haben, an die Zielsequenzen unter geeigneten Bedingungen binden.

[0052] Die oben beschriebenen Polynukleotide können ein bcl-2-Gen kodieren oder einen Teil des Gens, der ausreichend ist, um die Antisense-Inhibierung der Proteinexpression zu bewirken. Die Polynukleotide können von genomicscher DNA abgeleitet werden, d.h. direkt aus dem Genom eines bestimmten Organismus kloniert werden. In anderen Ausführungsformen können die Polynukleotide jedoch komplementäre DNA (cDNA) sein. cDNA ist DNA, die zubereitet wird unter Verwendung von Boten-RNA (mRNA) als Matrize. Daher enthält eine cDNA nicht alle unterbrochenen Kodierungssequenzen und enthält normalerweise beinahe ausschließlich den (die) kodierende Bereich(e) für das korrespondierende Protein. In anderen Ausführungsformen kann das Antisense-Polynukleotid synthetisch hergestellt werden.

[0053] Es kann vorteilhaft sein, Teile der genomicschen DNA mit cDNA oder synthetischen Sequenzen zu kombinieren, um spezifische Konstrukte zu erzeugen. Beispielsweise wird man da, wo im Endkonstrukt ein Intron gewünscht ist, einen genomicschen Klon verwenden müssen. Die cDNA oder ein synthetisiertes Polynukleotid kann praktischere Restriktionsschnittstellen für den verbleibenden Teil des Konstrukts zur Verfügung stellen und würde daher für den Rest der Sequenz verwendet werden.

[0054] Die DNA- und Proteinsequenzen für Bcl-2 sind in der Literatur durch Tsujimoto und Croce veröffentlicht worden (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5214, 1986) (SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 & SEQ ID NO:7). Es wird erwogen, dass natürliche Varianten von Bcl-2 existieren, die andere Sequenzen haben, als die darin offenbarten. Daher ist die vorliegende Erfindung nicht beschränkt auf die Verwendung der zur Verfügung gestellten Polynukleotidsequenz für Bcl-2, sondern schließt vielmehr die Verwendung aller natürlich vorkommenden Varianten mit ein. In Abhängigkeit von der bestimmten Sequenz solcher Varianten können sie zusätzliche Vorteile hinsichtlich der Zielselektivität, d.h. dem Vermeiden von Antisense-Inhibition verwandter Transkripte, zur Verfügung stellen. Die vorliegende Erfindung umfasst auch chemisch synthetisierte Mutanten dieser Sequenzen.

[0055] Wie oben festgehalten, können die Antisense-Sequenzen, obwohl sie die genomicsche Information der vollen Länge haben oder cDNA-Kopien oder größere Fragmente davon sein können, auch kürzere Fragmente sein, oder „Oligonukleotide“, die hierin als Polynukleotide von 50 oder weniger Basen definiert sind. Obwohl kürzere Oligomere (8-20) einfacher zu machen sind und die *in vivo* Zugänglichkeit erhöhen, sind zahlreiche andere Faktoren an der Bestimmung der Spezifität der Basenpaarung beteiligt. Beispielsweise steigen sowohl die Bindungsaffinität als auch die Sequenzspezifität eines Oligonukleotids für sein komplementäres Ziel mit zunehmender Länge. Es wird erwogen, dass Oligonukleotide aus 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Basenpaaren oder größer verwendet werden können. Während die gesamte oder ein Teil der Gensequenz im Rahmen der Antisense-Konstruktion eingesetzt werden kann, sollte statistisch jede Sequenz einer Länge von 17 Basen nur einmal im menschlichen Genom auftreten und daher ausreichend sein, um eine einzigartige Zielsequenz zu spezifizieren.

[0056] In bestimmten Ausführungsformen wird man wünschen, Antisense-Konstrukte einzusetzen, die andere Elemente einschließen, beispielsweise jene, die C-5 Propyne-Pyrimidin mit einschließen. Für Oligonukleotide, die C-5 Propyne-Analoga von Uridin und Cytidin enthalten, wurde gezeigt, dass sie an RNA mit hoher Af-

finität binden und leistungsfähige Antisense-Inhibitoren der Genexpression sind (Wagner et al., 1993). In der Ausübung der Erfindung können derivatisierte Polynukleotide oder Phosphodiester-Analoga wie p-Ethoxy- oder Methylphosphonat-Oligonukleotide verwendet werden. Solche Polynukleotide können bestimmte Vorteile bieten, beispielsweise Nukleaseresistenz. Es ist die Entdeckung der vorliegenden Erfinder, dass p-Ethoxy-Oligonukleotide, die hydrophob sind, auch vorteilhaft darin sind, dass sie effizienter in Liposomen eingebaut werden.

[0057] Als Alternative zur gezielten Antisense-Zufuhr können gezielt Ribozyme verwendet werden. Der Ausdruck „Ribozym“ bezieht sich auf ein RNA-basiertes Enzym, das in der Lage ist, bestimmte Basensequenzen in sowohl DNA als auch RNA anzusteuern und zu spalten. Ribozyme können entweder direkt auf Zellen ausgerichtet werden in Form von RNA-Oligonukleotiden mit eingebauten Ribozymsequenzen, oder in die Zelle als Expressionsvektor, der für die gewünschte ribosomale RNA kodiert, eingeführt werden. Ribozyme können in nahezu der gleichen Weise wie für das Antisense-Polynukleotid beschrieben verwendet und angewendet werden. Ribozymsequenzen können auch in nahezu derselben Weise wie das Antisense-Polynukleotid modifiziert werden. Beispielsweise könnte man nicht-Watson-Crick-Basen einbauen, oder gemischte RNA/DNA-Oligonukleotide machen, oder das Phosphodiestergrat modifizieren.

[0058] Alternativ können die Antisense-Oligo- und Polynukleotide, die oben beschrieben wurden, auch als mRNA über die Transkription von Expressionskonstrukten zur Verfügung gestellt werden, die Nukleinsäuren tragen, die für die Oligo- oder Polynukleotide kodieren. Über diese ganze Anmeldung hinweg soll der Ausdruck „Expressionskonstrukt“ jeden Typ an genetischem Konstrukt mit einschließen, der eine Nukleinsäure beinhaltet, der für ein Antisense-Produkt kodiert, indem ein Teil oder die gesamte Nukleinsäuresequenz in der Lage ist, transkribiert zu werden. Typische Expressionsvektoren schließen bakterielle Plasmide oder Phagen beispielsweise eines/einer aus der pUC- oder Bluescript™-Plasmidserie oder wie weiter unter diskutiert wird, virale Vektoren, die für die Verwendung in eukaryotischen Zellen angepasst wurden, mit ein.

[0059] In bevorzugten Ausführungsformen kodieren die Nukleinsäuren ein Antisense-Oligo- oder Polynukleotid unter der transkriptionellen Kontrolle eines Promotors. Ein „Promotor“ bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die von der synthetischen Maschinerie der Zelle erkannt wird, oder in die synthetische Maschinerie eingeführt wird, was notwendig ist, um die spezifische Transkription eines Gens zu initiieren. Der Ausdruck „unter transkriptioneller Kontrolle“ meint, dass der Promotor am richtigen Ort und in der richtigen Orientierung sich relativ zur Nukleinsäure befindet, um die RNA-Polymeraseinitiation zu kontrollieren.

[0060] Der Begriff Promotor wird hier verwendet werden, um sich auf eine Gruppe von transkriptionellen Kontrollmodulen zu beziehen, die rund um die Initiationsstelle für die RNA-Polymerase II gehäuft vorliegen. Viel von dem, wie man denkt, dass Promotoren organisiert sind, leitet sich von Analysen von mehreren viralen Promotoren einschließlich jener für die HSV-Thymidinkinase (tk) und den frühen Transkriptionseinheiten von SV40 ab. Diese Studien, verstärkt durch kürzliche Arbeiten, haben gezeigt, dass sich Promotoren aus unabhängigen funktionalen Modulen zusammensetzen, von denen jedes aus ungefähr 7-20 bp an DNA besteht, und eine oder mehrere Erkennungsstellen für transkriptionelle Aktivator- oder Repressorproteine enthält.

[0061] Mindestens ein Modul in jedem Promotor hat die Funktion, die Startstelle für die RNA-Synthese zu positionieren. Das bekannteste Beispiel dafür ist die TATA-Box, aber in einigen Promotoren, denen eine TATA-Box fehlt, beispielsweise der Promotor für das terminale Deoxynukleotidyltransferase-Gen in Säugetieren und der Promotor für die späten Gene von SV40, hilft ein einzelnes Element, das über der Startstelle selbst liegt, den Platz für die Initiation festzulegen.

[0062] Zusätzliche Promotorelemente regulieren die Frequenz der transkriptionellen Initiation. Typischerweise befinden sich diese im Bereich 30-110 bp stromaufwärts der Startstelle, obwohl für eine Anzahl von Promotoren kürzlich gezeigt wurde, dass sie funktionelle Elemente stromabwärts der Startstelle ebenfalls enthalten. Der Abstand zwischen den Promotorelementen ist häufig flexibel, so dass die Promotorfunktion erhalten wird, wenn die Elemente invertiert oder relativ zu einander bewegt werden. Im tk-Promotor kann der Abstand zwischen dem Promotorelementen auf 50 bp voneinander erhöht werden, bevor die Aktivität abzunehmen beginnt. In Abhängigkeit vom Promotor erscheint es so, dass individuelle Elemente entweder kooperativ oder unabhängig voneinander wirken können, um die Transkription zu aktivieren.

[0063] Der jeweilige Promotor, der eingesetzt wird, um die Expression einer Nukleinsäure zu kontrollieren, die für ein inhibitorisches Peptid kodiert, wird nicht als wichtig erachtet, solange er in der Lage ist, das Peptid in der angesteuerten Zelle zu exprimieren. Daher ist es doch da, wo eine menschliche Zelle angesteuert werden soll, bevorzugt, die Nukleinsäure, die für das inhibitorische Peptid kodiert, benachbart zu und unter Kontrolle

eines Promotors zu positionieren, der in der menschlichen Zelle aktiv ist. Allgemein gesprochen könnte solch ein Promotor entweder einen humanen oder einen viralen Promotor einschließen.

[0064] In verschiedenen Ausführungsformen kann der Promotor des menschlichen Cytomegalievirus (CMV) für die unmittelbaren frühen Gene verwendet werden, der frühe Promotor von SV40 und die lange terminale Wiederholung des Rous-Sarkomavirus, um eine Expression verschiedener Proteine auf hohem Niveau zu erhalten. Die Verwendung von anderen viralen oder Säugetier-, zellulären oder bakteriellen Phagenpromotoren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, um Expression der oben beschriebenen Peptide zu erreichen, wird ebenfalls in Erwägung gezogen, vorausgesetzt, dass die Expressionsniveaus für einen gegebenen Zweck ausreichend sind.

[0065] Durch das Einsetzen eines Promotors mit bekannten Eigenschaften, kann das Niveau und Muster der Expression eines Antisense-Oligo- oder Polynukleotids optimiert werden. Des Weiteren kann die Auswahl eines Promotors, der in Reaktion auf spezifische physiologische Signale reguliert wird, die induzierbare Expression eines inhibitorischen Proteins erlauben. Beispielsweise resultiert eine Nukleinsäure unter Kontrolle des humanen PAI-1-Promotors in einer Expression, die durch Tumornekrosefaktor induzierbar ist. Die Tabellen 1 und 2 listen mehrere Elemente/Promotoren auf, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, um die Expression von Antisense-Konstrukten zu regulieren. Diese Liste soll nicht erschöpfend für alle möglichen Elemente sein, die an der Förderung der Expression beteiligt sind sondern bloß beispielhaft dafür sein.

[0066] Enhancer wurden ursprünglich nachgewiesen als genetische Elemente, die die Transkription von einem Promotor, der sich an einer entfernten Position auf demselben DNA-Molekül befindet, erhöhten. Diese Eigenschaft, über eine große Distanz zu wirken, hatte wenig Präzedenz in den klassischen Studien der prokaryotischen transkriptionellen Regulation. Sich daran anschließende Arbeiten zeigten, dass der DNA-Bereich mit Enhanceraktivität sehr ähnlich wie die Promotoren organisiert ist. D.h. sie setzen sich aus vielen individuellen Elementen zusammen, von denen jedes an einer oder mehreren transkriptionellen Proteine bindet.

[0067] Die Grundunterscheidung zwischen Enhancern und Promotoren ist in der Wirkung bedingt. Ein Enhancerbereich als Ganzes muss in der Lage sein, die Transkription über eine Distanz zu stimulieren; das muss nicht auf einen Promotorbereich oder seine Bestandteilelemente zutreffen. Auf der anderen Seite muss ein Promotor ein oder mehrere Elemente aufweisen, die die Initiation der RNA-Synthese an eine bestimmte Stelle lenken und eine bestimmte Orientierung, wohingegen Enhancern diese Spezifitäten fehlen. Promotoren und Enhancer überlappen oft und sind benachbart, wobei sie oft eine sehr ähnliche modulare Organisation zu haben scheinen.

[0068] Weiter unten ist eine Liste an viralen Promotoren, zellulären Promotoren/Enhancern und induzierbaren Promotoren/Enhancern, die in Kombination mit der Nukleinsäure, die für ein NF-IL6-inhibitorisches Peptid in einem Expressionskonstrukt kodiert, verwendet werden könnten (Tabelle 1 und Tabelle 2). Darüber hinaus könnte jede Promotor/Enhancer-Kombination (gemäß der Datenbank EPDB für eukaryotische Promotoren) ebenfalls verwendet werden, um die Expression einer oben beschriebenen Nukleinsäure anzutreiben. Die Verwendung eines T3, T7 oder SP6 zytoplasmatischen Expressionssystems ist eine weitere mögliche Ausführungsform. Eukaryotische Zellen können die zytoplasmatische Transkription von bestimmten bakteriellen Promotoren unterstützen, wenn die geeignete bakterielle Polymerase zur Verfügung gestellt wird, entweder als Teil des Zufuhrkomplexes oder als zusätzliches genetisches Expressionskonstrukt.

TABELLE 1

PROMOTOR

Immunglobulin, Schwere Kette	c-HA-ras
Immunglobulin, Leichte Kette	Insulin
T-Zell-Rezeptor	Nervenzellenadhäsionsmolekül (NCAM)
HLA DQ α und DQ β	α 1-Antitrypsin
β -Interferon	H2B (TH2B) Histon
Interleukin-2	Maus- oder Typ I-Kollagen
Interleukin-2-Rezeptor	Glukose-regulierende Proteine (GRP94 und GRP78)
MHC Klasse II 5	Wachstumshormon der Ratte
MHC Klasse II HLA-DR α	Serum Amyloid A des Menschen (SAA)
β -Aktin	Troponin I (TN I)
Muskelkreatin-Kinase	Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor
Präalbumin (Transthyretin)	Duchenne Muskeldystrophy
Elastase I	SV40
Metallthionein	Polyoma
Kollagenase	Retroviren
Albumin-Gen	Papillomavirus
α -Fetoprotein	Hepatitis B Virus
τ -Globin	menschliches Immunschwächevirus
β -Globin	Zytomegalievirus
c-fos	Leukämievirus des Gibbonaffen

TABELLE 2

Element	Induktor
MT II	Phorbolester (TPA), Schwermetalle
MMTV (Brusttumorvirus der Maus)	Glukokortikoide
β -Interferon	poly(rI)X poly(rC)
Adenovirus 5 E2	Ela
c-jun	Phorbolester (TPA), H_2O_2
Kollagenase	Phorbolester (TPA)
Stromelysin	Phorbolester (TPA), IL-1
SV40	Phorbolester (TPA)
MX-Gen der Maus	Interferon, Newcastle-Krankheits-Virus
GRP78-Gen	A23187
α -2-Macroglobulin	IL-6
Vimentin	Serum
MHC Klasse I Gen H-2kB	Interferon
HSP70	Ela, großes T-Antigen von SV40
Proliferin	Phorbolester (TPA)
Tumornekrosefaktor	PHA
Thyroid stimulierendes Hormon- α -Gen	Thyroidhormon

[0069] In bestimmten Ausführungsformen dieser Erfindung kann die Zufuhr einer Nukleinsäure an eine Zelle in vitro oder in vivo durch das Einbeziehen eines Markers in das Expressionskonstrukt identifiziert werden. Der Marker würde in einer identifizierbaren Veränderung der transfizierten Zelle resultieren, was die einfache Identifizierung der Expression gestattet. Enzyme wie die Thymidinkinase (tk) des Herpes simplex Virus (eukaryotisch) oder die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) (prokaryotisch) können verwendet werden.

[0070] Man kann auch ein Polyadenylierungssignal mit einschließen, um die richtige Polyadenylierung des Transkripts zu bewirken. Die Natur des Polyadenylierungssignals wird nicht als kritisch für die erfolgreiche Durchführung der Erfindung angesehen, und jede solche Sequenz kann eingesetzt werden. Beispiele schließen die Polyadenylierungssignale von SV40, Globin oder Adenovirus mit ein. Ebenfalls als Element der Expressionskassette in Erwägung gezogen wird ein Terminator. Diese Elemente können dazu dienen, die Konzentrationen der Botschaft zu verstärken und das Durchlesen aus der Kassette in andere Sequenzen zu minimieren.

B. Lipidformulierungen

[0071] Die oben beschriebenen Antisense-Oligo- oder Polynukleotide und Expressionsvektoren sind mit einem Lipid assoziiert. Ein Polynukleotid, das mit einem Lipid assoziiert ist, kann in dem wässrigen Inneren eines Liposoms verkapstelt sein, innerhalb der Lipiddoppelschicht eines Liposoms verteilt sein, an ein Liposom über ein verbindendes Molekül, das sowohl mit dem Liposom als auch dem Polynukleotid assoziiert ist, angeheftet sein, in einem Liposom eingesperrt sein, innerhalb eines Liposoms komplexiert sein, in einer Lösung, die ein Lipid enthält, verteilt sein, mit einem Lipid gemischt sein, mit einem Lipid kombiniert sein, in einer Suspension mit einem Lipid enthalten sein, enthalten oder komplexiert sein mit einer Mizelle, oder auf andere Weise mit einem Lipid assoziiert sein. Die Lipid- oder Lipid/Oligonukleotidassoziierten Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind nicht beschränkt auf irgendeine besondere Struktur in Lösung. Beispielsweise können sie in einer

Doppelschichtstruktur vorliegen, als Mizellen, oder in einer „kollabierten“ Struktur. Sie können auch einfach in einer Lösung verteilt sein, möglicherweise Aggregate bilden, die entweder nach Größe oder Gestalt nicht einheitlich sind. Die Lipide können in Form von Liposomen, die im Stand der Technik bekannt sind als multilamellare Vesikel, als kleine oder große unilamellare Vesikel oder als andere Typen von im Stand der Technik bekannten Vesikeln vorliegen.

[0072] Lipide sind fettige Substanzen, die natürlich auftretende oder synthetische Lipide sein können. Beispielsweise schließen Lipide die fettigen Tropfen mit ein die natürlicherweise im Zytoplasma auftreten, als auch die Verbindungsklassen, die dem Fachmann gut bekannt sind, die langkettige aliphatische Kohlenwasserstoffe und deren Derivate enthalten, beispielsweise Fettsäuren, Alkohol, Amine, Aminoalkohole, und Aldehyde. Ein Beispiel ist das Lipid Doleoylphosphatidylcholin.

[0073] „Liposom“ ist ein generischer Ausdruck, der eine Vielzahl an Einzel- und multilamellaren Lipidvehikeln einschließt, die durch die Generierung von geschlossenen Lipiddoppelschichten oder Aggregaten gebildet werden. Liposomen können so charakterisiert werden, dass sie vesikuläre Strukturen mit einer Phospholipiddoppelschichtmembran und ein inneres wässriges Medium haben. Multilamellare Liposomen haben multipe Lipidschichten, die durch wässriges Medium von einander abgetrennt sind. Sie bilden sich spontan, wenn Phospholipide in einem Überschuss an wässriger Lösung suspendiert werden. Die Lipidbestandteile vollziehen eine Selbstneuanordnung vor der Bildung von geschlossenen Strukturen und sperren Wasser und gelöste Substanzen zwischen den Lipiddoppelschichten ein (Ghosh und Bachhawat, In: Wu G. Wu C Hrsg. Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands, New York: Marel Dekker, S. 87-104, 1991). Die vorliegende Erfindung umfasst jedoch auch Zusammensetzungen, die andere Strukturen in Lösung haben, als normale vesikuläre Strukturen. Beispielsweise können die Lipide eine Mizellenstruktur annehmen oder einfach nur als nichteinheitliche Aggregate von Lipidmolekülen existieren. Ebenfalls erwogen werden Lipofectamin-Nukleinsäurekomplexe.

[0074] Liposomen-vermittelte Polynukleotidzufuhr und Expression fremder DNA in vitro ist sehr erfolgreich gewesen. Wong et al. (Gene, 10:87–94, 1980) zeigten die Machbarkeit der Liposomen-vermittelten Zufuhr und Expression fremder DNA in kultivierten Hühnerembryo-, HeLa- und Hepatomenzellen. Nicolau et al., (Methods Enzymol., 149:157–176, 1987) erreichten den erfolgreichen Liposomen-vermittelten Gentransfer in Ratten nach intravenöser Injektion.

[0075] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann das Lipid mit einem hämagglutinierenden Virus (HVJ) assoziiert sein. Dafür ist gezeigt worden, dass es die Fusion mit der Zellmembran erleichtert und den Eintritt in die Zelle von Liposomen-verkapselter DNA fördert (Kaneda et al., Science, 243:375–378, 1989). In anderen Ausführungsformen kann das Lipid komplexiert sein oder in Verbindung mit nukleären nicht-Histon chromosomal Proteinen (HMG-1) eingesetzt werden (Kato et al., J. Biol. Chem., 266:3361–3364, 1991). In noch weiteren Ausführungsformen kann das Lipid komplexiert sein oder in Verbindung mit sowohl HVJ als auch HMG-1 eingesetzt werden. Insofern solche Expressionsvektoren erfolgreich beim Transfer und der Expression eines Polynukleotids in vitro und in vivo eingesetzt wurden, sind sie auch für die vorliegende Erfindung anwendbar. Wo ein Bakterienpromotor im DNA-Konstrukt eingesetzt wird, wird es auch wünschenswert sein, innerhalb des Liposoms eine geeignete Bakterienpolymerase einzuschließen.

[0076] Neutrale Phospholipide werden für die Zubereitung der Liposomen verwendet.

[0077] Lipide, die geeignet für die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung sind, können von kommerziellen Quellen erhalten werden. Beispielsweise kann Dimyristylyphosphatidylcholin („DMPC“) von Sigma Chemical Co. erhalten werden, Dicetylphosphat („DCP“) erhält man von K & K Laboratories (Plainview, NY); Cholesterin („Chol“) erhält man bei Calbiochem-Behring; Dimyristoylyphosphatidylglycerin („DMPG“) und andere Lipide können von Avanti Polar Lipids. Inc. (Birmingham, Ala) erhalten werden. Lipidvorratslösungen in Chloroform oder Chloroform/Methanol können bei ungefähr 20°C gelagert werden. Vorzugsweise wird Chloroform als das einzige Solvens verwendet, da es leichter verdampfbar ist als Methanol.

[0078] Phospholipide aus natürlichen Quellen wie das Phosphatidylcholin aus dem Ei oder der Sojabohne, phosphatidische Säure („phosphatidic acid“) des Gehirns, Phosphatidylinositol des Gehirns oder aus der Pflanze, Kardiolipin des Herzens und Phosphatidylethanolamin aus Pflanzen oder Bakterien werden vorzugsweise nicht als das primäre Phosphatid verwendet, d.h. stellen 50 % oder mehr der Gesamtphosphatidzusammensetzung dar, aufgrund der Instabilität und Durchlässigkeit der resultierenden Liposomen.

[0079] Liposomen, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können über verschiedene Ver-

fahren hergestellt werden. Die Größe der Liposomen variiert in Abhängigkeit vom Syntheseverfahren. Ein Liposom, das in einer wässrigen Lösung suspendiert ist, liegt im Allgemeinen in Gestalt eines sferischen Vesikels vor, mit einer oder mehreren konzentrischen Schichten an Lipiddoppelschichtmolekülen. Jede Schicht besteht aus einer parallelen Anordnung von Molekülen dargestellt durch die Formel XY, wobei X ein hydrophiler Anteil und Y ein hydrophober Anteil ist. In der wässrigen Suspension sind die konzentrischen Schichten so angeordnet, dass die hydrophilen Anteile dazu tendieren, in Berührung mit der wässrigen Phase zu bleiben und die hydrophoben Bereiche dazu tendieren, selbst miteinander zu assoziieren. Beispielsweise können die Lipidmoleküle, wenn sowohl innerhalb als auch außerhalb des Liposoms wässrige Phasen vorliegen, eine Doppelschicht der Anordnung XY-YX bilden, die als Lamelle bekannt ist. Lipidaggregate können sich bilden, wenn die hydrophilen und hydrophoben Teile von mehr als einem Lipidmolekül miteinander assoziieren. Die Größe und Gestalt dieser Aggregate wird von vielen verschiedenen Variablen abhängen, beispielsweise der Natur des Lösungsmittels und dem Vorliegen von anderen Verbindungen in der Lösung.

[0080] Liposomen im Rahmen der vorliegenden Erfindung können zubereitet werden in Übereinstimmung mit bekannten Labortechniken. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Liposomen durch das Mischen von liposomalen Lipiden in einem Solvens in einem Container z.B. einem Glas, einem birnenförmigen Fläschchen zubereitet. Der Container sollte ein Volumen aufweisen, dass 10-mal größer ist als das Volumen der erwarteten Liposomensuspension. Unter Verwendung eines Rotationsverdampfers wird das Lösungsmittel bei ungefähr 40°C unter negativem Druck entfernt. Das Lösungsmittel wird normalerweise innerhalb von ungefähr 5 Min. bis 2 Stunden entfernt, abhängig vom gewünschten Volumen der Liposomen. Die Zusammensetzung kann in einem Desikator unter Vakuum noch weiter getrocknet werden. Aufgrund einer Tendenz, mit der Zeit schlechter zu werden, werden die getrockneten Lipide im Allgemeinen nach ungefähr einer Woche weggeworfen.

[0081] Getrocknete Lipide können bei ungefähr 25–50 mM Phospholipid in sterilem, Pyrogen-freiem Wasser durch Schütteln hydratisiert werden, bis der gesamte Lipidfilm resuspendiert ist. Die wässrigen Liposomen können dann in Aliquots aufgetrennt werden, von denen jedes in ein Fläschchen platziert wird, lyophilisiert wird und unter Vakuum versiegelt wird.

[0082] Alternativ können Liposomen in Übereinstimmung mit anderen bekannten Laborvorgehensweisen zubereitet werden: Das Verfahren von Bangham et al., (J. Mol. Biol., 13:238, 1965), das Verfahren von Gregoridis, wie es in DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE, G. Gregoridis Hrsg. (1979) S. 287–341 beschrieben ist, das Verfahren von Deamer und Uster, (LIPOSOMES, M. Ostro Hrsg. 1983), und das Reversphasenevaporationsverfahren wie von Szoka und Papahadjopoulos (Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 75:4194–98, 1978) beschrieben. Die zuvor erwähnten Verfahren unterscheiden sich in ihren entsprechenden Fähigkeiten wässriges Material einzusperren und ihren entsprechenden Verhältnissen des wässrigen Raums gegenüber dem Lipid.

[0083] Die getrockneten Lipide oder lyophilisierten Liposomen, die wie oben beschrieben zubereitet wurden, können dehydriert werden und in einer Lösung inhibitorischen Peptids rekonstituiert werden und auf eine geeignete Konzentration mit einem geeigneten Lösungsmittel z.B., DPBS verdünnt werden. Das Gemisch wird dann heftig in einem Vortexmischer geschüttelt. Nichtverkapselte Nukleinsäure wird durch Zentrifugation bei 29000 × g entfernt und die liposomalen Pellets werden gewaschen. Die gewaschenen Liposomen werden in einer geeigneten Gesamtphospholipidkonzentration, z.B. ungefähr 50–200 mM, resuspendiert. Die Menge an verkapselter Nukleinsäure kann in Übereinstimmung mit Standardverfahren bestimmt werden. Nach Bestimmung der Menge an verkapselter Nukleinsäure in der Liposomenzubereitung können die Liposomen auf geeignete Konzentrationen verdünnt werden und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert werden.

[0084] P-Ethoxy-Oligonukleotide, Nuklease-resistente Analoga von Phosphodiestern, sind bevorzugt, weil sie in Serum stabil sind und effektiv in das zelluläre Zytosol transportiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Lipid Dioleoylphosphatidylcholin eingesetzt. Es können jedoch auch andere Lipide wie andere Phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerine und Phosphatidylethanolamine nützlich sein. Nuklease-resistente Oligonukleotide werden mit den Lipiden in Anwesenheit eines Überschusses an t-Butanol vermischt. Das Gemisch wird gevortext bevor es in einem Aceton/Trockeneisbad gefroren wird. Das gefrorene Gemisch wird lyophilisiert und mit Hepes-gepufferter Saline (1 mM Hepes, 10 mM NaCl, pH 7,5) über Nacht hydriert, und dann werden die Liposomen in einem Ultraschallwasserbad für 10–15 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Größe der liposomalen Oligonukleotide liegt typischerweise im Bereich zwischen 200–300 nm im Durchmesser, was mittels des Submicron Particle Sizer Autodilute Model 370 (Nicomp, Santa Barbara, CA) bestimmt wurde.

Retroviren.

[0085] Die Retroviren sind eine Gruppe an einzelsträngigen RNA-Viren dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Fähigkeit haben ihre RNA in doppelsträngige DNA in infizierten Zellen über einen Prozess der reversen Transkription umzusetzen (Coffin, In: *Virology*, Fields et al. (Hrsg.), New York: Raven Press, S. 1437–1500, 1990). Die resultierende DNA integriert dann stabil in die zellulären Chromosomen als ein Provirus und steuert die Synthese der viralen Proteine. Die Integration resultiert in der Zurückhaltung der viralen Gensequenzen in der Empfängerzelle und ihren Nachkommen. Das retrovirale Genom enthält drei Gene – gag, pol und env – die für Kapsidproteine, Polymeraseenzym bzw. Hüllbestandteile kodieren. Eine Sequenz, die man stromaufwärts des gag-Gens findet, genannt Ψ , wirkt als Signal für das Verpacken des Genoms in Virionen. Zwei lange terminale Wiederholungs(LTR)-Sequenzen liegen am 5'- und an den 3'-Enden des viralen Genoms vor. Diese enthalten starke Promotor- und Enhancersequenzen und werden auch für die Integration in das Genom der Wirtszelle benötigt (Coffin, 1990).

[0086] Um einen retroviralen Vektor zu konstruieren wird eine Nukleinsäure, die für ein Bcl-2-Antisense-Konstrukt kodiert, in das virale Genom an die Stelle bestimmter viraler Sequenzen eingesetzt, um ein Virus herzustellen, das replikationsdefekt ist. Um Virionen zu produzieren wird eine Verpackungszelllinie, die die gag-, pol- und env-Gene, aber ohne die LTR- und Ψ -Bestandteile, enthält, konstruiert (Mann et al., *Cell*, 33:153–159, 1983). Wenn ein rekombinantes Plasmid, das eine eingesetzte DNA enthält, zusammen mit den retrovirusalen LTR- und Ψ -Sequenzen, in diese Zelllinie eingeführt wird (mittels Kalziumphosphatpräzipitierung zum Beispiel), erlaubt die Ψ -Sequenz dem RNA-Transkript des rekombinanten Plasmids in virale Partikel verpackt zu werden, die dann in das Kulturmedium sekretiert werden (Nicolas und Rubenstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodrigues und Denhardt, (Hrsg.), Stoneham: Butterworth, S. 494–513, 1988; Temin, In: *Gen Transfer*, Kucherlapati (Hrsg.), New York: Plenum Press, S. 149–188, 1986; Mann et al., 1983). Die Medien, die die rekombinanten Retroviren enthalten, werden dann gesammelt, ggf. aufkonzentriert und für den Gentransfer verwendet. Retrovirale Vektoren sind in der Lage, eine breite Vielzahl an Zelltypen zu infizieren. Die Integration und stabile Expression benötigt jedoch die Teilung der Wirtszellen (Paskind et al., *Virology*, 67:242–248, 1975).

Adenoviren:

[0087] Humane Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Tumorviren mit Genomgrößen von ungefähr 36 kB. Als Modellsystem für die eukaryotische Genexpression sind Adenoviren in großem Umfang untersucht und gut charakterisiert worden, was sie zu einem attraktiven System für die Entwicklung von Adenovirus als Gentransfersystem macht. Diese Virengruppe ist einfach zu züchten und zu manipulieren und sie weisen ein breites Wirtsspektrum in vitro und in vivo auf. In lytisch infizierten Zellen sind Adenoviren in der Lage, die Proteinsynthese des Wirts abzuschalten, die zellulären Maschinerien so zu steuern, dass sie große Mengen an viralen Proteinen synthetisieren und reichliche Mengen an Virus herstellen.

[0088] Der E1-Bereich des Genoms schließt E1A und E1B mit ein, die Proteine kodieren, die für die Transkriptionsregulation des viralen Genoms sowie für einige wenige zelluläre Gene verantwortlich sind. Die Expression von E2 einschließlich E2A und E2B erlaubt die Synthese viraler Replikationsfunktionen, z.B. DNA-Bindeprotein, DNA-Polymerase, und ein terminales Protein, das grundlegend für die Replikation ist. E3-Genprodukte verhindern Zytolyse durch zytotoxische T-Zellen und Tumornekrosefaktor und scheinen wichtig für die virale Verbreitung zu sein. Funktionen, die mit den E4-Proteinen assoziiert sind, schließen DNA-Replikation, die Expression der späten Gene und das Abschalten der Wirtszelle mit ein. Die späten Genprodukte schließen die meisten der Virionkapsidproteine mit ein, und diese werden nur exprimiert, nachdem der Großteil der Prozessierung eines einzelnen Primärtranskripts vom Hauptspätpromotor stattgefunden hat. Der Hauptspätpromotor (major late promoter; MLP) weist eine hohe Wirksamkeit während der späten Phase der Infektion auf (Stratford-Perricaudet und Perricaudet, S. 51–61, In: *Human Gene Transfer*, Hrsg., O. Cohen-Haguenauer und M. Boiron Editions John Libbey Exotext, Frankreich, 1991).

[0089] Da nur ein kleiner Teil des viralen Genoms in cis benötigt zu werden scheint, bieten Adenovirusabgeleitete Vektoren ein exzellentes Potenzial für das Ersetzen von großen DNA-Fragmenten, wenn sie in Verbindung mit Zelllinien wie 293-Zellen verwendet werden. Ad5-transformierte humane embryonale Nierenzelllinien (Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59–72, 1977) sind entwickelt worden, um diese essentiellen viralen Proteine in trans zur Verfügung zu stellen.

[0090] Spezielle Vorteile eines Adenovirussystems zur Zufuhr fremder Proteine an eine Zelle schließen ein (i) die Fähigkeit relativ große Teile der viralen DNA durch Fremd-DNA zu ersetzen; (ii) die strukturelle Stabilität der rekombinanten Adenoviren; (iii) die Sicherheit der adenoviralen Verabreichung an den Menschen; und (iv) das Fehlen irgendeiner bekannten Assoziation der adenoviralen Infektion mit Krebs oder anderen bösartigen Erkrankungen; (v) die Fähigkeit hohe Titer des rekombinanten Virus zu erhalten; und (vi) die hohe Infektiosität des Adenovirus.

[0091] Weitere Vorteile von Adenovirusvektoren gegenüber Retroviren schließen die höheren Niveaus an Genexpression mit ein. Darüber hinaus ist die Adenovirusreplikation im Gegensatz zu retroviralen Sequenzen unabhängig von der Wirtsgenreplikation. Weil Adenovirus transformierende Gene im E1-Bereich einfach entfernt werden können und immer noch effiziente Expressionsvektoren zur Verfügung stellen, denkt man, dass das onkogene Risiko von Adenovirusvektoren vernachlässigbar ist (Grunhaus & Horwitz, Seminar in Virology, 3:237–252, 1992).

[0092] Im Allgemeinen beruhen Adenovirusgentransfersysteme auf rekombinanten, gentechnisch hergestelltem Adenovirus, das durch Deletion eines Teils seines Genoms, beispielsweise E1, replikationsinkompetent gemacht wurde und dennoch seine Kompetenz zur Infektion beibehält. Sequenzen, die für relativ große Fremdproteine kodieren, können exprimiert werden, wenn zusätzliche Deletionen im Adenovirusgenom vorgenommen werden. Beispielsweise ist Adenovirus, in dem sowohl die E1- als auch E3-Bereiche entfernt worden sind, in der Lage, Fremd-DNA von bis zu 10 kB zu tragen und kann in hohen Titern in 293-Zellen kultiviert werden (Stratford-Perricaudet und Perricaudet, 1991). Überraschenderweise ist auch von einer persistierenden Expression von Transgenen infolge von adenoviraler Infektion berichtet worden.

Andere vitale Vektoren als Expressionskonstrukte.

[0093] Andere vitale Vektoren können als Expressionskonstrukte in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Vektoren, die von Viren wie Vaccinia-Virus (Ridgeway, Stoneham: Butterworth, S. 467–492, 1988; Baichwal und Sugden, In: Kucherlapati R., (Hrsg.) Gene transfer. New York: Plenum Press, S. 117–148, 1986; Coupar et al., Gene, 68:1–10, 1988), Adenovirus assoziiertes Virus (Ridgeway, 1988; Baichwal und Sugden, 1986; Hermonat und Myzcska, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6466–6470, 1984) und Herpes Viren abgeleitet sind, können eingesetzt werden. Sie bieten mehrere attraktive Merkmale für verschiedene Säugetierzellen (Friedmann et al., Genes Devel. 3:1314, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal und Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., J. Virol. 64:642–650, 1990).

[0094] Mit der kürzlichen Erkenntnis über defekte Hepatitis B-Viren wurde ein neuer Einblick in die Struktur-Funktions-Beziehung von verschiedenen viralen Sequenzen gewonnen. In vitro-Studien zeigten, dass das Virus die Fähigkeit beibehalten konnte, für Helfer-abhängige Verpackung und reverse Transkription, trotz der Deletion von bis zu 80 % seines Genoms (Horwich et al., 1990). Das legte nahe, dass große Teile des Genoms gegen fremdes genetisches Material ausgetauscht werden könnten. Der Hepatotropismus und die Persistenz (Integration) war besonders attraktive Eigenschaften für den auf die Leber gerichteten Gentransfer. Chang et al. (Hepatology, 14:134A, 1991) führten kürzlich das Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Gen in das Genom des Hepatitis B-Virus der Ente anstelle der für Polymerase, Oberfläche, und Vor-Oberfläche kodierenden Sequenzen ein. Es wurde mit Wildtyp-Virus in eine Hepatomvogelzelllinie kotransfiziert. Kulturmedium, das hohe Titer des rekombinanten Virus enthielt, wurde verwendet, um primäre Entenküken-Hepatozyten zu infizieren. Stabile CAT-Genexpression wurde für mindestens 24 Tage nach Transfektion nachgewiesen (Chang et al., 1991).

Nicht-virale Verfahren.

[0095] Mehrere nicht-virale Verfahren für den Transfer von Expressionsvektoren in kultivierte Säugetierzellen werden für die vorliegende Erfindung ebenfalls erwogen. Diese schließen die Kalziumphosphatpräzipitierung (Graham und van der Eb, Virology, 52:456–467, 1973; Chen und Okayama, Mol. Cell Biol., 7:2745–2752, 1987; Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689–695, 1990), DEAE-Dextran (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188–1190, 1985), Elektroporation (Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716–718, 1986; Potter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:7161–7165, 1984), direkte Mikroinjektion (Harland und Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094–1099, 1985), mit DNA beladene Liposomen (Nicolau und Sene, Biochem. Biophys. Acta, 721:185–190, 1982; Fraley et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 76:3348–3352, 1979) und Lipofectamin-DNA-Komplexe, Ultraschallbehandlung der Zellen (Fecheimer et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 76:3348–52, 1979), Genbombardierung unter Verwendung von Hochgeschwindigkeitsmikroprojektilen (Yang et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87:9568–9572, 1990), Polykationen und Rezeptor-vermittelte Transfektion (Wu und Wu, J. Biol. Chem. 262:4429–4432, 1987; Wu und

Wu, Biochemistry, 27:887–892, 1988) mit ein. Einige dieser Techniken können erfolgreich für die in vivo- oder ex vivo-Verwendung angepasst werden.

[0096] In einer Ausführungsform der Erfindung kann das Expressionskonstrukt einfach aus einem nackten rekombinanten Vektor bestehen. Der Transfer des Konstrukt kann mittels jedes der oben erwähnten Verfahren durchgeführt werden, das physisch oder chemisch die Zellmembran permeabilisiert. Beispielsweise haben Dubensky et al., (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:7529–7533, 1984) erfolgreich DNA des Poliomavirus in Form von CaPO₄-Präzipitaten in die Leber und Milz von erwachsenen und neugeborenen Mäusen erfolgreich injiziert, was aktive virale Replikation und akute Infektion beweist. Benvenisty und Neshif (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 83:9551, 1986) bewiesen ebenfalls, dass die direkte intraperitoneale Injektion von mit CaPO₄ präzipitierten Plasmiden in der Expression von transfizierten Genen resultiert. Man stellt sich vor, dass die DNA, die für ein Bcl-2-Konstrukt kodiert, ebenfalls in ähnlicher Art und Weise in vivo übertragen werden kann.

[0097] Der Transfer eines nackten DNA-Expressionvektors in Zellen kann Partikel Bombardierung mit einbeziehen. Dieses Verfahren hängt von der Fähigkeit ab, DNA-umhüllte Mikroprojektile auf eine hohe Geschwindigkeit zu beschleunigen, die es ihnen gestattet, die Zellmembranen zu durchdringen und in die Zellen einzudringen ohne sie abzutöten (Klein et al., Nature, 327:70–73, 1987). Mehrere Vorrichtungen zum Beschleunigen kleiner Partikel sind entwickelt worden. Eine solche Vorrichtung verlässt sich auf eine Hochspannungsentladung, um einen elektrischen Strom zu erzeugen, der wiederum die bewegliche Kraft zur Verfügung stellt (Yang et al., 1990). Die verwendeten Mikroprojektile bestanden aus biologisch inerten Substanzen wie Wolfram- oder Goldkugelchen.

[0098] Ausgewählte Organe einschließlich der Leber, der Haut und Muskelgewebe von Ratten und Mäusen sind in vivo bombardiert worden (Yang et al., 1990; Zelenin et al., FEBS Lett., 280:94–96, 1991). Das kann der chirurgischen Offenlegung des Gewebes oder der Zellen bedürfen, um jegliches dazwischen liegende Gewebe zwischen der Kanone und dem Zielorgan zu eliminieren. Die DNA, die für ein Bcl-2-Konstrukt kodiert, kann via dieses Verfahren zugeführt werden.

D. Pharmazeutische Zusammensetzungen und Verabreichungswege

[0099] Wo die klinische Anwendung von Liposomen, die Antisense-Oligo- oder Polynukleotide oder Expressionsvektoren enthalten, in Angriff genommen wird, wird es notwendig sein, den Liposomenkomplex als pharmazeutische Zusammensetzung zuzubereiten, die geeignet ist für die beabsichtigte Anwendung. Im Allgemeinen wird das Zubereiten einer pharmazeutischen Zusammensetzung mit sich bringen, dass sie im Wesentlichen frei von Pyrogenen, sowie frei von jeglichen anderen Verunreinigungen ist, die schädlich für die Menschen oder Tieren sein könnten. Man wird sich ebenfalls im Allgemeinen wünschen, geeignete Puffer einzusetzen, um den Komplex stabil zu machen und die Aufnahme durch die Zielzellen zu ermöglichen.

[0100] Die flüssigen Zusammensetzungen von Anspruch 11 umfassen eine wirksame Menge des Antisense-Expressionsvektors, der in einem Liposom wie oben diskutiert verkapselft ist, des Weiteren verteilt in einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder wässrigen Medium. Solche Zusammensetzungen werden auch als Inokulum bezeichnet. Die Ausdrücke „pharmazeutisch“ oder „pharmazeutisch verträglich“ beziehen sich auf Zusammensetzungen, die keine nachteiligen, allergischen oder andere unpassenden Reaktionen hervorrufen, wenn sie an ein Tier oder an einen Menschen, wie jeweils anwendbar, verabreicht werden.

[0101] Wie hierin verwendet, schließt „pharmazeutisch verträglicher Träger“ jedes und alle Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Beschichtungen, antibakterielle und antimykotische Agenzien, isotonische und die Absorption verzögernde Agenzien und dergleichen mit ein. Die Verwendung solcher Medien und Agenzien für pharmazeutisch aktive Substanzen ist im Stand der Technik gut bekannt. Insofern jedes konventionelle Medium oder Agens nicht inkompatibel mit dem aktiven Wirkstoff ist, wird seine Verwendung in den therapeutischen Zusammensetzungen erwogen. Ergänzende aktive Inhaltsstoffe können ebenfalls in diese Zusammensetzungen aufgenommen werden.

[0102] Lösungen der therapeutischen Zusammensetzungen können in Wasser zubereitet werden, das geeigneterweise mit einem oberflächenaktiven Stoff gemischt ist, beispielsweise Hydroxypropylzellulose. Dispersions können ebenfalls in Glyzerin, flüssigem Polyethylenglykolen, Gemischen davon und in Ölen zubereitet werden. Unter gewöhnlichen Lagerungsbedingungen und -verwendungen enthalten diese Zubereitungen einen Konservierungsstoff, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

[0103] Die therapeutischen Zusammensetzungen werden zweckmäßigerweise in Form von injizierbaren Zu-

sammensetzungen entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen verabreicht; Feste Formen, die geeignet für die Lösung in einer Flüssigkeit oder die Suspension in einer Flüssigkeit vor der Injektion geeignet sind, können ebenfalls zubereitet werden. Diese Zubereitungen können auch emulgiert werden. Eine typische Zusammensetzung zu solchem Zweck umfasst einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Beispielsweise kann die Zusammensetzung 10 mg, 25 mg, 50 mg oder bis zu ungefähr 100 mg an humanem Serumalbumin pro Milliliter an Phosphat-gepufferter Saline enthalten. Andere pharmazeutisch verträgliche Träger schließen wässrige Lösungen, nicht-toxische Exzipienten, einschließlich Salzen, Konservierungsstoffen, Puffern und dergleichen mit ein.

[0104] Beispiele nicht-wässriger Lösungsmittel sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, Pflanzenöl und injizierbare organische Ester wie Ethyoleat. Wässrige Träger schließen Wasser, alkoholische/wässrige Lösungen, Saline-Lösungen, parenterale Vehikel wie Natriumchlorid, Ringer-Dextrose, etc. mit ein. Intravenöse Vehikel schließen Flüssigkeits- und Nahrungsergänzungsmittel mit ein. Konservierungsstoffe schließen antimikrobielle Agenzien, Antioxidanzien, gelatierende Agenzien und inerte Gase mit ein. Der pH und die exakte Konzentration der verschiedenen Komponenten der pharmazeutischen Zusammensetzung werden gemäß allgemein bekannten Parametern eingestellt.

[0105] Zusätzliche Formulierungen sind für die orale Verabreichung geeignet. Orale Formulierungen schließen solche typische Exzipienten mit Arzneimittelqualität wie beispielsweise Mannitol, Laktose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Zellulose, Magnesiumcarbonat und dergleichen mit ein. Die Zusammensetzungen nehmen die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Formulierungen mit verzögter Freisetzung oder Pudern ein. Wenn der Weg topisch ist, kann die Form eine Creme, eine Wundsalbe (Ointment), eine Salbe (Salve) oder ein Spray sein.

[0106] Die therapeutischen Zusammensetzungen können klassische pharmazeutische Zubereitungen mit einschließen. Die Verabreichung dieser therapeutischen Zusammensetzungen wird über irgendeinen bekannten Weg erfolgen, solange das Zielgewebe über diesen Weg erreichbar ist.

[0107] Das schließt oral, nasal, bukal, rektal, vaginal oder topisch mit ein. Die topische Verabreichung wäre insbesondere zweckmäßig für die Behandlung von Hautkrebsen, um Chemotherapieinduzierte Aloperie zu verhindern oder andere hyperproliferative Erkrankungen der Haut. Alternativ kann die Verabreichung orthotopisch, intradermal subkutan, intramuskulär, intraperitoneal oder intravenös Injektion sein. Solche Zusammensetzungen würden normalerweise als pharmazeutisch verträgliche Zusammensetzungen verabreicht werden, die physiologisch verträgliche Träger, Puffer oder andere Exzipienten einschließen. Für die Behandlung von Krankheitszuständen der Lunge ist der bevorzugte Weg die Aerosolzufuhr an die Lunge. Das Volumen des Aerosols liegt zwischen ungefähr 0,01 ml und 0,5 ml. In ähnlicher Weise ist ein bevorzugtes Verfahren für die Behandlung von Erkrankungen, die mit dem Kolon assoziiert sind, eine Darmspülung. Das Volumen der Darmspülung liegt zwischen ungefähr 1 ml und 100 ml.

[0108] Eine wirksame Menge der therapeutischen Zusammensetzung wird bestimmt ausgehend vom beabsichtigten Ziel. Der Ausdruck „Einheitsdosis“ oder „Dosierung“ bezieht sich auf körperlich getrennte Einheiten, die geeignet sind für die Verwendung an einem Patienten, wobei jede Einheit eine vorbestimmte Quantität der therapeutischen Zusammensetzung enthält, die berechnet worden ist, um die gewünschten Reaktionen wie oben diskutiert im Zusammenhang mit seiner Verabreichung, d.h. dem geeigneten Weg und Behandlungsschema herzustellen. Die zu verabreichende Menge, sowohl gemäß der Anzahl an Behandlungen als auch bezüglich der Einheitsdosis, hängt vom beabsichtigten Schutz ab.

[0109] Die exakten Mengen der therapeutischen Zusammensetzung hängen auch von der Beurteilung des praktischen Arztes ab und sind besonders für jedes Individuum. Faktoren, die die Dosis beeinflussen, schließen den physischen und klinischen Status des Patienten, den Verabreichungsweg, das beabsichtigte Behandlungsziel (Linderung der Symptome gegenüber Heilung) und die Stärke, Stabilität und Toxizität der speziellen therapeutischen Substanz mit ein. Für die sofortige Anwendung wird ins Auge gefasst, dass die Menge an therapeutischem Peptid, die in einer Einheitsdosis eingeschlossen ist, im Bereich von ungefähr 5–30 mg an Polynukleotid liegen wird.

E. Beispiele

BEISPIEL 1: Synthese der Oligonukleotide.

[0110] Nuklease-resistente p-Ethoxy-Oligonukleotide, nicht-ionische Phosphodiesteranaloga, wurden von

Oligo Therapeutics (Willsonville, OR) gekauft. Ein Oligonukleotide, das spezifisch für die Translationsinitiationsstelle humaner Bcl-2 mRNA ist: ^{5'}CAGCGTGCGCCATCCTTC^{3'} (SEQ ID NR:1), wurde als Antisense-Oligonukleotid verwendet. Zwei verschiedene Kontrolloligonukleotide wurden verwendet: 5' ACGGTCCGC-CACTCCTTCCC 3' (SEQ ID NR:2) (durcheinander gebrachte Version des Bcl-2 Antisense-Oligonukleotids) und die zufällig Sequenz 5' CTGAAGGGCTTCTTCC 3' (SEQ ID NR:3).

BEISPIEL 2: Zubereitung der liposomalen Oligonukleotide (L-OS)

[0111] P-Ethoxy-Oligonukleotide, die in destilliertem Wasser aufgelöst waren, wurden in Anwesenheit eines Überschusses an tert-Butanol (≥95 % nach Volumen) zu Phospholipiden hinzugefügt (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Das Gemisch wurde in einem Trockeneis/Acetonbad gefroren, über Nacht lyophilisiert und schließlich mit HEPES-gepufferter Saline (1 mmol/L Hepes und 10 mmol/L NaCl) bei einer Oligoendkonzentration von 0,1 mmol/L hydratisiert. Liposomale Oligonukleotide (L-OS) wurden mit Ultraschall für 12 Minuten in einem Ultraschallwasserbad behandelt. Der durchschnittliche Durchmesser der Partikel betrug 100 nm + 50 nm, gemäß einer Bestimmung in einem NICOMP-Partikelgrößenmesssystem (Santa Barbara, CA).

BEISPIEL 3: Oligonukleotidinhibierung der Proteinexpression

Zelllinien

[0112] Verwendet wurden Johnson-Zellen, eine humane transformierte FL-Zelllinie, die die t(14;18)-Translokation trägt und die Bcl-2-Protein überexprimiert. Ebenfalls verwendet wurden Raji- und Jurkat-Zellen, eine humane Burkitt-Lymphomzelllinie und eine humane akute T-Zell-Leukämie-Zelllinie. Beide Linien exprimieren das Bcl-2-Protein, aber ihnen fehlt die t(14;18)-Translokation. Daudi-Zellen, eine humane Burkitt-Lymphomzelllinie, die nicht das Bcl-2-Protein exprimiert, wurde als eine Negativkontroll-Zelllinie verwendet. Johnson-, Raji- und Jurkat-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (GIBCO, Grand Island, NY, das mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (FBS) ergänzt war, kultiviert. Die Daudi-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, das mit 20 % hitzeinaktiviertem FBS ergänzt war, kultiviert.

Zufuhr der L-OS an die Zellen

[0113] Zehntausend Zellen/Loch wurden in einer 96-Lochplatte in 0,1 mL des entsprechenden Mediums ausplattiert. Die Zellen wurden mit L-OS in einer Endkonzentration von 2 bis 8 µmol/L bei 37°C in einem 5 % CO₂-Inkubator inkubiert. Jede Untersuchung wurde in 3-facher Ausführung durchgeführt und mindestens 3-Mal wiederholt.

Assay zur Lebendigkeit der Zellen

[0114] Die Lebendigkeit der neoplastischen Zellen wurde mittels des AlamarBlue-Farbstoffs gemessen (Alamar, Sacramento, CA). Nach 5-tägiger Inkubation mit L-OS wurden 40 µL der Zellen/Loch aliquotiert und zu 140 µL an frischem Medium zugefügt. Zwanzig µL an AlamarBlue-Farbstoff wurden zu jedem Loch zugesetzt. Nach Inkubation für 12 Stunden bei 37°C wurden die Platten direkt auf einem Mikroplattenlesegerät bei 570 und 595 nm ausgelesen (Molecular Devices, CA). Der Absorptionsunterschied zwischen 570 und 595 nm wurde genommen als der Gesamtabsorptionswert der Zellen. Alle Experimente wurden mittels t-Tests analysiert, indem die Lebensfähigkeit der Zellen, die mit den L-OS behandelt wurden, mit jenen der unbehandelten Kontrollen verglichen wurden.

Western-BLOTS auf Bcl-2 und Bax-Protein

[0115] Einhunderttausend Zellen/Loch wurden in einer 6-Lochplatte in 3 mL des entsprechenden Mediums ausgesät, mit 2, 3 und 4 µmol/L an L-OS behandelt und bei 37°C inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden ebenfalls in Kultur gehalten. Proben wurden am Tag 3 nach Zusatz der L-OS entfernt und in 100 µL an Lysepuffer (1 % Triton, 150 mmol/L NaCl und 25 mmol/L Tris pH 7,4) bei 0°C für 30 Minuten lysiert. Nach Zentrifugation bei 12000 × g für 10 Minuten wurden die Überstände rückgewonnen und auf den Gesamtproteininhalt normalisiert (5 µg/Spur an Johnson-Zelllysat und 20 µg/Spur an Jurkat-Zelllysat für die Bcl-2-Analyse, und 25 µg/Spur an Johnson-Zellen für die Bax-Analyse). Die Lysate wurden mit dem Probenpuffer, der 1 % an Natriumdodecylsulfat (SDS) und 1 % an 2-β-Mercaptoethanol enthielt, gemischt und für 5 Minuten gekocht. Die SDS-PAGE wurde auf 10 %-igen Polyacrylamidgelen laufen gelassen, elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen transferiert und in 10 % fett-freier Trockenmilch geblockt. Die Filter wurden in zwei Teile geschnitten: Der untere Abschnitt wurde mit dem gegen menschliches Bcl-2 gerichteten monoklonalen Antikörper 6C8 aus dem Hams-

ter oder mit dem gegen humanes Bax gerichteten polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen (Hockenberry et al., *Nature*, 348:334, 1990) inkubiert, und der obere Abschnitt wurde mit dem gegen Aktin gerichteten monoklonalen Antikörper der Maus (Amersham) bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen und Inkubation mit Peroxidase-markiertem Zweitantikörper gegen Hamster (Kirkegaard & Perry Laboratories), gegen Kaninchen (Santa Cruz) oder gegen Maus (Amersham) wurden die Blot mit Hilfe des verstärkten Chemilumineszenzsystems (ECL, Amersham) entwickelt. Um die Inhibition des Bcl-2-Proteins und das Verhältnis der Bcl-2-/Bax-Proteine zueinander abzuschätzen, wurden Abtastungsdichtemessungen der Western-Blots auf einem Gelford Response Gel Scanner (CIBA Corning, Medfield, MA) durchgeführt. Die Flächenintegration der Absorptionsspitzen bei 500 nm wurde verwendet, um das Verhältnis von Bcl-2:Aktin und Bcl-2:Bax-Proteinen zu bestimmen.

Apoptoseanalyse

[0116] Um qualitativ die internukleosomale DNA-Spaltung, die mit Apoptose assoziiert ist, zu bestimmen, wurde eine DNA-Fragmentierungsanalyse mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Duke et al., In: Coligan et al. (Hrsg.) *Current protocols in immunology*, Band 1., New York: John Wiley & sons, S. 3.17.1, 1991). Kurz gesagt, 1×10^6 Johnson-Zellen wurden in 10 mL an Medium in einer 75 cm^2 -Gewebekulturflasche kultiviert, mit 4 $\mu\text{mol/L}$ an L-OS behandelt und bei 37°C inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden ebenfalls in Kultur gehalten. Die Proben wurden am Tag 3 nach der Behandlung entfernt, mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation für 10 Minuten bei $200 \times g$ pelletiert. Die Pellets wurden in 0,5 mL an Lysebuffer (10 mmol/L Tris pH 7,4, 1 mmol/L EDTA pH 8,0 und 0,2 % Triton X-100) lysiert und die fragmentierte DNA wurde von intaktem Chromatin durch Mikrozentrifugieren für 10 Minuten bei $13000 \times g$ abgetrennt. Die DNA der Überstände wurde in 0,7 mL eiskalten Isopropanol über Nacht bei -20°C präzipitiert, in 30 μL an TE-Puffer (10 mmol/L Tris pH 7,4, 1 mmol/L EDTA pH 8,0) resuspendiert und in 10 μL an RNase (10 $\mu\text{g/mL}$ -Lösung) bei 60°C für 1 Stunde inkubiert. 20 μL an Probe pro Loch wurden elektrophoretisch auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung visualisiert.

[0117] Um quantitativ das Apoptoseausmaß zu bestimmen wurde der fluoreszierende DNA-Bindefarbstoff Acridinorange verwendet (Duke et al., 1991). Kurz gesagt, L-OS wurden in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ zu 1×10^5 Zellen/Loch zugefügt, ausplattiert in einer 24-Lochplatte in 1 mL an Medium. Nach 3 Tagen der Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zu 1×10^6 Zellen/mL resuspendiert. 25 μL der Zellsuspension wurden mit 1 μL an Acridinorange Farbstoff (100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) gemischt und in einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen (apoptotischer Index) wurde unter Verwendung eines Hämozytometers erhalten. Apoptotischer Index = (Gesamtzahl an Zellen mit apoptotischen Kernen/Gesamtzahl an gezählten Zellen) \times 100 %.

Auswirkung von L-bcl-2 Antisense-Oligonukleotiden („L-bcl-2“) auf das Wachstum von Lymphomzellen

[0118] 5 Tage nach dem Zusatz von L-bcl-2 zu den Zellen wurde die Lebendigkeit der Tumorzellen bewertet. Das Zellwachstum wurde in Konzentrations-abhängiger Weise in Johnson-Zellen inhibiert, die die t(14;18)-Translokation tragen und sehr hohe Niveaus an Bcl-2 exprimieren. Eine Konzentration von 6 $\mu\text{mol/L}$ L-bcl-2 resultierte im kompletten Verlust der Lebendigkeit der Johnson-Zellen innerhalb von 5 Tagen ([Fig. 1](#)). Eine ähnliche Dosis abhängige Verringerung der Zellebendigkeit konnte in 3 separaten Untersuchungen gesehen werden. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Lebendigkeit von Jurkat-, Raji- und Daudi-Zellen nach der Behandlung mit 6 $\mu\text{mol/L}$ L-bcl-2 nur um 23 %, 0 % bzw. 35 % ([Fig. 1](#)).

Auswirkung von liposomalen Kontrolloligonukleotiden (L-Kontroll-Oligos) auf das Wachstum von Lymphomzellen

[0119] Zwei Kontrolloligonukleotide wurden verwendet, um die Spezifität der beobachteten Inhibition zu bestimmen. Wenn L-Kontrolloligos oder leere Liposomen zu Johnson-Zellen zugesetzt wurden, wurde keine Zellwachstumsinhibition beobachtet. Jurkat-, Raji- und Daudi-Zellen wurden ebenfalls mit L-Kontrolloligos und leeren Liposomen behandelt. Eine nicht-spezifische Toxizität konnte beobachtet werden, wenn mehr als 6 $\mu\text{mol/L}$ an L-OS verwendet wurden, aber nicht mit leeren Liposomen ([Fig. 2](#)).

Selektive Inhibition des Bcl-2-Proteins durch L-bcl-2-Antisense-Oligonukleotide

[0120] Um zu bestimmen, ob der zytotoxische Effekt der L-bcl-2 in Johnson-Zellen durch eine Verringerung an Bcl-2-Protein verursacht wurde, wurde ebenfalls die Bcl-2-Proteinexpression in diesen Zellen nach der Behandlung mit L-bcl-2 sowie die Auswirkungen von L-bcl-2 auf die anderen Zelllinien, die Bcl-2-Protein überex-

primieren ([Fig. 3](#)), ebenfalls bestimmt.

[0121] Wenn Johnson-Zellen mit 2, 3 und 4 mmol/L an L-bcl-2 behandelt wurden, wurden die Verhältnisse an Bcl-2-/Aktiv-Protein um 28, 57 bzw. 64 % inhibiert. Die Bcl-2-Proteinexpression wurde nicht in Zellen inhibiert, die mit denselben Dosen an L-Kontrolloligos behandelt wurden.

[0122] Wenn Jurkat-Zellen mit 3 und 4 mmol/L an L-bcl-2 behandelt wurden, wurden die Verhältnisse von Bcl-2-/Aktiv-Protein um 44 % bzw. 50 % inhibiert. Das Bcl-2-Protein wurde nicht signifikant inhibiert, wenn dieselben Dosen an L-Kontrolloligos verwendet wurden ([Fig. 4](#)).

[0123] Die Verhältnisse an Bcl-2-/Bax-Protein in Johnson- und Jurkat-Zellen vor und nach Behandlung mit L-bcl-2 und L-Kontrolloligos wurde ebenfalls bestimmt. Johnson-, Raji- und Daudi-Zellen exprimierten Bax-Protein, aber Jurkat-Zellen taten dies nicht ([Fig. 5](#)). Wenn Johnson-Zellen mit 2, 3 und 4 mmol/L an L-bcl-2 behandelt wurden, wurde das Verhältnis an Bax/Aktin nicht verändert, aber das Verhältnis an Bcl-2/Bax verringerte sich um 10 %, 40 % bzw. 50 %. Diese Proteinverhältnisse blieben nach Behandlung mit denselben Dosen an L-Kontroll-Oligos ([Fig. 6](#)) unverändert.

Inhibition des Bcl-2-Proteins führt zu Apoptose in den FL-Zellen

[0124] Es wurde ebenfalls untersucht, ob die inhibitorischen Auswirkungen auf das Wachstum, die für Johnson-Zellen beobachtet werden, in Verbindung mit der Induktion von Apoptose stehen. Nach 3 Tagen der Inkubation mit L-bcl-2 wurde das typische internukleosomale DNA-Abbaumuster beobachtet, wohingegen Zellen, die mit L-Kontroll-Oligos inkubiert wurden, nicht das internukleosomale DNA-Muster zeigten ([Fig. 7](#)). Im Anschluss daran wurde die Quantität an Apoptose mittels Acridinorange bewertet. Nach 3 Tagen der Exposition gegenüber 4 und 5 µmol/L an L-bcl-2 waren apoptotische Zellen sichtbar. Der apoptotische Index von unbehandelten Johnson-Zellen betrug 3 %, während der von Johnson-Zellen, die mit 4 und 5 µmol/L an L-bcl-2 behandelt wurden, 43 % bzw. 61 % betrug. Ein signifikanter Zuwachs des apoptotischen Index wurde in Zellen, die mit liposomalen Kontroll-Oligonukleotiden oder leeren Liposomen behandelt worden waren, nicht beobachtet ([Fig. 8](#)).

L-bcl-2 reguliert selektiv die Expression von Bcl-2-Proteinen und Zellwachstum in einer Dosisabhängigen Weise herunter

[0125] Die Inhibition des Zellwachstums wurde nur in der FL-Zelllinie beobachtet, die die t(14;18)-Translokation trägt, während eine Zellwachstumsinhibition nicht für Zelllinien beobachtet wurde, denen die Bcl-2-Expression (Daudi-Zellen) oder die t(14;18)-Translokation (Raji- und Jurkat-Zellen) fehlt. Es gab keine unspezifische Toxizität in Johnson-Zellen, die gegenüber zwei verschiedenen Kontroll-Oligonukleotiden exponiert wurden. Die inhibitorischen Auswirkungen auf das Wachstum konnten beginnend bei einer Konzentration von 3 µmol/L an L-bcl-2 beobachtet werden und die inhibitorischen Auswirkungen waren am größten bei einer Konzentration von 6 µmol/L. Einer der Mechanismen, über die L-bcl-2 die Wachstumsinhibition auf Johnson-Zellen ausübt, könnte durch Induktion von Apoptose sein, da behandelte Zellen ein typisches internukleosomales DNA-Abbaumuster und einen erhöhten apoptotischen Index, wie mittels Acridinorange gemessen, zeigten. Am Tag 3 befanden sich 61 % der Johnson-Zellen, die mit 5 µmol/L an L-bcl-2 behandelt worden waren, in der Apoptose im Vergleich zu 15 % an Zellen, die mit L-Kontroll-Oligos behandelt wurden. Apoptose wurde in den anderen Zelltypen nicht beobachtet.

[0126] Daher führt die Inhibition des Bcl-2-Proteins zur Inhibition des Zellwachstums in Zellen, die, um die Lebensfähigkeit zu beizubehalten, von der Anwesenheit des Bcl-Proteins abhängig sind. Gentransfer-Experimente haben den Beweis erbracht, dass Bcl-2 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Überlebens von lymphoiden Zellen *in vitro* zur Verfügung stellt, obwohl andere autokrine Wachstumsfaktoren ebenfalls involviert sein können (Vaux et al., *Nature* (London), 355:440, 1988; Reed et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:3660, 1990b; Blagosklonny und Neckers, *Eur. Cytokine Network*, 6:21, 1995). Unter Verwendung von Phosphorotionat-Antisense-Oligonukleotiden beobachteten Cotter und Mitarbeiter eine Wachstumsinhibition in der DoHH2-Zelllinie, die die t(14;18)-Translokation hat und Bcl-2-Protein überexprimiert, aber nicht in der FC11-Zelllinie, die Bcl-2-Protein überexprimiert ohne die t(14;18)-Translokation (Cotter et al., 1994). Zellen, die Bcl-2 überexprimieren und denen die t(14;18)-Translokation fehlt, könnten evtl. eines apoptotischen Stimulus bedürfen, beispielsweise Wachstumsfaktorentzug oder Behandlung mit chemotherapeutischen Wirkstoffen, um in die Apoptose und den Wachstumsarrest getrieben zu werden (Reed, 1995). Antisense-Oligonukleotide können verwendet werden, um die chemotherapeutische Resistenz jener Zellen umzukehren, die ohne die t(14;18)-Translokation ebenfalls hohe Konzentrationen an Bcl-2 überexprimieren (Kitada et al., *Antisense Res.*

Dev., 4:71, 1994). Es versteht sich, dass solch eine Kombination von L-Bcl-2 der vorliegenden Offenbarung mit einem apoptotischen Stiumulus vom Geist und Rahmen der anhängigen Patentansprüche umfasst wäre.

[0127] Bax, ein Förderer des apoptotischen Zelltods kann ein normaler Partner sein, der an der Heterodimerisierung und Regulierung von Funktionen anderer Mitglieder der Bcl-2-Familie beteiligt ist (Sedlak et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 92:7834, 1995). Es wurde vorgeschlagen, dass das Gleichgewicht in der Bildung der Bcl-2:Bax-Heterodimere und von Bax:Bax-Homodimeren von zentraler Bedeutung bei der molekularen Regulierung der Apoptose zu sein scheint (Yin et al., 1994). Darüber hinaus korrelierte in einer kürzlich erschienenen Studie das Verhältnis von Bcl-2:Bax mit dem Zelltod in IL-3-abhängigen FL5.12-Zellen. Wenn ungefähr die Hälfte oder mehr des Bax mit Bcl-2 heterodimerisierte, wurde die Apoptose inhibiert (Yang et al., 1995). Der apoptotische Tod, der in Johnson-Zellen nach Inkubation mit L-bcl-2 beobachtet wurde, könnte aufgrund der Verringerung des Bcl-2:Bax-Verhältnis und der Bildung von mehr Bax:Bax-Homodimeren auftreten.

[0128] Eine weitere Erklärung ist, dass andere Onkogene und Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise C-MYC und p53, am Überleben der anderen Zelllinien beteiligt sind. C-MYC wird beispielsweise üblicherweise in Burkitt-Lymphomen und einigen transformierten FL exprimiert (McDonnell und Korsmeyer, 1991). Mutationen des p53-Gens, ein Suppressorogen, das an zahlreichen menschlichen Tumoren beteiligt ist, kann auch in diesen Zelllinien beteiligt sein; das p53-Gen kodiert für ein DNA-Bindeprotein, das wenigstens zum Teil als Transkriptionsfaktor wirkt, um Zellzyklusarrest und Apoptose durch Hochregulierung von Bax zu induzieren (Vogelstein und Kinzler, Cell, 70:523, 1992; Miyashita et al., Oncogene, 9:1799, 1994; Miyashita und Reed, Cell, 80:293, 1995). Wahrscheinlich reicht die Inhibition der Bcl-2-Expression alleine nicht aus, um Apoptose und Wachstumsinhibition in anderen Zellen als jenen Zellen mit einem hohen Expressionsniveau an Bcl-2, beispielsweise jene mit einer t(14;18)-Translokation, zu induzieren. Jedoch bildet, wie hierin beschrieben, eine Verringerung im Verhältnis von Bcl-2/Bax durch L-bcl-2 die Grundlage für eine molekulare Herangehensweise für die Therapie follikulärer Lymphome als auch anderer Bcl-2-Erkrankungen in Zellen, in denen Bax exprimiert wird.

BEISPIEL 4: Bcl-2-Regulierung des Kernimports von p53

[0129] Die humane Prostatakarzinomzelllinie LNCaP, die ein Wildtyp p53-Gen besitzt (Carroll et al., Prostate, 23, 123–134, 1993), wurde ausgewählt, um die Inhibition des p53-abhängigen programmierten Zelltods durch bcl-2 zu untersuchen. LNCaP Prostatakarzinomzelllinien, die stabil bcl-2 exprimieren, wurden erzeugt und mittels Western-Blot bestätigt. Die Expression von bcl-2 bewirkte eine deutliche Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion infolge von γ -Bestrahlung im Vergleich zu Kontrollklonen, was mittels morphologischer und durchflusszytometrischer Analyse bewertet wurde ([Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#)). In LNCaP-Zellen, die bcl-2 exprimierten, wurde keine signifikante Induktion des Zelltods bis zu 48 Stunden nach der Bestrahlung beobachtet. Darüber hinaus gab es keinen Unterschied in der Zellzyklusverteilung zwischen LNCaP und LNCaP-bcl-2-Zellen vor der Bestrahlung und keinen Beweis, dass die Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus infolge von Bestrahlung verändert wurde. Ungefähr 60 % der nicht-bestrahlten Kontrollzellen befinden sich in G₀/G₁, 18 % in der S-Phase und 22 % in G₂/M im Vergleich zu 59 % an unbestrahlten LNCaP-bcl-2-Zellen in G₀/G₁, 21 % in der S-Phase und 20 % in der G₂/M-Phase. Diese Werte unterschieden sich nicht wesentlich von jenen, die nach 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 8 Stunden nach Bestrahlung beobachtet wurden.

[0130] Die Apoptose, die als Reaktion auf genotoxischem Schaden induziert wird, wird als p53 abhängig erachtet. In LNCaP-Zellen wurde zelluläres p53-Gesamtprotein in ungefähr äquivalenten Konzentrationen zu bcl-2-exprimierenden Klonen und Kontrolltransfektanten innerhalb von 4 Stunden nach γ -Bestrahlung mit 20 Gy induziert ([Fig. 10A](#)). Eine Western-Blot-Analyse, die isolierte Kerne verwendete, offenbarte, dass die Konzentrationen an p53-Protein im Kern innerhalb von 2 Stunden nach der Bestrahlung sich in Kontroll-LNCaP erhöhten, aber nicht in bcl-2-exprimierenden LNCaP-Zellen ([Fig. 10A](#)). Diese Beobachtung legt nahe, dass der Kernimport von p53 infolge von DNA-Schaden im Kontext von hohen Konzentrationen des bcl-2-Proteins gestört sein könnte.

[0131] Abtastungskonfokalasermikroskopie wurde verwendet, um den Kernimport von p53 infolge von Bestrahlung weiter zu charakterisieren. Die Inhibition des Kernimports von p53 in den bcl-2-Zellen wurde mittels konfokaler Mikroskopie unter Verwendung von Antikörpern, die das p53-Protein erkennen, bestätigt ([Fig. 10B](#)). Daher wurde mittels zweier unabhängiger Techniken gezeigt, dass der Kernimport von p53 in bcl-2-exprimierenden Zellen nach der Zelltodinduktion mittels ionisierender Strahlung erheblich inhibiert ist.

[0132] Um zu bestimmen, ob die transaktivierende Fähigkeit von p53 im Kontext des bcl-2-Proteins beeinflusst wurde, wurden NIH3T3-Zellen transient mit einem mdm-2-Promotor-Luziferase-Reportkonstrukt transfi-

ziert, das funktionale p53-Bindestellen besitzt. Die Luziferaseaktivität nahm ungefähr um das 8-fache nach Ko-Transfektion mit einem Wildtyp, aber nicht mutierten, p53-Expressionsplasmid zu ([Fig. 10C](#)). Die Ko-Transfektion von bcl-2 und Wildtyp-p53-Expressionsplasmiden resultierte in einer 2-4-fachen Abnahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zu wildtypischem p53 alleine ($p \leq 0,02$).

[0133] Zusätzliche Studien wurden unter Verwendung der RKO-Kolonkarzinomzelllinie durchgeführt, um einzuschätzen, ob die Fähigkeit von bcl-2, den Kernimport von wildtypischem p53 zu inhibieren, spezifisch für die LNCaP-Prostatakrebszelllinie ist. RKO-Zellen besitzen ein wildtypisches p53-Gen (Nagashima et al., Cancer Res., 55, 1842-1846, 1995) und exprimieren ebenfalls bcl-2-Protein. Um die Expression von bcl-2 in RKO-Zellen herunterzuregulieren, wurden bcl-2-spezifische Antisense-Oligonukleotide mittels Liposomen zugeführt. Die Bcl-2-Proteinniveaus waren um das 3-fache reduziert im Vergleich zu RKO-Zellen, die mit leeren Liposomen oder Liposomen, die Kontroll-Oligonukleotide enthielten, behandelt wurden ([Fig. 11A](#)). Konfokale Mikroskopie wurde verwendet, um das p53-Protein von RKO-Zellen, die mit Antisense-bcl-2-Oligonukleotid- oder Kontroll-Oligonukleotid enthaltenden Liposomen behandelt worden waren, 4 Stunden nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy abzulichten. RKO-Zellen, die mit Kontroll-Oligonukleotiden behandelt worden waren, zeigten, dass der Großteil des p53-Proteins sich nach wie vor im Zytosol befand ([Fig. 11B](#)). Im Gegensatz dazu wiesen RKO-Zellen, in denen bcl-2 mittels Antisense-Oligonukleotiden herunterreguliert worden war, hohe Niveaus an p53-Protein innerhalb des Kerns auf und wiesen eine deutliche ($p \leq 0,005$) Zelltodinduktion im Vergleich zu RKO-Zellen auf, die mit Kontrolloligonukleotiden behandelt worden waren ([Fig. 11C](#)). Diese Befunde legen nahe, dass die Fähigkeit von bcl-2, den Import von wildtypischem p53-Protein in Reaktion auf DNA-Schaden zu modulieren, nicht Zelltypspezifisch ist.

Bestrahlung und Kalzein-AM-Färbung

[0134] Die Zellen wurden zunächst mit Kalzein-AM (Molecular Probes, Eugene, OR) zu 1 mg/ml für 20 Minuten in RPMI, das 10 % FBS enthielt, beladen. Die Zellen wurden mit 20 Gy unter Verwendung einer ^{137}Cs γ -Quelle bestrahlt und die von Kalzein erzeugte Fluoreszenz wurde unter Verwendung von Epifluoreszenzoptik und eines FITC-Filters (530 nm Emission) visualisiert. Die Strahlungsdosis von 20 Gy wurde als die minimale Dosis ausgewählt, die benötigt wird, um maximale Apoptoseniveaus in LNCaP-Zellen zu induzieren.

Durchflusszytometrieanalyse

[0135] Die Durchflusszytometrieanalyse des Zellzyklus und der Zelltodinduktion in LNCaP-Zellen. Einzelzell-suspensionen wurden in 70 % Ethanol fixiert und mit 50 mg/ml Propidiumiodid (PI) und 20 mg/ml RNase für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Durchflussanalyse wurde mit einem EPICS Profile I bei 488 nm-Anregung durchgeführt und für die PI-Fluoreszenz unter Verwendung von Elite Software 4,0 (Coulter Corp., Miami, FL) und der Multizyklus-DNA-Analyseprogrammsoftware (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA) bearbeitet.

Transfektionen und Luziferaseassays

[0136] LNCaP-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid des Milzfokus-bildenden Virus mit oder ohne (Kontrolle) dem bcl-2 cDNA-Einsatzstück wie zuvor beschrieben (Marin, et al., Oncogene, 12, 2259-66, 1996; Tu et al., Cancer Lett., 93, 147-155, 1995) transfiziert. Die Effektorplasmide LTRXA und LTRKH Expressionsplasmide sind bereits zuvor beschrieben worden (Defile et al., 1993) und stellen wildtypisches bzw. mutiertes p53 dar. Das Reporterplasmid P2mdm2-Luc wurde durch Klonieren eines 1 Kb Xhol-Fragments, das auf p53 reagierende Element des mdm2-Gens der Maus enthielt, in die Smal-Stelle des pA3-Luziferaseplasmids hergestellt. NIH3T3-Zellen wurden in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ -Zellen pro Platte 24 Stunden vor der Transfektion ausplattiert. Das wildtypische oder mutierte p53-Effektorplasmid (10 μg), das Reporterplasmid P2mdm2-Luc (4 μg) und das β -Galaktosidase (β -Gal)-Expressionsplasmid (3 μg) wurden mit oder ohne bcl-2-Vektor (20 μg) gemäß dem Kalziumphosphatverfahren ko-transfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde durch Hinzufügen von p-GEM-Plasmid bis zu 37 μg an Gesamt-DNA für alle Transfektionen normalisiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Extrakte wurden gemacht und auf Luziferaseaktivität untersucht.

Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie

[0137] LNCaP-Kontrolle- und LNCaP-bcl-2-Zellen wurden auf mit Laminin beschichteten Deckglässchen gezüchtet und mit 20 Gy bestrahlt. Nach 4 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, dann in 4 % Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert und zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 10 %-igen Ziegenserum in PBS blockiert, mit p53-Antikörper (AB-2, Calbiochem) in 10 %-igem Ziegenserum (1:75) inkubiert,

zweimal gewaschen, und mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Sekundärantikörper in 10 % Ziegenserum (1:200) inkubiert. Die Bildaufnahmen wurden unter Verwendung eines abtastenden konfokalen Lasermikroskops von Zeiss angefertigt.

[0138] Die RKO-Zellen wurden auf Laminin beschichteten Deckglässchen kultiviert und mit liposomalen Oligonukleotidformulierungen in einer Endkonzentration von 10 μ M bei 37°C in einem 5 % CO₂-Inkubator für 3 Tage inkubiert. 4 Stunden nach der Bestrahlung mit 10 Gy wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, dann mit 4 % Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert und zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 10 % Ziegenserum in PBS blockiert, mit p53-Antikörper (AB-2, Calbiochem) in 10 %-igem Ziegenserum (1:75) inkubiert, zweimal gewaschen und mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markiertem Sekundärantikörper in 10 %-igem Ziegenserum (1:200) inkubiert. Die konfokale Mikroskopie wurde unter Verwendung eines konfokalen Abtastungslasermikroskops von Zeiss durchgeführt.

Antisense & DNA-Verfahren

[0139] P-Ethoxy-Oligonukleotide, ein nicht-ionisches und Nuklease-resistentes Phosphodiester-Analogon, wurden von Oligo Therapeutics (Willsonville, OR) gekauft. Ein Oligonukleotid, das spezifisch für die Translationsinitiationsstelle der humanen bcl-2 mRNA ist: 5'CAGCGTGC GCCATCCTTC3' (SEQ ID NR:1) wurde als Antisense-Oligonukleotid verwendet. Das Kontroll-Oligonukleotid, das verwendet wurde, war eine durcheinander gebrachte Version des Bcl-2-Antisense-Oligonukleotids 5'ACGGTCCGCCACTCCTTCCC 3' (SEQ ID NR:2). P-Ethoxy-Oligonukleotide, in DMSO aufgelöst, wurden zu Phospholipiden (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) in Anwesenheit eines Überschusses von tert.-Butanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde in einem Wasserbad aus Trockeneis/Aceton gefroren, über Nacht lyophilisiert und mit 0,9 %-iger Saline in einer Oligonukleotidendkonzentration von 0,1 mmol/L hydratisiert. Leere Liposomen wurden identisch wie oben zubereitet, mit der Ausnahme, dass die Oligonukleotide nicht bei der Zubereitung eingeschlossen wurden. 0,25 \times 105-Zellen/mL wurden in 24-Lochplatten in 0,5 mL des entsprechenden Mediums ausgesät. Die Zellen wurden mit Antisense-, Kontroll-Oligonukleotiden und leeren Liposomen in einer Endkonzentration von 10 μ M bei 37°C in einem 5 % CO₂-Inkubator für 3 Tage inkubiert. Western-BLOTS der Gesamtzellextrakte (40 μ g) der Kontroll- und bcl-2-transfizierten Klone wurden mittels Immunblots auf bcl-2-Protein unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA) analysiert.

Analyse der Proteinexpression in Zell- und Kernextrakten

[0140] Western-Blot-Analyse der Induktion des p53-Proteins und Kernimport infolge von γ -Bestrahlung. Subkonfluente Kulturen von Kontroll-LNCaP- und LNCaP-bcl-2-Zellen wurden mit 20 Gy bestrahlt. Kernextrakte wurden durch Abschaben von Zelleinzelschichten in hypotonischem Lysepuffer (100 mM Hepes, pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM β -Mercaptoethanol und 5 ng/ml Leupeptin) zubereitet. Nach 10 Minuten auf Eis wurde NP-40 zu 0,625 % hinzugefügt und das rohe Kernpellet durch Zentrifugation bei 2000 \times g für 5 Minuten rückgewonnen. Die Kernpellets wurden in SDS-PAGE-Probenladepuffer lysiert. Kernextrakte und Gesamtzellextrakte wurden 2 und 4 h nach Bestrahlung zubereitet. Äquivalente Mengen an Lysaten wurden mittels Immunblots mit p53-Antikörper (Santa Cruz) analysiert.

[0141] Die Kernextrakte wurden zubereitet durch Abschaben von Zelleinzelschichten in hypotonischem Lysepuffer (100 mM Hepes, pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM β -Mercaptoethanol und 5 ng/ml Leupeptin) zubereitet. Nach 10 Minuten auf Eis wurde NP-40 zu 0,625 hinzugefügt und das rohe Kernpellet durch Zentrifugation bei 2000 \times g für 5 Minuten rückgewonnen. Die Kernpellets wurden in SDS-PAGE-Probenladepuffer lysiert.

BEISPIEL 5: In vivo-Test

[0142] In einer ursprünglichen Runde von in vivo-Versuchen wurden 30 Nackt (nu/nu)-Mäuse im Alter zwischen 5–6 Wochen jeweils intraperitoneal 3 Millionen Johnson-Zellen, folliculäre Lymphomzellen, die die t(14;18)-Translokation tragen, injiziert. Drei Gruppen à 10 Mäuse wurden verwendet: Unbehandelte Mäuse (Gruppe I), mit liposomalem p53-Ethoxy-bcl-2-Antisense behandelte Mäuse (Gruppe II und mit liposomalem Bcl-2-Kontroll behandelte Mäuse (Gruppe III). Ab einer Woche nach der Tumorimplantation wurde den Mäusen der Gruppen II und III alle 14 Tage („biweekly“) eine intravenöse Injektion von liposomalen Bcl-2-Antisense-Oligos oder liposomalen Bcl-2-Kontroll-Oligos verabreicht. Die Oligo-Dosis betrug 15 mg/kg Körpergewicht der Maus.

[0143] Für einige Mäuse wurde beobachtet, dass sie den Sterbestatus (der definiert ist als eine Tumogröße,

die 1,5 cm³ übersteigt) am Tag 50 erreichten. Am Tag 70 nach der Implantation (63 Tage der Behandlung) hatten 6 Mäuse (60 %) der Gruppen I und III den Sterbestatus erreicht und wurden getötet, während nur 2 Mäuse (20 %) der Gruppe II den Sterbestatus erreicht hatten und getötet wurden. Eine weitere Maus erreicht den Sterbestatus am Tag 77 (70 Behandlungstage). Die Studie wurde am Tag 78 beendet. Gewebe von der Leber, der Niere, der Milz, dem Herz, den Lungen, dem Magen, dem Darm und Knochenmark wurden für histopathologische Studien gesammelt. Daher geben die vorläufigen in vivo-Ergebnisse an, dass die Antisense-Bcl-2 (-Oligos), die in neutralen Liposomen zugeführt worden waren, wirksam beim Inhibieren folliculärer Lymphome in Mäusen sind.

BEISPIEL 6: Klinische Versuche

[0144] Dieses Beispiel beschäftigt sich mit der Entwicklung von humanen Behandlungsprotokollen unter Verwendung der Lipid-assozierten Oligo- und Polynukleotidzusammensetzungen. Diese Lipidformulierungen werden von Nutzen für die klinische Behandlung verschiedener bcl-2-überexprimierender Krebsarten und Erkrankungen sein, in denen transformierte oder krebsartige Zellen eine Rolle spielen. Solch eine Behandlung wird ein besonders nützliches Handwerkszeug bei der Anti-Tumortherapie, beispielsweise bei der Behandlung von Patienten mit FL, sein. Diese Behandlung wird ebenfalls nützlich sein beim Behandeln anderer Zustände, die durch bcl-2-Überexpression vermittelt werden und resistent gegenüber konventionellen Kuren und Behandlungen sind, beispielsweise hämatologische bösartige Erkrankungen, sowohl Leukämien als auch Lymphome, einschließlich folliculären und nicht-follikulären Lymphomen, chronische Lymphozytenleukämie, und Plasmazelldyskrasien, feste Tumore wie jene, die mit Brust-, Prostata- und Kolonkrebs assoziiert sind und Immunstörungen.

[0145] Die verschiedenen Elemente des Durchführens von klinischen Versuchen einschließlich der Behandlung von Patienten und deren Überwachung wird dem Fachmann im Lichte der vorliegenden Offenbarung bekannt sein. Die folgende Information wird als allgemeiner Leitfaden zur Verwendung bei der Etablierung Lipid-assoziierter Oligo- und Polynukleotidzusammensetzungen alleine oder in Kombinationen mit Anti-Krebswirkstoffen in klinischen Versuchen dargelegt.

[0146] Kandidaten für die klinischen Versuche der ersten Phase werden Patienten sein, bei denen alle konventionellen Therapien versagt haben. Liposomale Bcl-2-Antisense-Oligos werden an sie intravenös auf einer vorläufig wöchentlichen Basis verabreicht. Um den Erkrankungsverlauf zu überwachen und die Anti-Tumoreaktionen zu bewerten, wird erwogen, dass die Patienten auf geeignete Tumormarker jeden Monat untersucht werden sollten. Um die Effektivität des Wirkstoffs zu bewerten, werden die folgenden Parameter überwacht: Tumogröße und Knochenmarksinfiltration der Krebszellen. Tests, die verwendet werden, um den Fortschritt der Patienten und die Wirksamkeit der Behandlungen zu überwachen, schließen ein: physische Untersuchung, Röntgenstrahlung, Blutuntersuchungen und andere Methoden klinischer Labore. Darüber hinaus wird peripheres Blut und Proben des Knochenmarks gezogen, um die Modifikation der Zielproteinexpression zu bewerten. Die Dosen, die in Untersuchungen der Phase I gegeben werden, werden erhöht werden, wie es in standardmäßigen klinischen Versuchen der Phase I gemacht wird, d.h. die Dosen werden erhöht werden, bis die maximal erträglichen Bereiche erreicht sind.

[0147] Klinische Reaktionen können durch geeignete Maßnahmen definiert werden. Beispielsweise kann eine vollständige Reaktion definiert werden durch vollständiges Verschwinden eines Beweises für Krebszellen für mindestens 2 Monate. Dem gegenüber kann eine Teilreaktion als eine 50 %-ige Reduktion an Krebszellen für mindestens 2 Monate definiert werden.

BEISPIEL 7: Behandlung am Menschen und klinische Protokolle

[0148] Dieses Beispiel beschreibt ein Protokoll, um die Behandlung von bcl-2-vermittelten Erkrankungen unter Verwendung von Lipid-assozierten Oligo- oder Polynukleotidzusammensetzungen alleine oder in Kombination mit Anti-Krebswirkstoffen zu erleichtern.

[0149] Typischerweise sind Patienten, die Kandidaten für die Behandlung sind, jene mit FL, obwohl Patienten mit hämatologischen bösartigen Erkrankungen, sowohl Leukämien als auch Lymphomen, festen Tumoren wie jene, die mit Brust-, Prostata- und Kolonkrebs assoziiert sind und Immunstörungen ebenfalls mit den Verfahren dieser Erfindung behandelt werden können. Der typische Behandlungsverlauf wird je nach dem individuellen Patienten und der Erkrankung, die behandelt wird, in bestimmter, dem Fachmann bekannter Weise variieren. Beispielsweise kann ein Patient mit FL in Zyklen à 8 Wochen behandelt werden, obwohl eine längere Dauer verwendet werden kann, wenn keine nachteiligen Wirkungen beim Patienten beobachtet werden, und kürzere

Behandlungszeiten resultieren können, wenn der Patient die Behandlung nicht wie erhofft verträgt. Jeder Zyklus wird aus zwischen 20 und 35 individuellen Dosen, die gleichmäßig verteilt sind, bestehen, obwohl dies ebenfalls in Abhängigkeit von der klinischen Situation variiert werden kann.

[0150] Ein Patient, der eine bcl-2-vermittelte Erkrankung hat, wie FL, kann unter Verwendung des folgenden Protokolls behandelt werden. Die Patienten können, müssen aber nicht, ihre vorhergehende chemo-, radio- oder gentherapeutische Behandlung erhalten haben. Optimalerweise wird der Patient eine adäquate Knochenmarksfunktion aufweisen (definiert als Anzahl peripherer absoluter Granulozyten von $> 2.000/\text{mm}^3$ und Anzahl der Blutplättchen von $100.000/\text{mm}^3$, adäquater Leberfunktion (Bilirubin 1,5 mg/dl) und adäquater renaler Funktion (Kreatinin 1,5 mg/dl).

[0151] Die Überexpression von bcl-2 wird typischerweise vor, während und nach der Therapie überwacht. Eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird typischerweise oral oder parenteral in Einheitsdosisformulierungen, die einen standardmäßigen, gut bekannten nichttoxischen, physiologisch verträglichen Träger, Adjuvanzien und Vehikel wie gewünscht enthalten, verabreicht werden. Der Ausdruck parenteral, wie hierin verwendet, schließt subkutane Injektionen, intravenöse, intramuskuläre, intraarterielle Injektion oder Infusionsmethoden mit ein. Die Lipid-assozierten Oligo- oder Polynukleotidzusammensetzungen können dem Patienten vor, nach oder gleichzeitig mit anderen Anti-Krebswirkstoffen zugeführt werden.

[0152] Ein typischer Behandlungsverlauf kann ungefähr sechs Dosen, die über einen Zeitraum von 7 bis 21 Tage zugeführt werden, umfassen. Nach Auswahl des klinischen Arztes kann die Kur fortgesetzt werden mit sechs Dosen alle drei Wochen oder auf einer weniger häufigen Basis (monatlich, alle 2 Monate, vierteljährlich etc.). Natürlich sind dies bloß beispielhafte Zeiten für die Behandlung und der Fachmann wird einfach erkennen, dass viele andere Zeitabläufe möglich sind.

[0153] Um bcl-2-überexprimierende Krebszellen unter Verwendung der Verfahren und Zusammensetzungen, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, abzutöten, wird man im Allgemeinen eine Zielzelle mit den Lipid-assozierten Formulierungen, die zuvor beschrieben wurden, in Kontakt bringen. Diese Zusammensetzungen werden in einer Menge zur Verfügung gestellt werden, die wirksam ist, um die Proliferation der Zelle zu inhibieren oder die Zelle abzutöten.

[0154] Örtliche Zufuhr der Lipid-assozierten Formulierungen wird ein effizientes Verfahren zur Zufuhr einer therapeutisch wirksamen Dosis sein, um der klinischen Erkrankung entgegen zu wirken. Alternativ kann die systemische Zufuhr geeignet sein. Die therapeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann an dem Patienten direkt an der Stelle des Tumors verabreicht werden. Das ist im Prinzip eine topische Behandlung der Oberfläche des Krebs. Das Zusammensetzungsvolumen sollte normalerweise ausreichen, um zu gewährleisten, dass die gesamte Oberfläche des Tumors in Kontakt gebracht wird mit der Lipid-assozierten Oligo- oder Polynukleotidzusammensetzung.

[0155] In einer Ausführungsform bringt die Verabreichung einfach die Injektion der therapeutischen Zusammensetzung in den Tumor mit sich. In einer anderen Ausführungsform wird ein Katheter in die Tumorstelle eingesetzt und die Höhle kann kontinuierlich für einen gewünschten Zeitraum gespült werden.

[0156] Natürlich können die oben beschriebenen Behandlungsschemata in Übereinstimmung mit dem Wissen, das man aus klinischen Versuchen, wie jenen, die in Beispiel 5 beschrieben sind, erhält, verändert werden. Der Fachmann wird in der Lage sein, die Information, die in dieser Beschreibung offenbart wird, zu nehmen und die Behandlungsschemata ausgehend von den klinischen Versuchen, die in der Beschreibung beschrieben sind, zu optimieren.

(1) Allgemeine Informationen:

(i) Anmelder:

- (A) Name: Board of Regents, The University of Texas
System
(B) Straße: 201 W. 7th Street
(C) Stadt: Austin
(D) Staat: Texas
(E) Land: USA
(F) Postleitzahl (ZIP): 78701
(G) Telefon: (512) 418-3000
(H) Telefax: (713) 789-2679

(ii) Titel der Erfindung: HEMMUNG DER BCL-2 PROTEIN EXPRESSION DURCH
LIPOSOMALE ANTISENSE-OLIGODEOXYNUKLEOTIDE

(iii) Anzahl an Sequenzen: 7

(iv) Computerlesbares Format:

- (A) Art des Datenträgers: Diskette
(B) Computer: IBM PC kompatibel
(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Veröffentlichung #1.0, Version #1.30 (EPO)

(vi) Daten zu früherer Anmeldung:

- (A) Anmeldenummer: US 08/726,211
(B) Anmeldetag: 4. Oktober 1996

(2) Information für SEQ ID NR:1:

(i) Sequenzcharakteristika:

- (A) Länge: 18 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR:1:

CAGCGTGCGC CATCCTTC

18

(2) Information für SEQ ID NR:2:

(i) Sequenzcharakteristika:

- (A) Länge: 20 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strängigkeit: Einzelstrang
(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR:2:

ACGGTCCGCC ACTCCTTCCC

20

(2) Information für SEQ ID NR:3:

(i) Sequenzcharakteristika:

- (A) Länge: 16 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR:3:

CTGAAGGGCT TCTTCC

16

(2) Information für SEQ ID NR:4:

(i) Sequenzcharakteristika:

- (A) Länge: 5086 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: CDS
- (B) Ort: 1459..2175

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR:4:

GCGCCCGCCC	CTCCGCGCCG	CCTGCCGCC	CGCCCGCCGC	GCTCCCGCCC	GCGCTCTCC	60
GTGGCCCCGC	CGCGCTGCCG	CCGCCGCCGC	TGCCAGCGAA	GGTGCCGGGG	CTCCGGGGCCC	120
TCCCTGCCGG	CGGCCGTCAG	CGCTCGGAGC	GAACTGCGCG	ACGGGAGGTC	CGGGAGGGGA	180
CCGTAGTCGC	GCCGCCGCCG	AGGACCAGGA	GGAGGGAGAAA	GGGTGCCAG	CCCGGAGGGCG	240
GGGTGCCCG	GTGGGGTGCA	GCGGAAGAGG	GGGTCCAGGG	GGGAGAACCT	CGTAGCAGTC	300
ATCCTTTTA	GGAAAAGAGG	GAAAAAATAA	AACCCCTCCCC	CACCACCTCC	TTCTCCCCAC	360
CCCTCGCCGC	ACCACACACA	GCGGGGCTT	CTAGCGCTCG	GCACCGCGG	GCCAGGCCCG	420
TCCTGCCTTC	ATTTATCCAG	CAGCTTTCG	GAAAATGCAT	TTGCTGTTCG	GAGTTAAC	480
AGAAGACGAT	TCCTGCCTCC	GTCCCCGGCT	CCTTCATCGT	CCCATCTCCC	CTGTCCTCT	540
CCTGGGGAGG	CGTGAAGCGG	TCCCGTGGAT	AGAGATTCA	GCCTGTGTCC	GCGCGTGTGT	600
GCGCGCGTAT	AAATTGCCGA	GAAGGGAAA	ACATCACAGG	ACTTCTGCGA	ATACCGGACT	660
GAAAATTGTA	ATTCATCTGC	CGCCGCCGCT	GCCAAAAAAA	AACTCGAGCT	CTTGAGATCT	720
CCGGTTGGGA	TTCCTGCGGA	TTGACATTC	TGTGAAGCAG	AAGTCTGGGA	ATCGATCTGG	780
AAATCCTCCT	AATTTTACT	CCCTCTCCCC	CCGACTCCTG	ATTCAATTGGG	AAGTTCAAA	840
TCAGCTATAA	CTGGAGAGTG	CTGAAGATTG	ATGGGATCGT	TGCCTTATGC	ATTTGTTTG	900
GTTTTACAAA	AAGGAAACTT	GACAGAGGAT	CATGCTGTAC	TTAAAAAATA	CAAGTAAGTC	960

TCGCACAGGA AATTGGTTTA ATGTAACCTT CAATGGAAAC CTTTGAGATT TTTTACTTAA	1020
AGTGCATTG AGTAAATTAA ATTTCCAGGC AGCTTAATAC ATTGTTTTTA GCCGTGTTAC	1080
TTGTTAGTGTG TATGCCCTGC TTTCACTCAG TGTGTACAGG GAAACGCACC TGATTTTTA	1140
CTTATTAGTT TGTTTTTCTT TTAACCTTTC AGCATCACAG AGGAAGTAGA CTGATATTAA	1200
CAATACTTAC TAATAATAAC GTGCCTCATG AAATAAAGAT CCGAAAGGAA TTGGAATAAA	1260
AAATTCCCTGC GTCTCATGCC AAGAGGGAAA CACCAGAAC AAGTGTCCG CGTGATTGAA	1320
GACACCCCT CGTCCAAGAA TGCAAAGCAC ATCCAATAAA ATAGCTGGAT TATAACTCCT	1380
CTTCTTCTC TGGGGGCCGT GGGGTGGGAG CTGGGGCGAG AGGTGCCGTT GGCCCCCGTT	1440
GCTTTTCCTC TGGGAAGG ATG GCG CAC GCT GGG AGA ACG GGG TAC GAC AAC	1491
Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn	
1 5 10	
CGG GAG ATA GTG ATG AAG TAC ATC CAT TAT AAG CTG TCG CAG AGG GGC	1539
Arg Glu Ile Val Met Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly	
15 20 25	
TAC GAG TGG GAT GCG GGA GAT GTG GGC GCC GCG CCC CCG GGG GCC GCC	1587
Tyr Glu Trp Asp Ala Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala	
30 35 40	
CCC GCA CCG GGC ATC TTC TCC TCC CAG CCC GGG CAC ACG CCC CAT CCA	1635
Pro Ala Pro Gly Ile Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro	
45 50 55	
GCC GCA TCC CGC GAC CCG GTC GCC AGG ACC TCG CCG CTG CAG ACC CCG	1683
Ala Ala Ser Arg Asp Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro	
60 65 70 75	
GCT GCC CCC GGC GCC GCG GGG CCT GCG CTC AGC CCG GTG CCA CCT	1731
Ala Ala Pro Gly Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro	
80 85 90	
GTC GTC CAC CTG GCC CTC CGC CAA GCC GGC GAC GAC TTC TCC CGC CGC	1779
Val Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg	
95 100 105	
TAC CGC GGC GAC TTC GCC GAG ATG TCC AGC CAG CTG CAC CTG ACG CCC	1827
Tyr Arg Gly Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro	
110 115 120	
TTC ACC GCG CGG GGA CGC TTT GCC ACG GTG GTG GAG GAG CTC TTC AGG	1875
Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg	
125 130 135	
GAC GGG GTG AAC TGG GGG AGG ATT GTG GCC TTC TTT GAG TTC GGT GGG	1923
Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly	
140 145 150 155	

GTC ATG TGT GTG GAG AGC GTC AAC CGG GAG ATG TCG CCC CTG GTG GAC Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp 160 165 170	1971
AAC ATC GCC CTG TGG ATG ACT GAG TAC CTG AAC CGG CAC CTG CAC ACC Asn Ile Ala Leu Thr Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr 175 180 185	2019
TGG ATC CAG GAT AAC GGA GGC TGG GAT GCC TTT GTG GAA CTG TAC GGC Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly 190 195 200	2067
CCC AGC ATG CGG CCT CTG TTT GAT TTC TCC TGG CTG TCT CTG AAG ACT Pro Ser Met Arg Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr 205 210 215	2115
CTG CTC AGT TTG GCC CTG GTG GGA GCT TGC ATC ACC CTG GGT GCC TAT Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr 220 225 230 235	2163
CTG AGC CAC AAG TGAAGTCAAC ATGCCTGCC CAAACAAATA TGCAAAAGGT Leu Ser His Lys	2215
TCACTAAAGC AGTAGAAATA ATATGCATTG TCAGTGATGT ACCATGAAAC AAAGCTGCAG GCTGTTAAG AAAAAATAAC ACACATATAA ACATCACACA CACAGACAGA CACACACACA CACACAATT AACAGTCITC AGGCAAAACG TCGAATCAGC TATTTACTGC CAAAGGGAAA TATCATTTAT TTTTACATT ATTAAGAAAA AAGATTTATT TATTTAAGAC AGTCCCATCA AAACTCCGTC TTTGGAAATC CGACCACTAA TTGCCAAACA CCGCTTCGTG TGGCTCCACC TGGATTTCT GTGCCTGTAA ACATAGATTG GCTTCCATG TTGTTGGCCG GATCACCATC TGAAGAGCAG ACGGATGGAA AAAGGACCTG ATCATTGGGG AAGCTGGCTT TCTGGCTGCT GGAGGCTGGG GAGAAGGTGT TCATTCACCT GCATTTCTTT GCCCTGGGG CGTGATATTA ACAGAGGGAG GGTTCCCGTG GGGGAAAGTC CATGCCTCCC TGGCCTGAAG AAGAGACTCT TTGCATATGA CTCACATGAT GCATACCTGG TGGGAGGAAA AGAGTTGGGA ACTTCAGATG GACCTAGTAC CCACTGAGAT TTCCACGCCG AAGGACAGCG ATGGAAAAAA TGCCCTTAAA TCATAGGAAA GTATTTTTT AAGCTACCAA TTGTGCCGAG AAAAGCATT TAGCAATTAA TACAATATCA TCCAGTACCT TAAACCTGA TTGTGTATAT TCATATATTT TGGATACGCA CCCCCCAATC CCCAATACTG GCTCTGTCTG AGTAAGAAC AGAACCTCT GGAACCTGAG GAAGTGAACA TTTCGGTGAC TTCCGATCAG GAAGGCTAGA GTTACCCAGA GCATCAGGCC GCCACAAGTG CCTGCTTTA GGAGACCGAA GTCCGCAGAA CCTACCTGTG TCCCAGCTTG GAGGCCTGGT CCTGGAACTG AGCCGGGCC TCACCTGGCCT CCTCCAGGGA TGATCAACAG	2275 2335 2395 2455 2515 2575 2635 2695 2755 2815 2875 2935 2995 3055 3115 3175 3235

GGTAGTGTGG TCTCCGAATG TCTGGAAGCT GATGGATGGA GCTCAGAATT CCACTGTCAA	3295
GAAAGAGCAG TAGAGGGGTG TGGCTGGGCC TGTCAACCTG GGGCCCTCCA GGTAGGGCCG	3355
TTTCACGTG GAGCATAGGA GCCACGACCC TTCTTAAGAC ATGTATCACT GTAGAGGGAA	3415
GGAACAGAGG CCCTGGGCCT TCCTATCAGA AGGACATGGT GAAGGCTGGG AACGTGAGGA	3475
GAGGCAATGG CCACGGCCA TTTTGGCTGT ACCACATGGC ACGTTGGCTG TGTGGCCTTG	3535
GCCACCTGTG AGTTAAAGC AAGGCTTAA ATGACTTTGG AGAGGGTCAC AAATCCTAAA	3595
AGAACGATTG AAGTGAGGTG TCATGGATT ATTGACCCCT GTCTATGGAA TTACATGTAA	3655
AACATTATCT TGTCACTGTA GTTTGGTTTT ATTTGAAAAC CTGACAAAAA AAAAGTTCCA	3715
GGTGTGGAAT ATGGGGGTTA TCTGTACATC CTGGGGCATT AAAAAAAAAT CAATGGTGGG	3775
GAACATAAA GAAGTAACAA AAGAAGTGAC ATCTTCAGCA AATAAACTAG GAAATTTTTT	3835
TTTCTTCCAG TTTAGAATCA GCCTTGAAAC ATTGATGGAA TAACTCTGTG GCATTATTGC	3895
ATTATATACC ATTTATCTGT ATTAACTTG GAATGTACTC TGTTCAATGT TTAATGCTGT	3955
GGTTGATATT TCGAAAGCTG CTTTAAAAAA ATACATGCAT CTCAGGGTTT TTTTGTGTTT	4015
AATTGTATTT AGTTATGGCC TATACACTAT TTGTGAGCAA AGGTGATCGT TTTCTGTTTG	4075
AGATTTTAT CTCTTGATTTC TTCAAAAGCA TTCTGAGAAG GTGAGATAAG CCCTGAGTCT	4135
CAGCTACCTA AGAAAAACCT GGATGTCACT GGCCACTGAG GAGCTTGTT TCAACCAAGT	4195
CATGTGCATT TCCACGTCAA CAGAATTGTT TATTGTGACA GTTATATCTG TTGTCCTTTT	4255
GACCTTGTGTT CTTGAAGGTT TCCTCGTCCC TGGGCAATTG CGCATTAAAT TCATGGTATT	4315
CAGGATTACA TGCATGTTG GTTAAACCCA TGAGATTCAT TCAGTTAAAA ATCCAGATGG	4375
CGAATGACCA GCAGATTCAA ATCTATGGTG GTTTGACCTT TAGAGAGTTG CTTTACGTGG	4435
CCTGTTCAA CACAGACCCA CCCAGAGCCC TCCTGCCCTC CTTCCGCGGG GGCTTCTCA	4495
TGGCTGTCCCT TCAGGGTCTT CCTGAAATGC AGTGGTCGTT ACGCTCCACC AAGAAAGCAG	4555
GAAACCTGTG GTATGAAGCC AGACCTCCCC GGCGGGCCTC AGGAAACAGA ATGATCAGAC	4615
CTTTGAATGA TTCTAATTTT TAAGCAAAAT ATTATTTAT GAAAGGTTA CATTGTCAA	4675
GTGATGAATA TGGAATATCC AATCCTGTGC TGCTATCCTG CCAAAATCAT TTTAATGGAG	4735
TCAGTTGCA GTATGCTCCA CGTGGTAAGA TCCTCCAAGC TGCTTTAGAA GTAAACATGA	4795
AGAACGTGGA CGTTTTTAAT ATAAAGCCTG TTTTGTCTTT TGTTGTTGTT CAAACGGGAT	4855
TCACAGAGTA TTGAAAAAT GTATATATAT TAAGAGGTCA CGGGGGCTAA TTGCTAGCTG	4915
GCTGCCCTTT GCTGTGGGGT TTTGTTACCT GGTTTAATA ACAGTAAATG TGCCCAGCCT	4975

CTTGGCCCCA GAACTGTACA GTATTGTGGC TGCACCTTGCT CTAAGAGTAG TTGATGTTGC	5035
ATTTTCCTTA TTGTTAAAAA CATGTTAGAA GCAATGAATG TATATAAAAG C	5086

(2) Information für SEQ ID NR:5:

(i) Sequenzcharakteristika:

- (A) Länge: 239 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR:5:

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met			
1	5	10	15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala			
20	25	30	
Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile			
35	40	45	
Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp			
50	55	60	
Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala			
65	70	75	80
Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala			
85	90	95	
Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe			
100	105	110	
Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly			
115	120	125	
Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp			
130	135	140	
Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu			
145	150	155	160
Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp			
165	170	175	
Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn			
180	185	190	
Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro			
195	200	205	
Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala			
210	215	220	

Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Ser His Lys
 225 230 235

(2) Information für SEQ ID NR:6:

(i) Sequenzcharakteristika:

- (A) Länge: 911 Basenpaare
- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strängigkeit: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: CDS
- (B) Ort: 147..761

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR:6:

TGATTGAAGA CACCCCTCG TCCAAGAATG CAAAGCACAT CCAATAAAAT AGCTGGATTA	60
TAACTCCTCT TCTTTCTCTG GGGGCCGTGG GGTGGGAGCT GGGGCGAGAG GTGCCGTTGG	120
CCCCCGTTGC TTTTCCTCTG GGAAGG ATG GCG CAC GCT GGG AGA ACG GGG TAC Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr	173
1 5	
GAC AAC CGG GAG ATA GTG ATG AAG TAC ATC CAT TAT AAG CTG TCG CAG	221
Asp Asn Arg Glu Ile Val Met Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln	
10 15 20 25	
AGG GGC TAC GAG TGG GAT GCG GGA GAT GTG GGC GCC GCG CCC CCG GGG	269
Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly	
30 35 40	
GCC GCC CCC GCA CCG GGC ATC TTC TCC TCC CAG CCC GGG CAC ACG CCC	317
Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro	
45 50 55	
CAT CCA GCC GCA TCC CGC GAC CCG GTC GCC AGG ACC TCG CCG CTG CAG	365
His Pro Ala Ala Ser Arg Asp Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln	
60 65 70	
ACC CCG GCT GCC CCC GGC GGC GCG GGG CCT GCG CTC AGC CCG GTG	413
Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val	
75 80 85	
CCA CCT GTG GTC CAC CTG GCC CTC CGC CAA GCC GGC GAC GAC TTC TCC	461
Pro Pro Val Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser	
90 95 100 105	
CGC CGC TAC CGC GGC GAC TTC GCC GAG ATG TCC AGC CAG CTG CAC CTG	509
Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu	
110 115 120	
ACG CCC TTC ACC GCG CGG GGA CGC TTT GCC ACG GTG GTG GAG GAG CTC	557
Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu	
125 130 135	

TTC AGG GAC GGG GTG AAC TGG GGG AGG ATT GTG GCC TTC TTT GAG TTC Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe	140	145	150	605
GGT GGG GTC ATG TGT GTG GAG AGC GTC AAC CGG GAG ATG TCG CCC CTG Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu	155	160	165	653
GTG GAC AAC ATC GCC CTG TGG ATG ACT GAG TAC CTG AAC CGG CAC CTG Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu	170	175	180	185
CAC ACC TGG ATC CAG GAT AAC GGA GGC TGG GTA GGT GCA TCT GGT GAT His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Val Gly Ala Ser Gly Asp	190	195	200	701
GTG AGT CTG GGC TGAGGCCACA GGTCCGAGAT CGGGGGTTGG AGTGCAGGGTG Val Ser Leu Gly	205			749
GGCTCCTGGG CAATGGGAGG CTGTGGAGCC GGCGAAATAA AATCAGAGTT GTTGCTTCCC				801
GGCGTGTCCC TACCTCCTCC TCTGGACAAA GCGTTCACTC CCAACCTGAC				861
				911

(2) Information für SEQ ID NR:7:

(i) Sequenzcharakteristika:

- (A) Länge: 205 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NR:7:

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met	1	5	10	15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala	20	25	30	
Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile	35	40	45	
Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp	50	55	60	
Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala	65	70	75	80
Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala	85	90	95	
Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe	100	105	110	

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
115 120 125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
130 135 140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Gly Gly Val Met Cys Val Glu
145 150 155 160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
180 185 190

Gly Gly Trp Val Gly Ala Ser Gly Asp Val Ser Leu Gly
195 200 205

Patentansprüche

1. Zusammensetzung umfassend (i) ein erstes Polynukleotid, das unter intrazellulären Bedingungen an ein zweites, Bcl-2-kodierendes Polynukleotid hybridisiert, und (ii) ein neutrales Phospholipid, das mit dem ersten Polynukleotid assoziiert ist, wobei das erste Polynukleotid ein Oligonukleotid mit einer Länge von 8 bis 50 Basen ist, und wobei die Zusammensetzung kein kationisches Lipid enthält.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid ein p-Ethoxy- oder Methylphosphonat-Oligonukleotid ist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der Phospholipidbestandteil eine neutrale Nettoladung hat.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das erste Polynukleotid komplementär zur Translations-Initiationsstelle der Bcl-2 mRNA ist.
5. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid die Sequenz CAGCGTGCGC-CATCCTTC (SEQ ID NR:1) umfasst.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung ein Liposom umfasst, das von dem neutralen Phospholipid gebildet wird.
7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das Oligonukleotid im Liposom eingekapselt ist.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei das Phospholipid ein Phosphatidylcholin, ein Phosphatidylglycerin oder ein Phosphatidylethanolamin ist.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei das Phospholipid Dioleoylphosphatidylcholin ist.
10. Zusammensetzung umfassend ein Expressionskonstrukt, das für ein erstes Polynukleotid kodiert, das mit einem zweiten, Bcl-2-kodierenden Polynukleotid unter intrazellulären Bedingungen hybridisiert, wobei die Transkription des ersten Polynukleotids unter der Kontrolle eines Promotors steht, der in eukaryotischen Zellen aktiv ist, wobei das erste Polynukleotid ein Oligonukleotid mit einer Länge von 8 bis 50 Basen ist, wobei das Konstrukt assoziiert ist mit einem neutralen Lipid, und wobei die Zusammensetzung kein kationisches Lipid enthält.
11. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur Inhibition oder Behandlung einer mit Bcl-2 assoziierten Erkrankung, wobei die Erkrankung eine hämatologische Krebserkrankung ist, einschließlich Leukämien und Lymphomen wie folliculäre und nicht-follikuläre Lymphome und chronischen lymphozytischen Leukämien, und Plasmazell-Dyskrasien; feste Tumore; und Immunerkrankungen in einem Patienten, der eine Zelle aufweist, die (i) sowohl Bcl-2 als auch Bax exprimiert und/oder (ii) in der die Translokation von p53 in den Nukleus nach gentoxischer Schädigung durch bcl-2 inhibiert wird.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Zelle eine Krebszelle ist, vorzugsweise eine folliculäre Lymphomzelle.
13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, wobei der Patient ein Tier ist.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei das Tier ein Mensch ist.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das Medikament so formuliert ist, dass es eine Verabreichung in Dosen von 0,50–10,0 ml erlaubt.
16. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das Medikament so formuliert ist, dass es die Verabreichung in einer Menge von ungefähr 5 bis ungefähr 30 mg Polynukleotid pro m² Körperoberfläche erlaubt.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei das Medikament so formuliert ist, dass es die Verabreichung 3 Mal pro Woche über einen Zeitraum von 8 Wochen erlaubt.
18. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Erkrankung ein fester Tumor ist.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der feste Tumor mit Brust-, Prostata-, oder Darmkrebs assoziiert ist.
20. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Erkrankung eine hämatologische bösartige Erkrankung ist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die hämatologische bösartige Erkrankung eine Leukämie oder ein Lymphom ist.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Leukämie eine chronische Lymphozytenleukämie ist.
23. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das Lymphom ein folliculäres oder ein nichtfollikuläres Lymphom ist.
24. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die Erkrankung eine Plasmazell-Dyskrasie ist.
25. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Erkrankung eine Immunstörung ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

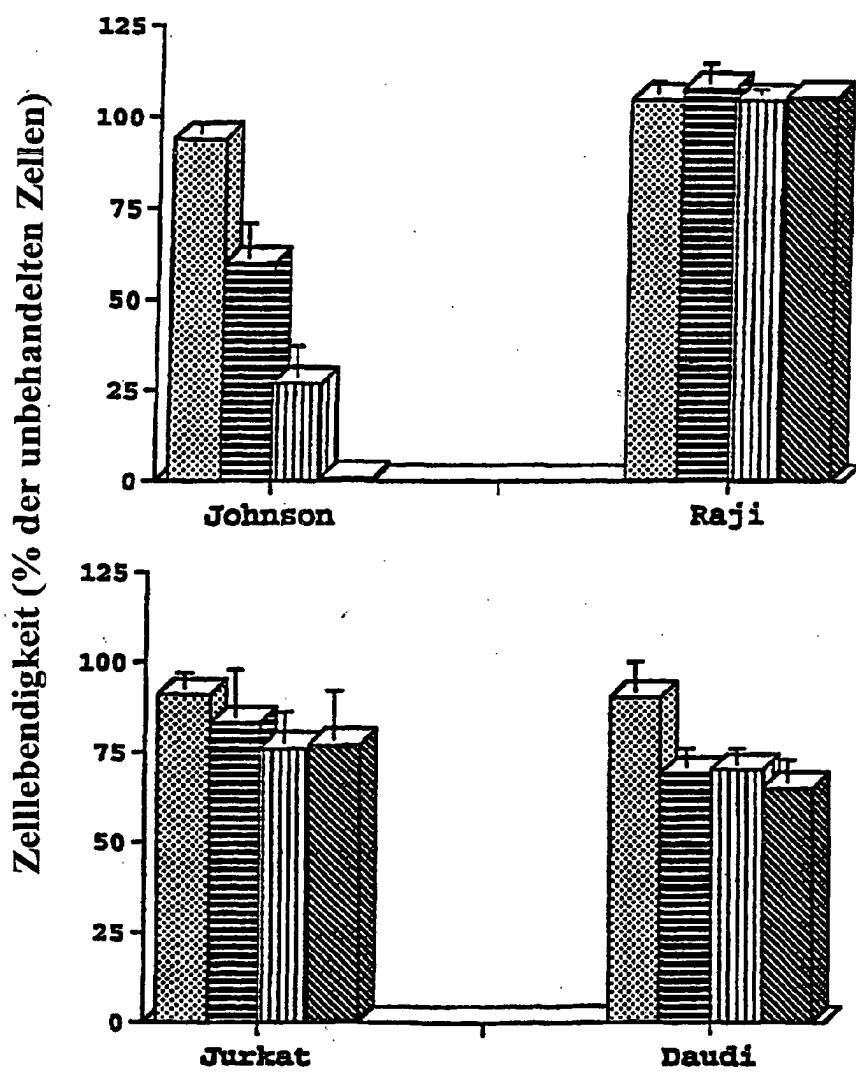


FIG. 1

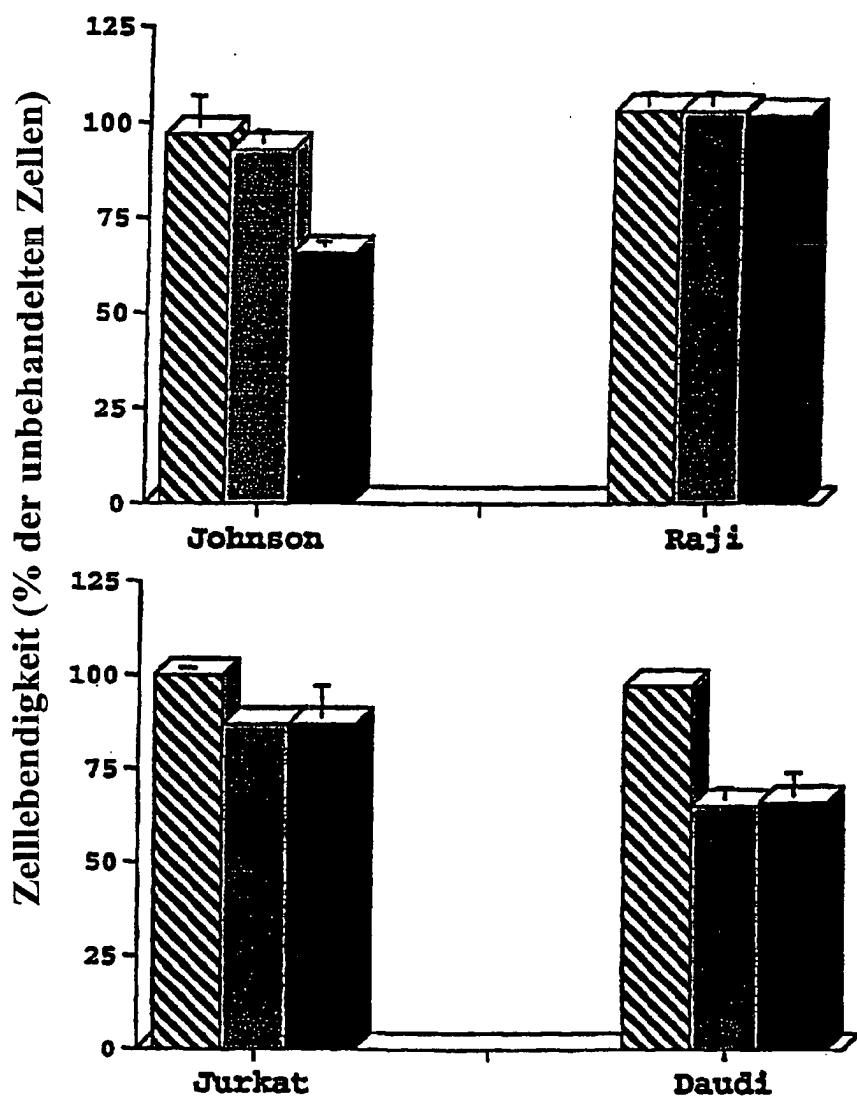


FIG. 2

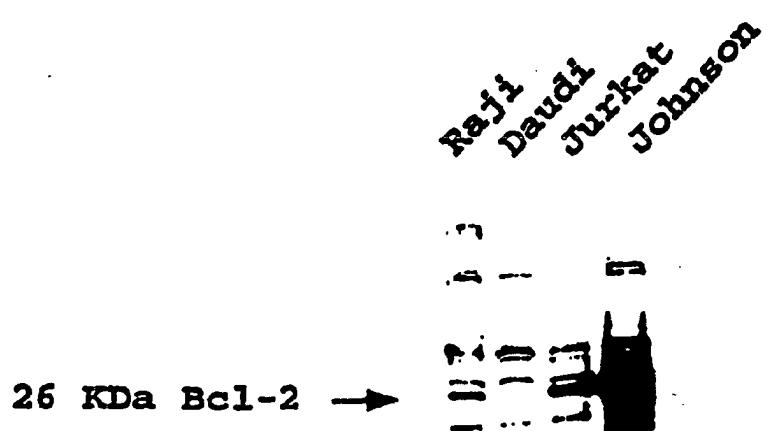


FIG. 3

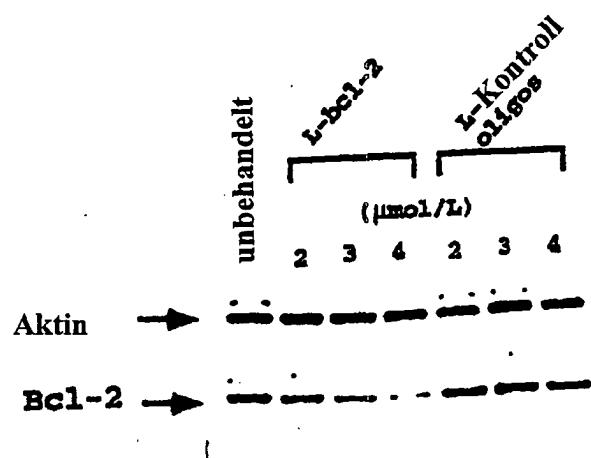


FIG. 4A

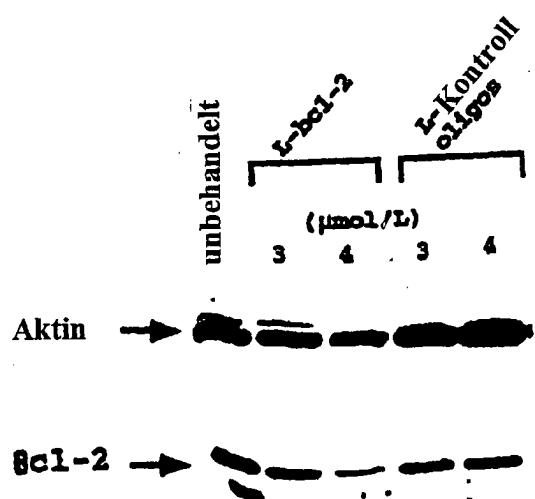
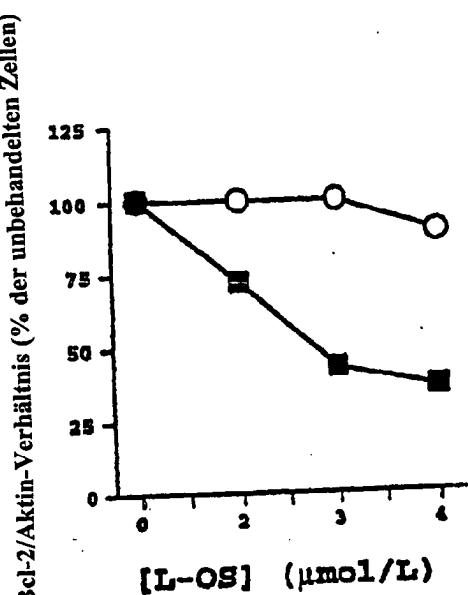
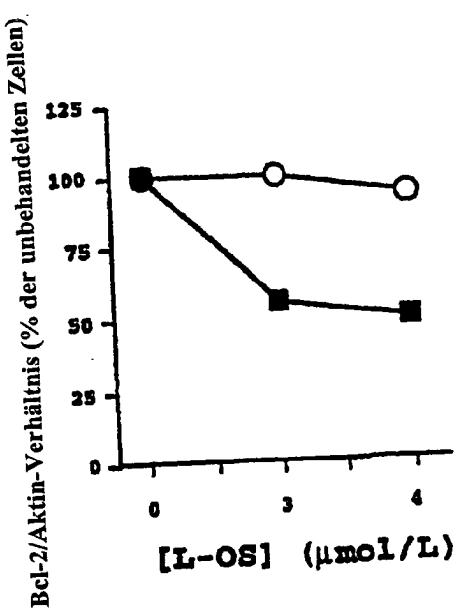


FIG. 4B



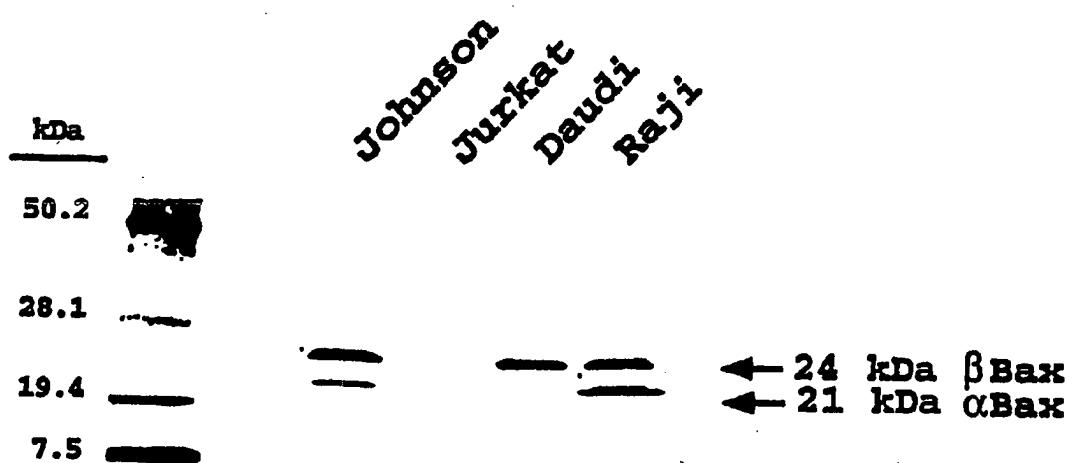


FIG. 5

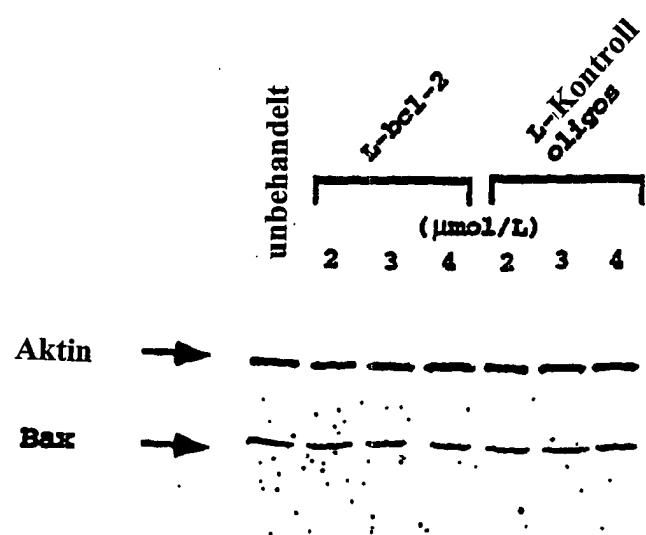


FIG. 6A

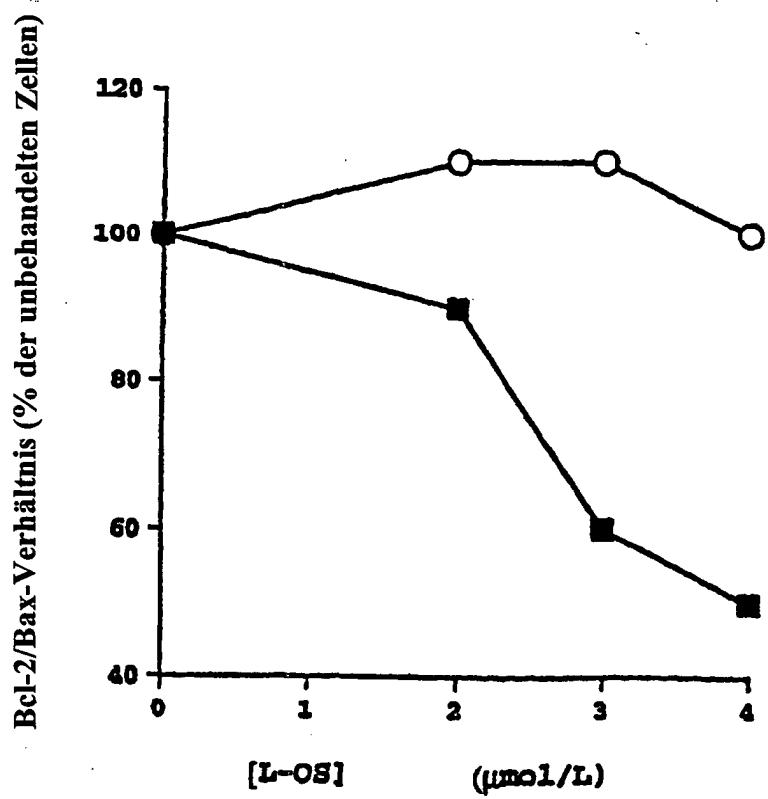


FIG. 6B



FIG. 7



FIG. 8A

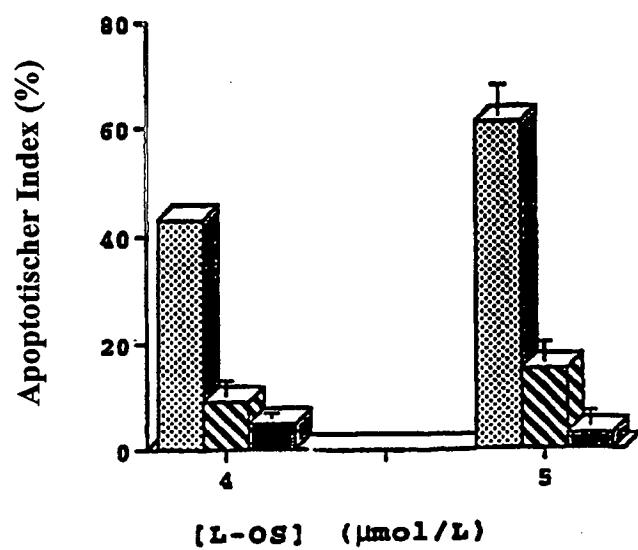


FIG. 8B

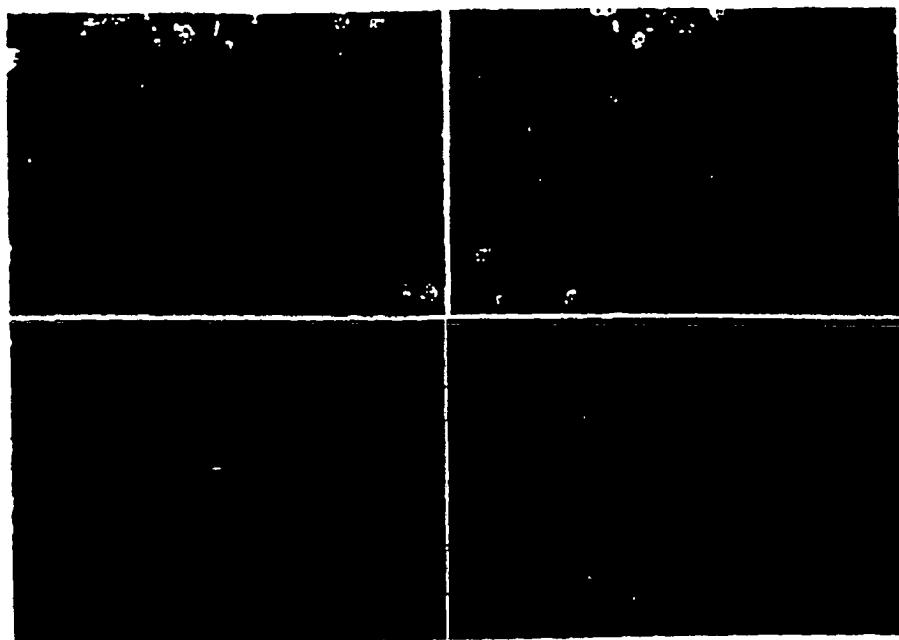


FIG. 9A

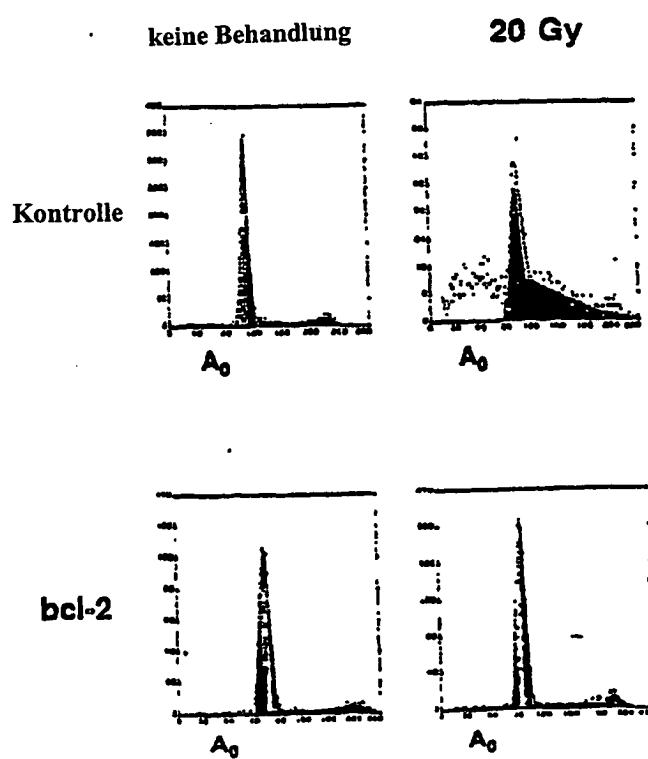


FIG. 9B

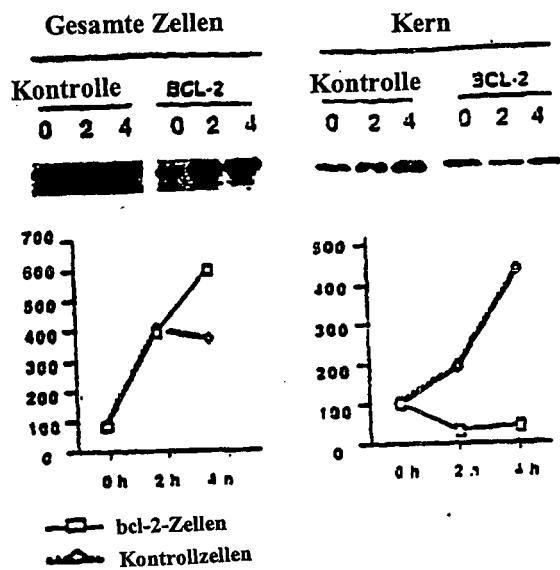


FIG. 10A

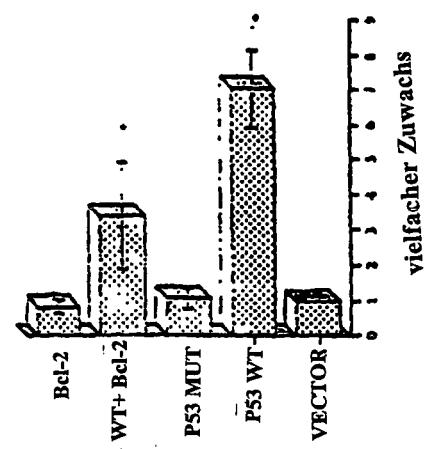
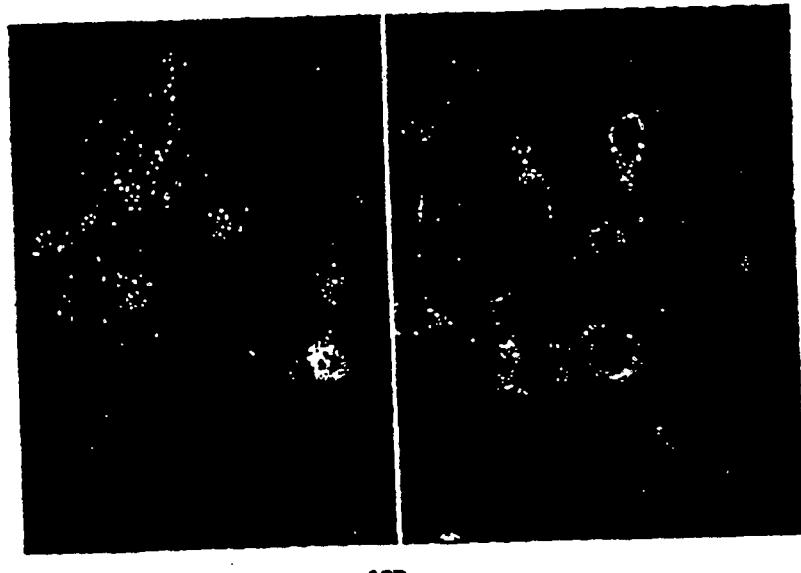
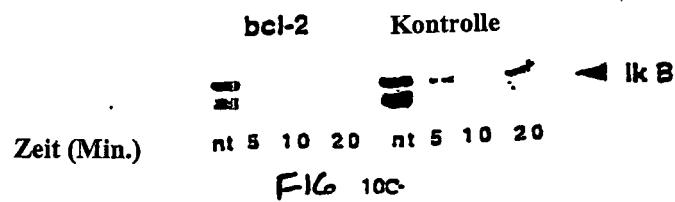


FIG. 10C



10B



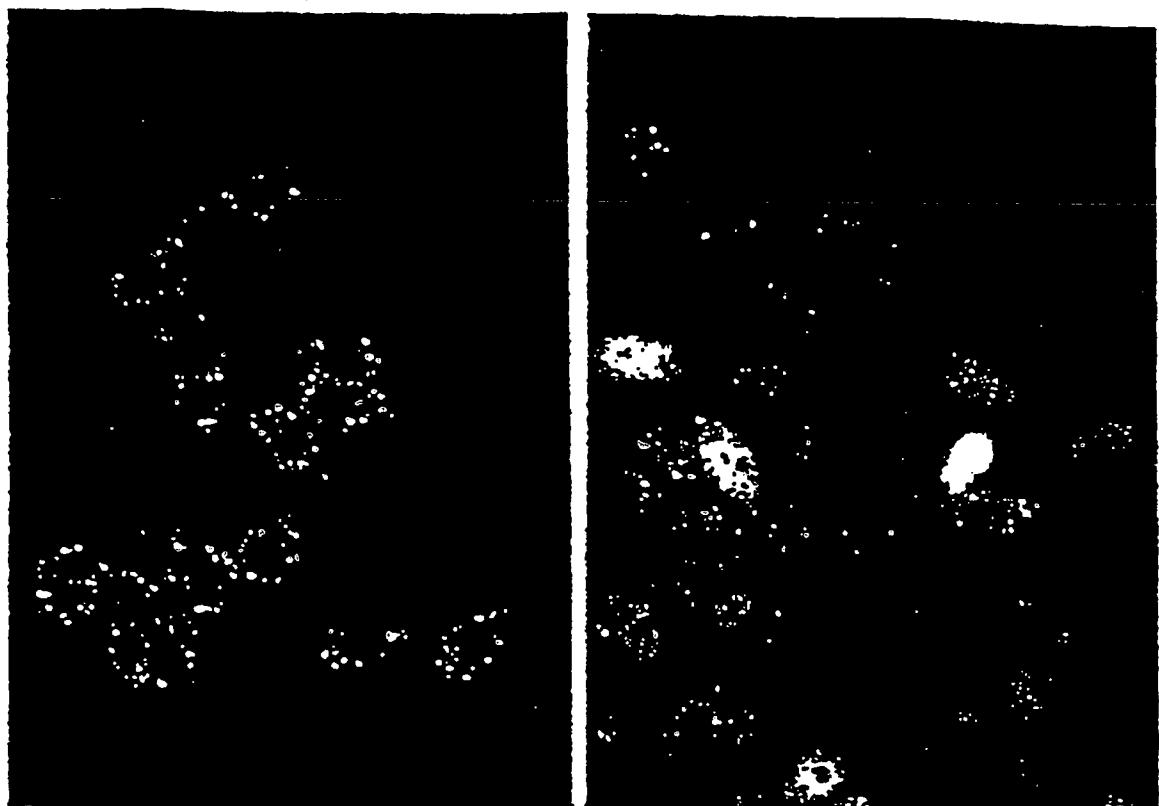


FIG. 11B

AS CO EL -bcl-2

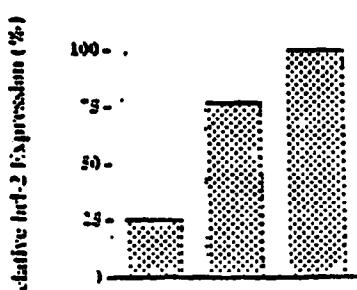


FIG. 11A