



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 18 050 T2 2006.02.23

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 162 982 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 18 050.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/FR00/00676

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 910 993.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 00/56342

(86) PCT-Anmeldetag: 17.03.2000

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 28.09.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 19.12.2001

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 09.02.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 23.02.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 31/7088 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9903433 19.03.1999 FR

(73) Patentinhaber:

Institut National de la Santé et de la Recherche  
Médicale (INSERM), Paris, FR; Assistance  
Publique, Hopitaux de Paris, Paris, FR

(74) Vertreter:

Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,  
80539 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

CARPENTIER, Antoine, F-75007 Paris, FR

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON STABILISIERTEn OLIGONUCLEOTIDEn ZUR HERSTELLUNG VON ANTITU-MORALEn ARZNEIMITTELn

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 bezieht sich auf die Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden zur Herstellung eines Medikaments mit Antitumorwirkung.

**[0002]** Die wirksame Behandlung der Krebsarten bleibt eine der Hauptherausforderungen der heutigen Medizin.

**[0003]** Die Wirksamkeit der herkömmlichen chirurgischen oder auch die cytolytische Therapie (Chemotherapie und Strahlentherapie) bleibt bei zahlreichen Krebsarten sehr begrenzt.

**[0004]** Für die Astrocytome zum Beispiel, deren Behandlung hauptsächlich auf der chirurgischen Exhairese und der lokalen cerebralen Bestrahlung besteht, ist der Medianwert des Überlebens nur 4 bis 6 Monate nach chirurgischer Exhairese und 8 bis 10 Monate bei der Kombination Chirurgie und Strahlentherapie. Eine zusätzliche Chemotherapie verlängert das Überleben bei den Patienten von unter 60 Jahren, aber in sehr bescheidener Anzahl in der Größenordnung von 3 Monaten. Unter dieser Dreifachbehandlung bleibt der Mittelwert für das Überleben unter zwei Jahren für den histologischen Grad III (anaplastisches Astrocytom) und unter einem Jahr für den Grad IV (Glioblastom). Die Mortalität ist bei diesen beiden Gruppen 100% (Daumas-Dupont C. et al. (1988), Cancer 62(10), S. 2152–65).

**[0005]** Die Stimulation des Immunsystems bei der Behandlung von Krebs ist eine alte Idee und es wurden zahlreiche Produkte getestet, zum Beispiel Bakterienextrakte (Jaekle K. A. et al. (1990), J. Clin. Oncol. 8(8), S. 1408–18), Bakterien-DNA, insbesondere die von *Mycobacterium bovis* (MY-1) (Tokunaga T. et al. (1984), JNCI 72, S. 955–62). MY-1 ist jedoch für die Erhöhung des Überlebens im Gliommodell bei der Maus unwirksam (Nakaichi M. et al. (1995), J. Vet. Med. Sci. 57(3), S. 583–5). IL2 (Herrlinger U. et al. (1996), J. Neurooncol. 27(3), S. 193–203) und in jüngerer Zeit auch IL12 (Kishima H. et al. (1998), Br. J. Cancer 78(4), S. 446–53; Jean W. C. et al. (1998), Neurosurgery 42(4), S. 850–6) wurden diesbezüglich untersucht.

**[0006]** Unglücklicherweise hat die Mehrzahl dieser Produkte eine begrenzte Wirksamkeit oder eine nicht akzeptable Toxizität und bis heute hat lediglich BCG von *Mycobacterium bovis* klinische Anwendungen erreicht, allerdings nur in sehr begrenzten Anwendungen bei Krebsarten der Blase (Soloway M. S. et al. (1988), Urol. Clin. North Am. 15, S. 661–9).

**[0007]** Die Oligonukleotide sind Polymere, die durch Kombination von Purin- oder Pyrimidinbasen und Zuckern gebildet werden, insbesondere Ribonukleotide oder Desoxyribonukleotide. In natürlichem Zustand sind die Bindungen Phosphoesterbindungen, die gegenüber Nukleasen des menschlichen Organismus empfindlich sind. So weisen die Oligonukleotide eine sehr kurze Halbwertszeit auf (in der Größenordnung von einer Minute), wenn sie dem Menschen injiziert werden, was ihre biologischen Wirkungen beschränkt. So haben viele Studien versucht, Oligonukleotide zu stabilisieren, indem sie ihre chemische Struktur modifizierten, um sie so gegenüber Nukleasen resistent zu machen. Auf diese Weise wurden mehrere Arten stabilisierter Oligonukleotide geschaffen, unter anderem die Phosphorthioate oder Methylphosphonate (Crooke R. M. (1991), Anti-Cancer Drug Design 6, S. 609–46). Am häufigsten verwendet werden die Phosphorthioat-Oligonukleotide.

**[0008]** Bestimmte Oligodesoxynukleotide und insbesondere bestimmte synthetische Oligodesoxynukleotide besitzen manchmal außer ihren klassischen Antisense-Eigenschaften geeignete biologische Wirkungen.

**[0009]** So stimulieren bestimmte Oligodesoxyribonukleotide unabhängig von der ganzen bekannten Antisense-Sequenz *in vitro* und *in vivo* die Proliferation der B-Lymphocyten, die Aktivität der NK-Zellen und induzieren die Sekretion von  $\alpha$ -IFN,  $\beta$ -IFN,  $\gamma$ -IFN, von IL6, IL12 oder  $\alpha$ -TNF durch diese Zellen (Yamamoto S. et al. (1992), J. Immunol. 148(12), S. 4072–6; Yamamoto T. et al. (1994), Mikrobiol. Immunol. 38(10), S. 831–6; Yi A. K. et al. (1996), J. Immunol. 157(12), S. 5394–402; Ballas Z. K. et al. (1996), J. Immunol. 157(5), S. 1840–5; Cawdery J. S. et al. (1996), J. Immunol. 156(12), S. 4570–5; Stacey K. J. et al. (1996); J. Immunol. 157(5), S. 2116–22). Die Gesamtheit dieser Cytokine richtet sich auf eine Immunantwort des Typs Th1 (Chu R. S. et al. (1997), J. Exp. Med. 186(10), S. 1623–31).

**[0010]** Autoren haben gezeigt, dass die immunstimulierenden Eigenschaften dieser Oligodesoxynukleotide zum großen Teil von nicht-methylierten CG-Motiven (nicht-methylierte CpG-Dinukleotide) abhängen, die in der DNA von Säugern unterrepräsentiert sind (Kuramoto E. et al. (1992), Jpn. J. Cancer Res. 83, S. 1128–31).

**[0011]** Obgleich die Autoren bezüglich der Tatsache, dass die nicht-methylierte Sequenz CG unverzichtbar

ist und dass die zwei an das CG-Motiv angrenzenden Nukleotide für die immunstimulierende Aktivität ebenfalls kritisch sind, übereinstimmen, sind die publizierten Angaben über die Natur der angrenzenden Sequenzen widersprüchlich.

**[0012]** In der Tat beanspruchen Krieg A. M. et al. ((1996, Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6(2), S. 133-9) ein hexameres Motiv des Typs 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3', während die Patentanmeldung EP 468 520 ein hexameres Palindrommotiv beansprucht. Die internationale Patentanmeldung WO 9855495 zeigt, dass alle Hexamere, wie sie von Krieg et al., 1996 (vorher zitiert) definiert werden, nicht immunstimulierend sind und dass es vielmehr zweckdienlich ist, Oktamere der Sequenz 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-CC-3' oder der Sequenz 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-CG-3' zu definieren, um eine immunstimulierende Aktivität zu haben.

**[0013]** Andere immunstimulierende Oligodesoxynukleotide, die nicht als Oligonukleotide definiert sind, die ein nichtmethyliertes CG-Motiv besitzen, wurden in der Patentanmeldung EP 855 184 beschrieben: Sie umfassen die Fixierungssequenz der Eukaryoten-Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF<sub>k</sub>B oder die Familie AP-1. Unter diesen Oligonukleotiden enthalten dennoch einige das nicht-methylierte CG-Motiv.

**[0014]** Die Ausnutzung der immunstimulierenden Eigenschaften der Oligodesoxynukleotide, die ein Motiv des Typs nicht-methyliertes CG enthalten, stellt das Ziel von Forschungen auf sehr verschiedenen Gebieten dar:

- (1) Auf dem Gebiet der Impfung werden sie in Kombination mit Antigenen als Adjuvans verwendet, um eine Immunantwort des Typs Th1 in spezifischer Weise zu stimulieren (Davis H. L. et al. (1998), The Journal of Immunology 160(2), S. 870-6); EP-Anmeldung 855 184; internationale Patentanmeldung WO 9818810 der University of Iowa Research Foundation, wobei A. M. Krieg einer der Erfinder ist; internationale Patentanmeldung WO 9855495),
- (2) auf dem Gebiet der Allergie werden sie nur zum Modulieren der Immunantwort verwendet (internationale Patentanmeldungen WO 9818810 und WO 9855495) und
- (3) auf dem Gebiet des Krebses werden sie wie folgt verwendet:
  - entweder in Kombination mit einem Tumorantigen als Adjuvans eines Antitumor-Vakzins (EP-Anmeldung Nr. 855 184; Weiner G. J. et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 94, S. 10833-7; Wooldridge J. E. et al. (1997) Blood 89(8), S. 2994-8),
  - oder allein als Antitumormittel (Connell et al. (1999), Proceedings of the American Association for Cancer Research 40, S. 299; EP-Anmeldung Nr. 468 520, Carpentier A. F. et al. (1999), Cancer Research 59, S. 5429-5432).

**[0015]** Im letzten Fall wurde die Antitumoraktivität nur einiger Sequenzen unter den beschriebenen wirksam bewiesen:

- Weiner G. J. et al. und Wooldridge J. E. et al. (bereits zitiert), die ein Oligonukleotid verwenden, das ein nicht-methyliertes CG-Motiv der Sequenz 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3' umfasst, zeigen, dass dieses Oligonukleotid keine Antitumorwirkung besitzt, wenn es allein verwendet wird;
- Carpentier et al., Tokunaga et al. und Connell et al. (vorher zitiert), die jeweils ein Phosphorthioat-Oligonukleotid des Oktamertyps (5'-TGACTGTGAACGTTCGAGATGA-3'), ein nicht stabilisiertes, hexameres Palindromoligonukleotid (5'-ACCGATGACGTCGCCGGTG ACGGCACCAAGACGACGGCCACGTGCT-3') und ein hexameres Phosphorthioat-Oligonukleotid des Typs 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' verwenden, zeigen, dass die genannten Oligonukleotide Antitumoraktivität besitzen.

**[0016]** Aus dem Stand der Technik geht hervor, dass – abgesehen von dem nicht-methylierten CG-Motiv – die genaue Natur der aktiven Sequenzen dieser immunstimulierenden Oligodesoxynukleotide zum Erhalt einer Antitumoraktivität nicht klar definiert ist; insbesondere sind die publizierten Angaben über die Natur der an das nicht-methylierte CG-Motiv angrenzenden Sequenzen (2 Basen in 5' und 2 Basen in 3' (hexamere Motive) oder 4 Basen in 3' (oktamer Motiv) widersprüchlich.

**[0017]** Neuere Untersuchungen, die von Hartmann G. et al. ((2000), The Journal of Immunology 164, S. 1617-24)) beschrieben werden, geben Erklärungen über die Schwierigkeit, die Sequenz solcher Oligonukleotide zu definieren.

**[0018]** Tatsächlich zeigen die Autoren, dass die immunstimulierenden Oligodesoxynukleotide entsprechend der Natur ihrer Sequenz unterschiedliche Wirkungen auf die NK-Aktivierung, die Proliferation der B-Lymphozyten, die Sekretion von IL12, IL6 und γ-INF haben. Diese Angaben zeigen, dass nicht alle immunstimulierenden Oligodesoxynukleotide für alle Verwendungen, wie sie oben definiert sind, äquivalent und wirksam sind, denn es müssen unterschiedliche Kompartimente des Immunsystems stimuliert werden, um die gewünschte

Aktivität zu erhalten: Adjuvans-Aktivität, Antiallergie-Aktivität oder Antitumor-Aktivität.

**[0019]** Darüber hinaus sind die Immunmechanismen der Tumoralbstoßung schlecht bekannt und die Angaben über die Stimulation der Kompartimente des Immunsystems in vitro, wie sie oben definiert sind, erlauben keine Vorhersage über die Antitumorwirksamkeit eines gegebenen Oligonukleotids und es ist somit noch erforderlich, ihre Antitumoraktivität in vivo zu testen.

**[0020]** Darüber hinaus wurde die Toxizität von Oligodesoxynukleotiden, die ein CG-Motiv enthalten, zur Zeit ihrer Verwendung auf systemischem Weg (IV und EP) und auch unter Berücksichtigung der therapeutischen Anwendungen (Anmeldung EP 855 184) beschrieben.

**[0021]** Folglich ermöglichen die immunstimulierenden Oligonukleotide des Standes der Technik, die ein CG-Motiv umfassen (hexameres Palindrommotiv, Motiv 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' oder oktales Motiv), die variable und zufällige Antitumoraktivitäten haben und toxisch sind, keine Definition eines Komplexes immunstimulierender, nicht toxischer, wirksamer Sequenzen für eine Antitumorverwendung.

**[0022]** Die Erfinder haben in überraschender Weise gezeigt, dass bestimmte Basenpaare in 3' des Motivs 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' in essentieller Weise an einer optimalen Antitumoraktivität beteiligt sind.

**[0023]** In der Folge haben sich die Erfinder das Ziel gesetzt, eine Kombination von immunstimulierenden Oligonukleotidsequenzen bereitzustellen, die den Anforderungen der Praxis besser genügen, indem sie:

- eine optimale Antitumoraktivität besitzen,
- nicht toxisch sind und
- an eine Antitumorverwendung beim Menschen oder Tier angepasst sind.

**[0024]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden, die mindestens ein oktameres Motiv des Typs AACGTTAT umfassen, zur Herstellung eines Medikaments mit Antitumorwirkung.

**[0025]** Im Sinne der vorliegenden Verwendung versteht man unter Oligonukleotid ein Oligodesoxynukleotid.

**[0026]** Nach einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann wenigstens eine der Basen des oktameren Motivs, das oben beschrieben wurde, modifiziert sein, insbesondere kann wenigstens eins der Cytosine durch ein 5-Bromcytosin ersetzt sein.

**[0027]** In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das stabilisierte Oligonukleotid aus der Gruppe bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO : 9, 10, 16, 18, 19, 21, 31, 33, 34, 35 und 47 ausgewählt.

**[0028]** Erfindungsgemäß sind die stabilisierten Oligonukleotide insbesondere aus der Gruppe bestehend aus Phosphorthioat-, Phosphordithioat-, gemischten Phosphodiesterphosphorothioat-Oligonukleotiden, Methylphosphonat-Oligonukleotiden oder Oligonukleotiden, bei denen wenigstens ein Ende stabilisiert wurde, ausgewählt (Crooke R. M. (1991), Anti-Cancer Drug Design, 6, S. 609–46). Vorzugsweise sind die stabilisierten Oligonukleotide gemäß der vorliegenden Erfindung Phosphorthioate.

**[0029]** Erfindungsgemäß können die stabilisierten Oligonukleotide in Form eines Einzelstrangs oder eines Doppelstrangs verwendet werden.

**[0030]** Vorzugsweise können die stabilisierten Oligonukleotide eine beliebige Länge über 8 Basen oder 8 Basenpaare und vorzugsweise über 20 Basen oder 20 Basenpaare haben. In bevorzugter Weise umfassen die genannten Oligonukleotide zwischen 20 Nukleotiden und 100 Nukleotiden.

**[0031]** Erfindungsgemäß können die Oligonukleotide mehrere oktamere Motive, wie sie oben definiert wurden, benachbart oder nicht, umfassen; sie können auch andere biologisch aktive Sequenzen, wie zum Beispiel Antisense-Sequenzen, umfassen. Die oktameren Sequenzen können selbst in Antisense-Sequenzen eingeschlossen sein.

**[0032]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden, wie sie oben definiert wurden, zur Herstellung von Medikamenten, die zur Behandlung von Krebs bei Men-

schen bestimmt sind, die nach ihrer Natur und ihrem Grad zur Anaplasie gehören, insbesondere Krebs des zentralen Nervensystems und des peripheren Nervensystems, insbesondere Astrocytome, Glioblastome, Medulloblastome, Neuroblastome, Melanome und Carcinome.

**[0033]** Die stabilisierten Oligonukleotide können vorteilhafterweise durch kovalente, ionische oder schwache Bindungen an ein Molekül gekoppelt sein, das geeignet ist, die Tumoraaffinität zu erhöhen, zum Beispiel ein für Tumorgewebe spezifischer Antikörper.

**[0034]** Die stabilisierten Oligonukleotide werden vorzugsweise auf intratumoralem Weg verabreicht, können aber auch auf jedem anderen Weg verabreicht werden, gegebenenfalls auf mehreren Wegen verabreicht werden, insbesondere auf intravenösem Weg, intraperitonealem Weg, topischem Weg, transdermalem Weg, subkutanem Weg, intraarteriellem Weg, pulmonalem Weg, nasopharyngealem Weg oder oralem Weg, und zwar in wässriger oder öliger Lösung oder Suspension, als Pulver oder in jeder pharmazeutisch annehmbaren Form.

**[0035]** Sie können einmal oder mehrmals oder unter kontinuierlicher Freisetzung, insbesondere mithilfe von osmotischen Mikropumpen oder in Kombination mit jedem physikalischen oder chemischen Mittel, insbesondere Einkapselungsmitteln als kolloidale Dispersionssysteme oder Polymere, um so eine therapeutisch wirksame Dosis an der Tumorstelle zu erhalten, verabreicht werden.

**[0036]** Die wirksamen Dosen werden als Funktion des Alters, des Gesundheitszustands, des Gewichts des Patienten und des zu behandelnden Krebstyps bestimmt werden. Typischerweise sind die wirksamen Dosen für den Menschen so, dass man im Fall einer intratumoralen Injektion eine Oligonukleotiddosis von 10 bis 1000 µg/g Tumor, mindestens in einem Teil des Tumors erhält.

**[0037]** Erfindungsgemäß kann die Verwendung der Oligonukleotide mit anderen Therapien, insbesondere Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie, Immuntherapie und differenzierenden Therapien, kombiniert werden.

**[0038]** Ebenfalls gemäß der Erfindung werden die genannten Oligonukleotide mit Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel den Makrophagen, den Lymphozyten oder Vorläuferzellen des Antigens, Adjuvantien der Immunität, Cytokinen, Antitumorantikörpern, Tumorextrakten, Tumorantigenen oder normalen Tumorzellen, die bestrahlt oder genetisch modifiziert sind, kombiniert werden.

**[0039]** Außer den vorstehenden Ausführungsformen umfasst die Erfindung auch andere Ausführungsformen, die aus der folgenden Beschreibung hervorgehen, welche sich auf Ausführungsformen der Verwendung, des Gegenstands der Erfindung sowie auf die beigefügten Figuren bezieht; in diesen veranschaulicht/veranschaulichen:

**[0040]** [Fig. 1](#) den Effekt der Stabilisierung eines Oligonukleotids (SEQ ID NO:9 5'-TGA  
CTGTGAA  
CGTTATA  
GATGA-3') durch eine Bindung des folgenden Typs: Phosphorthioat (PT), Phosphodiester (PDE), Methylphosphonat (MP); Phosphodiester, stabilisiert in 3' durch eine Didesoxycytosin-Base (3'), oder eine Mischung: Phosphodiester mit den 3 ersten Bindungen in 5' und den drei letzten Bindungen in 3' vom Typ Phosphorthioat (Mischung), und zwar auf die Antitumor-Aktivität in einem Modell mit subkutanen Gliatumoren. Am Tag 2 nach Injektion von Tumorzellen erhalten die Tiergruppen auf subkutanem Weg an der Tumorstelle Natriumchlorid (Vergleich NaCl, n=9) oder 50 µg der Oligonukleotide PT (n=9), PDE (n=8), MP (n=9), 3' (n=7) und gemischt (n=9). Das Volumen des Tumors wird am Tag 10 beurteilt. Die Resultate werden als Mittelwert ± S.A. ausgedrückt;

**[0041]** Die [Fig. 2](#) bis [Fig. 4](#) erläutern den Effekt der Sequenzen 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-3' auf die Modulation der Antitumor-Aktivität in einem Modell für subkutane Gliatumore. Am Tag 2 nach Injektion der Tumorzellen erhalten die Tiergruppen (n=6) auf subkutanem Weg auf der Ebene der Tumorstelle Natriumchlorid (Vergleich NaCl) oder 50 µg Oligonukleotide (SEQ ID NO : 2-13). Das Tumorvolumen wird am Tag 8 ([Fig. 2](#) bis [Fig. 4](#)) oder am Tag 10 ([Fig. 11](#)) beurteilt. Die Resultate werden als Mittelwerte + S.A. ausgedrückt:

**[0042]** [Fig. 2](#) stellt den Effekt der Sequenzen der Oligonukleotide auf die Antitumorwirksamkeit dar.

**[0043]** [Fig. 3](#) stellt den Effekt der Sequenz des hexameren Motivs 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' und der angrenzenden Sequenzen auf die Antitumorwirksamkeit der Oligonukleotide dar.

[0044] [Fig. 4](#) stellt den Effekt der zwei Basen ( $X_1X_2$ ), die an die Sequenz 3' des hexameren Motivs 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' angrenzen, auf die Antitumorwirksamkeit der Oligonukleotide dar.

[0045] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung, ohne sie auf diese besonderen Durchführungsformen zu beschränken.

[0046] Beispiel 12: Effekt der Stabilisierung eines Oligonukleotids (SEQ ID NO:9 5'-TGACTGTGAAACGTTA-TAGATGA-3') auf die Antitumorwirkung in einem Modell subkutaner Gliatumore.

1. Verfahren:

[0047] Die Gliomzellen CNS1, die in vitro kultiviert wurden, werden auf subkutanem Weg gesunden Lewis-Ratten mit  $2 \times 10^6$  Zellen in die rechte Flanke injiziert (Kruse C. A. et al (1994), J. Neurooncol. 22, S. 191–200).

[0048] Am Tag 2 nach Injektion der Tumorzellen werden 50 µg der Oligonukleotide, die die unterschiedlichen chemischen Bindungen besitzen, auf der Ebene der Tumorstelle injiziert und das Tumorvolumen wird am Tag 10 gemessen (Gruppen, die mit einem Bindungsoligonukleotid behandelt wurden: Phosphorthioat (PT, n=9), Phosphodiester (PDE, n=8), Methylphosphonat (MP, n=9); Phosphodiester, stabilisiert in 3' durch eine Didesoxycytosin-Base (Gruppe 3', n=7) oder Mischung: Phosphodiester mit den drei ersten Bindungen in 5' und den drei letzten Bindungen in 3' vom Phosphorthioattyp (Mischgruppe, n=9)). Die Vergleichsgruppe erhält 100 µl Natriumchlorid (NaCl, n=9).

2. Resultate:

[0049] Sie sind in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0050] In diesem Modell sind die wirksamsten ODN Oligonukleotide des Phosphorthioattyps, die in 3' stabilisiert sind, oder gemischte, und zwar mit einer Verringerung des Tumorvolumens von jeweils 50%, 53% und 34%, bezogen auf das Volumen der Vergleiche.

[0051] Beispiel 13: Effekt der Sequenzen 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin- $X_1X_2$ -3' auf die Modulierung der Antitumoraktivität

1. Verfahren:

[0052] In vitro kultivierte CNS1-Gliomzellen werden auf subkutanem Weg gesunden Lewis-Ratten mit  $2 \times 10^6$  Zellen in die rechte Flanke injiziert (Kruse C. A. et al. (1994), J. Neurooncol. 22, S. 191–200).

[0053] Am Tag 2 nach der Injektion werden den Tumorzellen 50 µg verschiedener Oligonukleotide (SEQ ID NO: 2 bis 13) auf der Ebene der Tumorstelle injiziert und das Tumorvolumen wird am Tag 10 gemessen ([Fig. 2](#) bis [Fig. 4](#)).

2.2 Effekt der Sequenz des hexameren Motivs 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' und der benachbarten Sequenzen auf die Antitumor-Wirksamkeit der Oligonukleotide.

[0054] Die Resultate sind in [Fig. 3](#) dargestellt.

[0055] Sie zeigen, dass Oligonukleotide, die ein unterschiedliches hexameres Motiv besitzen, GACGTC (An2, SEQ ID NO: 8 5'-TGCCAGTGACGTCATGTGAC-3') oder AACGTT (An21, SEQ ID NO: 10 5'-TGC-CAGTAACGTTATGTGAC-3') und angrenzende Sequenzen besitzen, dieselben Antitumor-Wirksamkeit haben.

2.3 Effekt der 2 Basen ( $X_1, X_2$ ), die an die Sequenz 3' des hexameren Motivs 5'-Purin-Purin-CG-Pyrimidin-Pyrimidin-3' angrenzen, auf die Antitumor-Wirksamkeit.

[0056] Die Resultate sind in [Fig. 4](#) angegeben.

[0057] Sie zeigen, dass die 2 Basen, die an die Sequenz 3' des hexameren Motivs angrenzen, und nur sie allein die Wirksamkeit der Oligonukleotide modulieren, denn 2 Oligonukleotide, die über die gesamte Sequenz

außer dieser 2 Nukleotide identisch sind, haben unterschiedliche Wirksamkeiten haben und zwar in der Größenordnung von denen, die vorher mit den Oligonukleotiden von Beispiel 2.1 beobachtet wurden. So ist das Oligonukleotid An 14 (SEQ ID NO: 3'5'-TGACTGTGAAACGTTCCAGATGA-3') weniger wirksam als das Oligonukleotid An 15 (SEQ ID NO: 9'5'-TGACTGTGAAACGTTATAGATGA-3'). Die Nukleotide AT in 3' des hexameren Motivs An 2 ([Fig. 2](#)) und An 15 ([Fig. 4](#)) ermöglichen eine Erhöhung der Antitumor-Wirksamkeit, während die Nukleotide CC (An 14, [Fig. 4](#)) und CG (PT1, [Fig. 2](#)) weniger deutliche Antitumor-Wirkungen haben.

## SEQUENZPROTOKOLL

```

<110> ASSISTANCE PUBLIQUE- HOPITAUX DE PARIS
      UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE- PARIS VI
      INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M
      CARPENTIER, Antoine

<120> VERWENDUNG VON STABILISIERTEN OLIGONUKLEOTIDEN ZUR
      HERSTELLUNG EINES MEDIKAMENTS MIT ANTITUMORWIRKUNG

<130> 10208EXT

<140>
<141>

<160> 48

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 1
tgactgtgaa ggccagagat ga                                22

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 2
tgactgtgaa cgtcccgagat ga                                22

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 3
tgactgtgaa cgtcccgagat ga                                22

```

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 4  
**tgc**ccagtaac gttacgtgac 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 5  
**tgc**ccagtaac gtttaggtgac 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 6  
**tgc**ccagtaac gtttgtgtgac 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 7  
**tgc**ccagtaac gttcccggtgac 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 8  
 tgccagtgac gtcatgtgac 20

<210> 9  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 9  
 tgactgtgaa cgttatagat ga 22

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 10  
 tgccagtaac gttatgtgac 20

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 11  
 tgccagtaac gttaaatgtgac 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 12  
 tgccagtaac gttctgtgac 20

<210> 13  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 13 20  
tgccagtaac gttttgtgac

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 14 20  
gtatgacgac gtcatcttagc

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 15 20  
tactgcagac gtcattatgc

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 16 20  
ataaacgttar gtaacgttar

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

```

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 17
atgacgtcat gtgacgtcat                                20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 18
atgacgtcat gtaacgttat                                20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 19
tgaacgttat tgaacgttat                                20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 20
tggacgtcat tggacgtcat                                20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

```

<400> 21		
tggacgtcat tgaacgttat		20
<210> 22		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligodesoxynukleotid		
<400> 22		
aggacgtcaa tgaacgttaa		20
<210> 23		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligodesoxynukleotid		
<400> 23		
agaacgttaa tgaacgttaa		20
<210> 24		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligodesoxynukleotid		
<400> 24		
aggacgtcaa tggacgtcaa		20
<210> 25		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligodesoxynukleotid		
<400> 25		
aggacgtctt gtaacgtttt		20
<210> 26		
<211> 20		

<212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 26  
 agaacgtttt gtaaacgtttt 20

<210> 27  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 27  
 aggacgtctt gtgacgtttt 19

<210> 28  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 28  
 ttgacgtcct ttaaacgttct 20

<210> 29  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 29  
 ttaaacgttct ttaaacgttct 20

<210> 30  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Oligodesoxynukleotid

<400> 30	
<code>ttgacgtccct ttgacgtccct</code>	20
<210> 31	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:	
Oligodesoxynukleotid	
<400> 31	
<code>ttaaacgttat aacgttataaa cgttatc</code>	26
<210> 32	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:	
Oligodesoxynukleotid	
<400> 32	
<code>tagacgtcat gacgtcatga cgtcat</code>	26
<210> 33	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:	
Oligodesoxynukleotid	
<400> 33	
<code>ttaaacgttat aacgttataaa cgtcata</code>	26
<210> 34	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:	
Oligodesoxynukleotid	
<400> 34	
<code>ttaaacgttat gacgtcatga cgtcat</code>	26

<210> 35  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 35  
tagacgtcat aacgttacaa cgttat

26

<210> 36  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 36  
taaacgttaa aacgtaaaaa cgttaa

26

<210> 37  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 37  
tagacgtcaa gacgtcaaga cgccaa

26

<210> 38  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligodesoxynukleotid

<400> 38  
taaacgttaa aacgttaaga cgtcaa

26

<210> 39  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

```

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 39
      taaaacgttcaa gacgtcaaga cgtcaa                                         26

<210> 40
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 40
      tagacgttcaa aacgtttaaaa cgttaa                                         26

<210> 41
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 41
      taaaacgttct aacgttctaa cgttct                                         26

<210> 42
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 42
      tagacgttct gacgttctga cgttct                                         26

<210> 43
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 43
      taaaacgttct aacgttctga cgttct                                         26

```

```

<210> 44
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 44
taaacgtttt aaacgtttta aacgtttt                                28

<210> 45
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 45
tagacgtctt agacgtctta gacgtctt                                28

<210> 46
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 46
taaacgtttt aaacgtttta gacgtctt                                28

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 47
tcaacgttat aacgttataaa cgttat                                26

<210> 48
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
      Oligodesoxynukleotid

<400> 48
tcgacgtcat gacgtcatga cgtcat                                26

```

**Patentansprüche**

1. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden, die mindestens ein octameres Motiv des Typs AACGT-TAT umfassen, zur Herstellung eines Medikaments mit Antitumorwirkung.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide aus der Gruppe bestehend aus den Sequenzen SEQ ID No. 9, 10, 16, 18, 19, 21, 31, 33, 34, 35 und 47 ausgewählt sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Cytosin des octameren Motivs durch ein modifiziertes Cytosin ersetzt ist.
4. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die stabilisierten Oligonukleotide aus der Gruppe bestehend aus Phosphorthioaten, Phosphordithioaten, gemischten Phosphodiester-Phosphorthioat-Oligonukleotiden, Methylphos-phonaten und den Oligonukleotiden, bei denen ein Ende stabilisiert wurde, ausgewählt sind.
5. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide in Form eines Einzelstrangs oder eines Doppelstrangs vorliegen.
6. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide mindestens acht Nukleotide und vorzugsweise zwischen 20 Nukleotiden und 100 Nukleotiden umfassen.
7. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide durch kovalente, ionische oder schwache Bindungen an ein Molekül gekoppelt sind, das geeignet ist, die Tumoraaffinität zu erhöhen.
8. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung eines Medikaments, das zur Behandlung von Krebsarten bei Menschen bestimmt ist, die nach ihrer Natur und ihrem Grad zur Anaplasie gehören.
9. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Krebs aus der Gruppe bestehend aus Krebs des zentralen Nervensystems und des peripheren Nervensystems ausgewählt ist.
10. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Krebs aus der Gruppe, bestehend aus Astrocytomen, Glioplastomen, Meduloplastomen, Neuroplastomen, Melanomen und Karzinomen ausgewählt ist.
11. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament auf intratumoralem Weg verabreicht wird.
12. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament derart verabreicht wird, dass eine Dosis von 10 bis 1000 µg/g Gramm Tumor, mindestens in einem Teil der Tumormasse, erhalten wird.
13. Verwendung von stabilisierten Oligonukleotiden nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament auf einem Weg verabreicht wird, der aus der Gruppe bestehend aus intravenösem Weg, intraperitonealem Weg, topischem Weg, transdermalem Weg, subkutanem Weg, intraarteriellem Weg, pulmonalem Weg, nasopharyngealem Weg oder oralem Weg ausgewählt wird.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die stabilisierten Oligonukleotide mit einem physikalischen oder chemischen Mittel assoziiert sind, das den Erhalt einer wirksamen Dosis an der Tumorstelle erleichtert.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide in jeder pharmazeutisch annehmbaren Form verabreicht werden.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide mit Zellen des Immunsystems, Adjuvantien der Immunität, Cytokinen, Antitumorantikörpern, tumoralen Extrakt-

ten, tumoralen Antigenen oder normalen Tumorzellen, die bestrahlt oder genetisch modifiziert sind, assoziiert sind.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die stabilisierten Oligonukleotide mehrere octamere Motive des Typs AACGTTAT, benachbart oder nicht, umfassen.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die stabilisierten Oligonukleotide zwei oder drei octamere Motive des Typs AACGTTAT umfassen.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

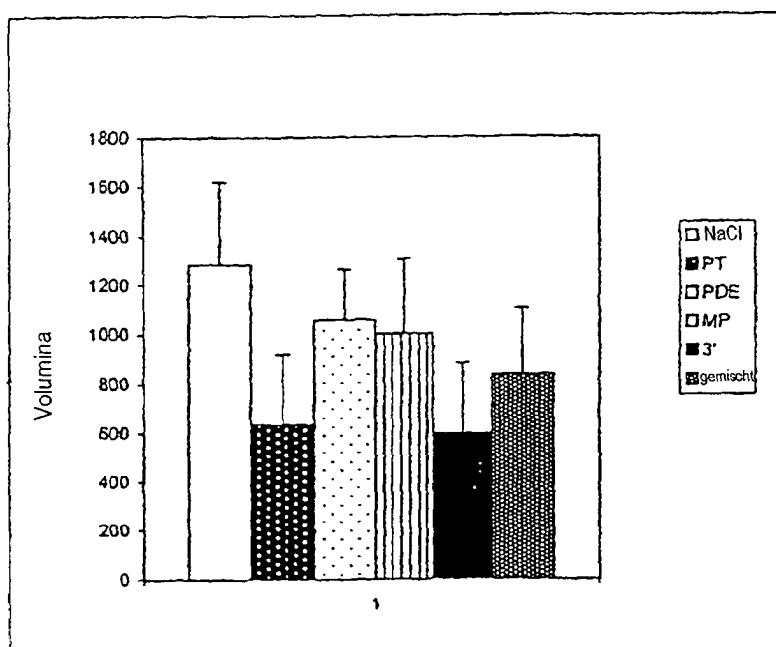
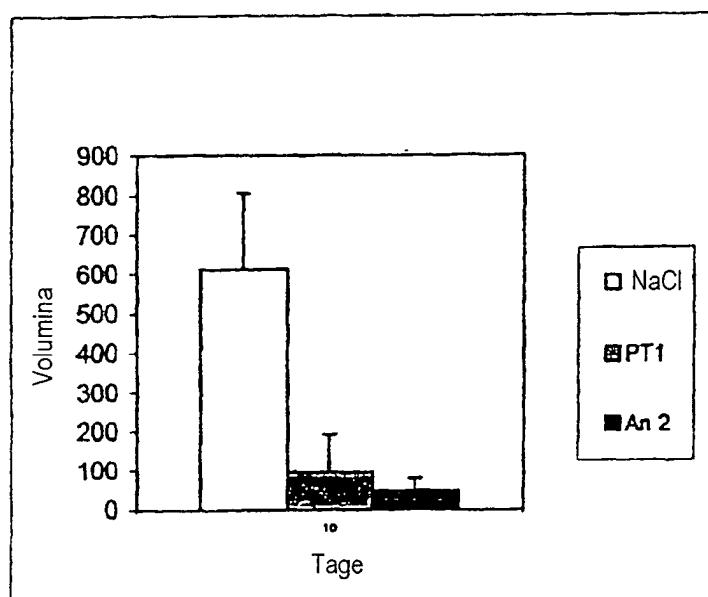
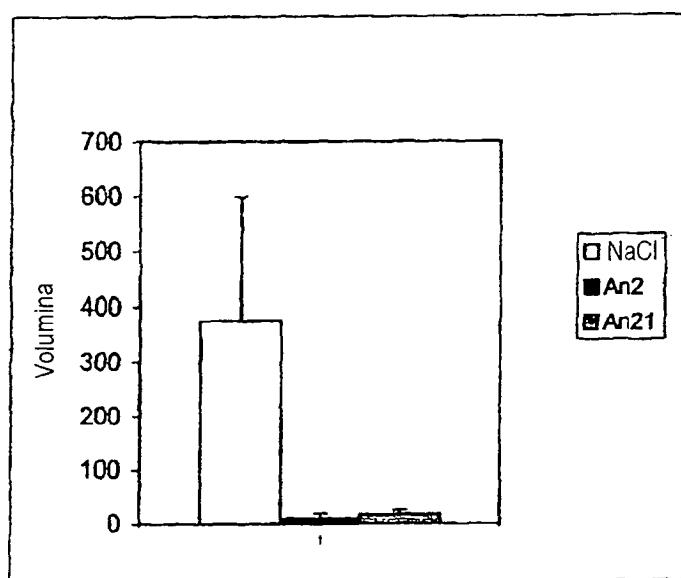


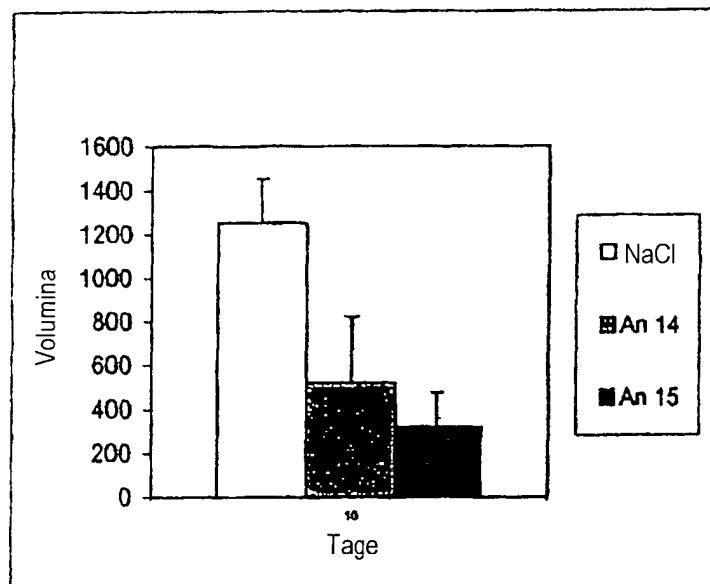
Figure 1



FIGUR\_2



FIGUR\_3



FIGUR 4