

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1044/2005** (51) Int. Cl.⁸: **A61K 31/495** (2006.01),
(22) Anmeldetag: **21.06.2005** **A61P 35/00** (2006.01)
(43) Veröffentlicht am: **15.01.2007**

(73) Patentanmelder:

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN
A-1090 WIEN (AT)

(72) Erfinder:

HUBMANN RAINER DR.
WIEN (AT)
SIEGHART WOLFGANG DR.
WIEN (AT)

(54) **BEHANDLUNG VON TUMOREN**

(57) Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von Notch2-Inhibitoren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren, die durch Ligand- unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiert sind.

AT 502 055 A1 2007-01-15

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von Notch2-Inhibitoren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren, die durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiert sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft die Behandlung von Tumoren.

Die chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) ist die häufigste Leukämieform in der westlichen Hemisphäre. Die Leukozytenzahl in Knochenmark, Blut, Lymphgewebe und anderen Organen ist deutlich erhöht, der in ihnen enthaltene Lymphocytenanteil kann bis zu 95% betragen. Betroffen sind meist ältere Menschen ab dem 50. Lebensjahr. Die Erkrankung ist durch eine graduelle Akkumulation eines CD5/CD19/CD23 positiven (reifen) B-Zell-Klon gekennzeichnet, dem ein Defekt im programmierten Zelltod (Apoptose) zugrundeliegt. Der Ursprung der B-CLL dürften auto-reaktive, CD5 positive B1-B-Zellen sein, die während der Embryogenese in der fötalen Leber gebildet werden, bestimmte Areale in sekundären lymphoiden Organen und im Peritoneum besiedeln, und durch ihre Selbsterneuerungskapazität gekennzeichnet sind. B1-B-Zellen spielen in der frühen Ontogenese eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität, werden aber sukzessive durch T-Helferzell-abhängige B2-B-Gedächtniszellen ersetzt. Die Homöostase dieser Zellen wird durch den B-Zell-Rezeptor reguliert (BCR), der eine gewisse Affinität zu bestimmten Selbstantigenen zeigt. Verlässt eine CD5+ B1 B-Zelle ihr Kompartiment, wird über die Interaktion mit diesen Selbstantigenen der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) über das Protein TR3 (NR4A1) ausgelöst, wodurch eine unkontrollierte Expansion dieser autoreaktiven B-Zellen verhindert wird.

Gliotoxin ([3R-(3 α , 5a β , 6 β , 10a α)]-2,3,5a,6-Tetrahydro-6-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methyl-10H-3,10a-epi-dithiopyrazino [1,2-a]indol-1,4-dion) ist ein sekundärer Pilzmetabolit, der von *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* und *A. terreus* gebildet wird. Diese Substanz wird zu den Epipolythiodioxopiperazinen gezählt, die höchstwahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Mortalität während systemischen Aspergillosen spielen (LD₅₀ in Mäusen und Ratten: 25-50mg/kg; Taylor et al., Microb. Toxins 7:337; 1971).

Die Wirkungen von Gliotoxin sind vielseitig und beinhalten die Inhibierung von viralen reversen Transkriptasen, die Bindung an Alkoholdehydrogenasen, die Inhibierung von Transkriptionsfaktor NF- κ B, die Modulierung des Kalziumeinflusses in Zellen und toxische Effekte auf Erythrocyten (Gardiner et al., Microbiology 151: 1021-1032, 2005). Die molekularen Wirkungen schließen die

katalytische Öffnung und Schließung von Cysteinbrücken, die Bindung an Cystein- und Thiolreste und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies über einen Redoxkreislauf ein. In Kulturen von tierischen Zellen zeigt Gliotoxin bei niedrigen Konzentrationen apoptotische Wirkung. Bei Konzentrationen über 10µM ändert sich die Wirkung hin zur Nekrose mit kompletter Nekrose der Zellkulturen ab Konzentrationen von 50 µM. Die einstmals in Betracht gezogene Wirkung als Proteosominhibitor wird nicht mehr vertreten, da hierfür sehr hohe notwendige Gliotoxin Konzentration eine unspezifische Wirkung nahe legen.

In niedrigen Dosen zeigt Gliotoxin eine potente Immunsuppressivität. In Mäusen führt eine einmalige Verabreichung von 100µg Gliotoxin zu einem kompletten Verlust von B1 B-Zellen (LPS responder), während die T-Zell-Funktionen nur kurzzeitig beeinflusst werden. Im Mausmodell sind die Nebenwirkungen einer Gliotoxin-Behandlung die Apoptose von reifen Makrophagen, B-Zellen der Milz (Splenozyten), Thymozyten, und von Zellen der mesenterialen Lymphknoten (*Sutton et al.*, Infect. and Immun. 62: 1192; 1994).

Hämatopoetische Vorläuferzellen werden von diesen Nebenwirkungen nicht betroffen, wodurch sich möglicherweise die relativ schnelle Regeneration des Immunsystems nach einer einmaligen Gliotoxin-Behandlung erklären lässt (*Müllbacher et al.*, PNAS 84: 3822; 1987).

Das Pilzgift Gliotoxin dürfte weiters bei systemischen Aspergillus-Infektionen gezielt die angeborene Immunität durch selektive Inhibierung der Splenozyten umgehen.

Gliotoxin ist ein bekannter Inhibitor des Transkriptionsfaktors NfκB und der Farnesyl-Transferase (*Hurne et al.*, JBC 275: 25202; 2000). Als möglicher Wirkmechanismus wurde eine reversible Reaktion von Gliotoxin mit exponierten Thiol-Gruppen von Cysteinen vorgeschlagen, wodurch kurzzeitig Schwefelbrücken in diesen Proteinen entstehen.

Gliotoxin wurde bereits zur Verwendung als Immunsuppressivum (*Sutton et al.*, Infect Immun 62(4): 1192; 1994), als antifibrotisches Mittel (*Orr et al.*, Hepatology 40(1): 232; 2004), und als Anti-Tumor Mittel gegen Brustkrebs (*Vigushin et al.*, Med Oncol 21(1): 21; 2004) vorgeschlagen.

In der EP 163475 werden Gliotoxin-ähnliche Substanzen und deren Anwendung zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach

Transplantationen beschrieben.

In der JP 61277617 wird Gliotoxin als Inhibitor der Blutplättchen-Aggregation beansprucht.

In der WO 2004/19921 und in Kweon et al. (J Hepatol 39(1): 38; 2003) wird die Verwendung von Gliotoxin als Apoptose-auslösendes Agens für hepatische Sternzellen bei einer Leberfibrose beschrieben.

In der JP 6220065 werden Gliotoxin-Derivate als Zellwachstums-Inhibitoren genannt.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, effiziente und trotzdem gut verträgliche Tumor-Behandlungsmittel zur Verfügung zu stellen, die hochspezifisch in den Prozess der Tumorbildung eingreifen. Durch eine erhöhte Spezifität kann eine bessere Verfügbarkeit erzielt werden bzw. auch gegen bestimmte Chemotherapie-resistente Tumore eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung sieht die Verwendung von Notch2-Inhibitoren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren, die durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente gekennzeichnet sind, vor. Der Ausdruck „Tumor, durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiert“, wird auch als „Notch2-assoziiierter Tumor“ bezeichnet. Überraschender Weise konnte ein Mechanismus der Tumorgenese in abnormalen Notch2-Varianten entdeckt werden, wobei in den betroffenen Neoplasien durch spezifische Inhibitoren des tumorinduzierenden Faktors, i.e. abnormes Notch2, die Apoptose induzieren lässt. Dadurch wird eine gezielte Tumorbehandlung ermöglicht. Im speziellen wird die Funktion des Notch2 Proteins, vorzugsweise der intrazellulären Komponente des Notch2 Proteins (N2^{IC}) inhibiert. Die Wirkung der Notch2-Inhibitoren der vorliegenden Erfindung äußert sich in einer apoptotischen Wirkung, selektiv auf Notch2-assoziierte kanzerogene Zellen.

Notch-Rezeptoren wirken als intrazelluläre Weichensteller in binären Differenzierungsprozessen. Abhängig vom zellulären Kontext modulieren Notch-Signale die Apoptose, Proliferation, sowie die Differenzierung von Zellen. Die Milz wird bevorzugt von Notch2-exprimierenden B1-B-Zellen und den nahe verwandten Notch2-exprimierenden Marginalzonen (MZ) B2-B-Zellen besiedelt (siehe Fig. 1).

In der B-CLL bewirkt eine Deregulation des Notch2-Onkogens die Blockade des AICD („activation induced cell death“), der

normalerweise die Homöostase dieser autoreaktiven B1 B-Zellen gewährleistet. Der AICD wird über das Protein TR3 (NR4A1) gesteuert, ein Faktor, der zu den „immediate early genes“ zählt, die durch mitogene Signale induziert werden. Ein apoptotisches B-Zell-Rezeptor-Signal führt zur Expression von TR3, welches in den Mitochondrien durch Interaktion mit BCL2 zur Induktion der Cytochrom-C-abhängigen Apoptose führt (Lin et al., Cell 116: 527; 2004). Aktivierte Notch-Rezeptoren binden an NR4A1 im Zellkern und blockieren somit dessen Funktion im Zytosol (Jehn et al., JI 162: 635; 1999).

Mit Hilfe der reversen Genetik ist es gelungen, Notch2 als jenen Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der für die Überexpression von CD23 bei der B-CLL verantwortlich ist (Hubmann et al., BLOOD 99: 3742; 2002 und Schwarzmeier et al., Leukemia & Lymphoma 46: 157; 2005). Notch2 ist ein Transmembranrezeptor, der über definierte Liganden (Jagged/Delta) auf benachbarten Zellen aktiviert wird. Diese Aktivierung bewirkt eine γ -Sekretase vermittelte Abspaltung des intrazellulären Teils von Notch2 ($N2^{IC}$), der in den Zellkern transloziert und dort die Expression von CBF1-regulierten Zielgenen wie Hes, p21, CyclinD1, Erbb2, Nfkb2 und CD23 steuert. Zusammen mit dem Coaktivator MAML konvertiert $N2^{IC}$ das Repressorprotein CSL in einen Aktivator der Transkription.

Periphere B-CLL-Zellen besitzen eine erhöhte Notch2-Aktivität, die eine Deregulation dieses Signaltransduktionsweges vermuten lässt. Es kommt hier durch Gendefekte zur Expression von trunkierten, Ligand unabhängigen Notch2-Formen, die in Modellsystemen als Tumor initiierende Onkogene identifiziert worden sind (Nickoloff et al., Oncogene 22: 6598; 2003 und Radke et al., Nat. Rev. Cancer 3: 756; 2003). Abhängig vom zellulären Kontext führt eine Deregulation von Notch2-Onkogenen zu einer Immortalisation und einem Differenzierungsarrest von Zellen. Die onkogene Funktion von Notch-Rezeptoren ist in vielen Fällen auch ein Schutz vor diversen pro-apoptotischen Signalen (Radtke et al., Nat. Rev. in Cancer 3: 756; 2003).

Die Überexpression eines konstitutiv aktiven Notch2-Proteins führt in B-Zell Vorläufern zur selektiven Entwicklung von B1 B-Zellen und in der Milz zur selektiven Entwicklung von Marginalzonen (MZ) B2 B-Zellen. Die Deregulation von Notch2 spielt auch eine zentrale Rolle in der B-CLL Pathogenese, indem sie den

malignen Klon immortalisiert und vor der peripheren negativen Selektion schützt (Schwarzmeier et al. Leukemia & Lymphoma 46: 157; 2005). Im Speziellen blockt N2^{IC} die apoptotische Funktion des Steroidrezeptors NR4A1, der zu den unmittelbaren nahen Genen zählt, die durch apoptotische BCR-Signale induziert werden (AICD).

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass die Aktivität von Notch2 nicht nur mit der Viabilität von B-CLL-Zellen korreliert, sondern auch dass Notch2 B-Zellen vor der B-Zell Rezeptor vermittelten Apoptose schützt (AICD), die die unkontrollierte Expansion von B1-B-Zellen verhindert (B1-B-Zellen erhalten ihr physiologisches Notch2-Signal in bestimmten Kompartimenten). Weiters ergaben Untersuchungen, dass B-CLL-Zellen eine Ligand-unabhängige Form von Notch2 exprimieren (s. Beispiel 3).

Diese Ligand-unabhängigen Notch2-Fragmente (auch aberrante Notch2-Fragmente oder Signal- bzw. Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente genannt) sind dadurch charakterisiert, dass sie ein stromabwärts gelegenes Fragment von Notch2 darstellen, das ab der S3-Stelle (zwei Aminosäuren stromabwärts von S3 befindet sich ein (perfektes Startcodon) kodiert wird und dem dadurch die Transmembrandomäne fehlt (s. Fig. 7A).

Obgleich Acetylgliotoxin, Gliotoxin und aromatische Gliotoxin-Derivate im Zusammenhang mit Behandlungsmethoden von Tumoren genannt worden sind (EP 926 242 A1), wobei angegeben wurde, dass Acetylgliotoxin gegen menschliche Leukämie-Zellen (Zelllinien K 562, U 937: Dainippon Seiyaku), menschliche Karzinoma-Zellen des Darmes (Zelllinien HCT-15, HCT-116, SW946: Dainippon Seiyaku), menschliche Lungenkrebszellen (Zelllinie LX-1: Biseibutsu Kagaku Kenyu-sho), Maus-Leukämiezellen (Zelllinie P 388: Dainippon Seiyaku) und Maus-Karzinoma-Zellen des Darmes (Zelllinien colon-26: Gan Kenkyu-kai, Gan Kenkyu-sho) wirksam war, konnte die apoptotische Wirkung von Gliotoxin und seinen Derivaten bei anderen Krebs Zelllinien, darunter Leukämien, nicht nachgewiesen werden (siehe u.a. Fig. 6 und 8, unten), womit eine generelle Wirksamkeit von Gliotoxin als Anti-Tumormittel nicht gegeben ist. Die antikanzerogene Wirkung gemäß der vorliegenden Erfindung war eine überraschende Ausnahme, die der Regel entgegensteht; beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der Notch2-Inhibitor Gliotoxin nicht generell gegen Leukämien bzw. gegen

solide Tumore wirkt.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegende Erfindung ist eine Verwendung dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor Gliotoxin ist. Gliotoxin ist ein bekanntes Pilzgift und wird u.a. auch als Wirkstoff für diverse Anwendungen verwendet. Gliotoxin kann mit einer ganzen Reihe verschiedener Verfahren hergestellt werden, die hinreichend im Stand der Technik bekannt sind. Ein Beispiel hierfür wird in JP 7227293 offenbart, worin eine Methode zur Gliotoxin-Produktion durch Viren beschrieben wird.

Bevorzugt werden die Notch2-Inhibitoren bzw. Gliotoxin in einer pharmazeutisch verabreichbaren Form verabreicht, die zusätzlich diverse Salze als Stabilisations-Puffer beinhalten können bzw. in denen der Inhibitor beispielsweise als Ester, der in vivo gespalten werden kann, zur besseren Aufnahme/Pharmakodynamik vorliegt. Als Adapterprotein könnte Notch2 über Gliotoxin in seiner natürlichen Funktion als Verbindungsprotein in dem von Notch2-regulierten Transkriptionsfaktorkomplex beeinflusst werden.

Eine weitere Verwendung der vorliegenden Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor ein Gliotoxin-Derivat ist, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acetylgliotoxin, 6-C₁₋₃-Alkoxygliotoxin, 6-C₂₋₃-Acyloxy-Gliotoxin, 6-dihydro-Gliotoxin, 6-dihydroxy-Gliotoxin 6-[(Methoxycarbonyl)methoxy]-Gliotoxyin und 6-Cyanomethoxy-Gliotoxin, und ihren Salzen. Diese Gliotoxin-Derivate können leicht aus Gliotoxin mit im Stand der Technik bekannten Mitteln hergestellt werden. Beispielsweise beschreibt die EP 926 242 A1 diverse chemische Synthesewege für deren Herstellung. Gliotoxin ([3R-(3 α , 5 α , 6 β , 10 α)]-2,3,5a,6-Tetrahydro-6-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methyl-10H-3,10a-epi-dithiopyrazino[1,2-a]indol-1,4-dion) kann entsprechend einfach an der 6-Position chemisch modifiziert werden, wobei die Disulfidgruppe vorzugsweise durch vorübergehende Bindung einer Schutzgruppe geschützt wird.

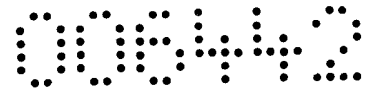
Weitere bevorzugte Gliotoxin-Derivate für eine Verwendung nach der vorliegenden Erfindung sind Notch2-Inhibitoren ausgewählt aus (3S, 10aR)-6-X-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-2-methyl-10H-3,10a-epidithiopyrazino[1,2-a]indol-1,4-dion, wobei X Wasserstoff oder eine funktionelle Gruppe ausgewählt aus Hydroxyl, Cyanomethyloxyl, Methoxy, Ethoxy, Acetoxy, Propionyloxy

oder Methoxycarbonylmethoxy sein kann und ihren Salzen. Diese aromatischen Gliotoxin-Derivate sind in der EP 0926242 zur Behandlung von Tumoren beansprucht. Die Synthese dieser Verbindungen geht aus diesem Dokument hervor. Obwohl zum Zeitpunkt der Anmeldung der EP 0926242 angenommen wurde, dass sich diese Verbindungen zur generellen Tumorbildung eignen, wurde gezeigt, dass die Mehrzahl an Tumoren bzw. Neoplasien sich nicht durch Gliotoxin und seine Derivate wirksam behandeln lassen (siehe u.a. Fig. 6 und 8), wodurch eine allgemeine Verwendungsmöglichkeit dieser Substanzen keinesfalls angenommen werden kann. Die vorliegende Erfindung sieht nun die Verwendung von Gliotoxin und seinen Notch2-inhibierenden Derivaten für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von speziellen Tumormformen vor, nämlich von Notch2-assoziierten Tumoren. Die gezielte Wirkung auf ein zelluläres Ziel, i.e. abnormes Notch2^{IC}, ist bei Wirkstoffen essentiell. Je indirekter eine Substanz wirkt, desto relevanter werden Nebenwirkungen, die bei Gliotoxin beachtlich sein können. Eine Wirkung bei therapeutisch relevanten Konzentrationen von 0,2µM kann hierbei als Richtwert angesehen werden.

Deswegen ist gemäß der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt, dass der Notch2-Inhibitor in einer therapeutischen Konzentration unterhalb 1 µM vorliegt, bevorzugt zwischen 0,01 bis 1 µM, weiters bevorzugt zwischen 0,05 bis 0,5µM, und am meisten bevorzugt in einer Konzentration von 0,2µM vorliegt. Die bevorzugte Serumkonzentration von 0,01µM bis 1µM Gliotoxin nach Verabreichung kann dementsprechend in Dosen appliziert werden. Das Wirkprinzip von Gliotoxin, nämlich die schnelle Induktion der Apoptose durch Exekution des „activation induced cell death“ (AICD) legt eine einmalige Verabreichung bzw. mehrmalige Verabreichungen in ein bis drei Wochen Abständen nahe.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Tumor B-CLL. B-CLL stellt eine Krebsart mit Signal-unabhängigen Notch2-Varianten (N2^{IC}) dar und ist daher ein geeignetes Ziel für ein Medikament gemäß der vorliegenden Erfindung. Die Wirksamkeit gegen diese Krebsart wird ausführlich in den Figuren und den Ausführungsbeispielen beschrieben.

Ein großer Vorteil eines Notch2-Inhibitors für die Behandlung von B-CLL ist die Verwendungsmöglichkeit von CD23 als Biomarker/Tumormarker. CD23 wird von der Zelloberfläche spontan



abgespalten und ist in Patientenseren als solubles CD23 (sCD23) mittels ELISA leicht detektierbar (*Schwarzmeier et al.*, Leukemia & Lymphoma 46: 157; 2005). Die sCD23-Werte korrelieren mit der Gesamttumormasse und können daher als Tumormarker zwecks Therapiemonitoring herangezogen werden. Durch dieses Monitoring kann eine Therapie-Konzentration des Notch2-Inhibitors an die medizinischen Gegebenheiten eines Patienten leicht individuell angepasst werden.

Bevorzugt wird die vorliegende Erfindung im Rahmen der Behandlung von Tumoren verwendet, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus hepatozellulärem Karzinom, Melanom, Medulloblastom, Gallengangskarzinom, Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom und Prostatakarzinom. Notch2-assoziiertes, d.h. durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiertes, hepatozelluläres Karzinom liegt beispielsweise in der Zelllinie SNU398 vor. Für die Behandlung von nicht Notch2-assoziiertem Leberkrebs, wie beispielsweise in den Zelllinien Huh7, Hepg2, oder Hep3B, zeigt Gliotoxin zu geringe oder keine Wirkung. Eine lediglich geringe Wirkung würde Gliotoxin als pharmazeutische Substanz aufgrund seiner Toxizität unbrauchbar machen. Nur eine niedere wirksame Konzentration und ein hoher therapeutischer Index (Quotient aus EC50 (wirksame Dosis) und LD50 (lethale Dosis)) ermögliche eine Verwendung nach der vorliegenden Erfindung. Die schlechte bzw. ausbleibende Wirkung von Gliotoxin bei nicht Notch2-assoziierten Krebsarten zeigt, dass Notch2-Inhibitoren nicht zur Krebs-Behandlung im Allgemeinen verwendet werden kann (Bsp. sämtliche Leberkarzinoma oder Leukämien). Mit der vorliegenden Erfindung wird anhand von Gliotoxin als Beispiel eines Notch2-Inhibitors der Beweis der Wirkung erbracht, die Möglichkeit Notch2-Inhibitoren gezielt zur Antitumorthherapie zu verwenden. Somit versteht es sich, dass die oben genannten Tumorarten sich ausschließlich auf Notch2-assoziierte Tumorarten beziehen. (Notch2-Assoziation bei Medulloblastom: *Fan et al.* (Cancer Research 64: 7787, 2004); bei Melanomen: *Hoek et al.* (Cancer Research 64: 5270, 2004); bei Pankreaskarzinoma: *Lee et al.* (Lab. Invest., May, 2005; E-pub); bei Lungenkarzinoma: *Garnis et al.* (Hum. Mol. Gen. 14: 475, 2004); bei Prostatakarzinoma: *Martin et al.* (Cancer Research 64: 347; 2004) und *Santagata et al.* (Cancer Research 64: 6854; 2004)). Notch2-assoziierte Tumore (einige Zelllinien des Hepato-

zelluläres Karzinoms, Pankreas Karzinom) sind gegenüber niedrigen Gliotoxin Dosen extrem empfindlich, während sich in diesem Dosisbereich in den bis jetzt blind getesteten Zelllinien (zB. Hela, Cervix Karzinom) kein zytotoxischer Effekt dieser Substanz beobachten lässt.

Besonders bevorzugt sind dabei Tumore, die dem klinischen Bild der Zelllinien SNU398, MelJuso, Nec, Panc-1 zugrunde liegen.

Insbesondere Melanoma, im Speziellen charakterisiert durch das klinische Bild der Zelllinie MelJuso, ist ein bevorzugtes Ziel der erfindungsgemäßen Verwendung. Diese Zelllinie zeigte eine zur B-CLL vergleichbare Notch2-Aktivität (s. Fig. 7B).

Das Notch2-Onkogen spielt auch in diesen Tumoren eine zentrale Rolle in der Immortalisation, im Differenzierungsarrest und in der Apoptoseresistenz. Daten aus cDNA-Microarray-Studien zeigen, dass hepatisches Karzinome, Pankreas Karzinome und Melanome möglicherweise trunkierte Notch2-Formen überexprimieren.

Die in diesen Zellen verstärkt wirksamen Proliferationssignale induzieren TR3 (NR4A1), analog zur B-CLL, und haben somit intrinsisch ein pro-apoptotisches Programm etabliert, das über eine verstärkte Notch2-Aktivität blockiert ist. Diese Tumore zeigen des Weiteren eine oft verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL2, was im Kontext der TR3 (NR4A1)-induzierten Apoptose zwar essentiell ist (Lin et al., Cell 116: 527; 2004), diese Tumore aber extrem resistent gegenüber konventionellen Chemotherapien macht. Generell ist durch Genexpressionsanalyse leicht festzustellen, ob es sich bei einer bestimmten Krebsart um einen erfindungsgemäß zu behandelnden Notch2-assoziierten Tumor handelt oder nicht. Notch2-assoziierte Tumore weisen ein den hierin beschriebenen Tumorbeispielen im Hinblick auf die Notch2-Expression vergleichbares Expressionsmuster auf. Nicht-Notch2-assoziierte Tumore entsprechen in ihrem Notch2-Expressionsmuster etwa Hela- oder Cervix-Karzinom.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Medikament einen pharmazeutischen Träger. Pharmazeutische Träger-Substanzen dienen der besseren Verträglichkeit des Medikaments und ermöglichen bessere Löslichkeit sowie bessere Bioverfügbarkeit der im Medikament enthaltenen Wirkstoffe. Beispiele hierfür sind Emulgatoren, Verdickungsmittel, Redoxkomponenten, Stärke, Alkohollösungen,

Polyethylenglycol oder Lipide. Die Auswahl eines geeigneten pharmazeutischen Trägers hängt stark von der Art der Verabreichung ab. Für orale Verabreichungen können flüssige oder feste Träger verwendet werden, für Injektionen sind flüssige Endzusammensetzungen erforderlich.

Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäß zu verwendende Medikament Puffersubstanzen oder tonische Substanzen. Mittels Puffer kann der pH-Wert des Medikaments auf physiologische Konditionen eingestellt werden und weiters können pH-Schwankungen abgeschwächt bzw. gepuffert werden. Ein Beispiel hierfür ist ein Phosphatpuffer. Tonische Substanzen dienen zur Einstellung der Osmolarität und können ionische Substanzen, wie zum Beispiel anorganische Salze, wie NaCl, oder auch nicht-ionische Substanzen, wie zum Beispiel Glycerin oder Kohlenhydrate, umfassen.

Bevorzugterweise ist das erfindungsgemäß zu verwendende Medikament zur oralen oder intranasalen Verabreichung geeignet hergerichtet. Diese Verabreichungsformen des Medikaments der vorliegenden Erfindung ermöglicht eine schnelle und unkomplizierte Aufnahme der Wirkstoffe durch Schleimhäute. Zur nasalen Aufnahme eignen sich Nasentropfen oder Nasensprays. Zur oralen Verabreichung können beispielsweise feste bzw. flüssige Medikamente direkt oder aufgelöst bzw. verdünnt eingenommen werden.

Das erfindungsgemäß zu verwendende Medikament ist vorzugsweise zur intravenösen, intraarteriellen, intramuskulären, intravaskulären, intraperitonealen oder subkutanen Verabreichung geeignet hergerichtet. Hierfür eignen sich beispielsweise Injektionen oder Transfusionen. Verabreichungen direkt in die Blutbahn haben den Vorteil, dass die Wirkstoffe des Medikaments im gesamten Körper verteilt werden und die Zielgewebe schnell erreichen. Im Fall der B-CLL sind die Ziel-B-Zellen meist in der Milz und in peritonealen/pleuralen Kavitäten zu finden, wo sie rasch auf Blut- und Darm-Antigene reagieren können.

Eine weitere Ausführungsform sieht die Verwendung zur Herstellung eines Medikaments zur topischen Anwendung vor. Insbesondere bei Melanomen ist eine lokale, topische Anwendung eines solchen Medikaments, beispielsweise als Pflaster sinnvoll, wobei der Wirkstoff direkt an die betroffenen Stellen verabreicht werden kann.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung liegt in einem Verfahren zur Behandlung von Tumoren in Patienten, die durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiert sind (i.e. deren Wirkmechanismus eine Apoptose-Inhibition umfasst, die mit Liganden-unabhängigen Notch2-Fragmenten in ursächlichem Zusammenhang stehen), wobei ein Notch2-Inhibitor, bevorzugt Gliotoxin, in einer effektiven Menge an einen Patienten mit einem derartigen Tumor verabreicht wird. Solche Tumore können in einem Lebewesen, bevorzugt einem Säuger, weiters bevorzugt in einem Menschen, vorliegenden, wobei ein Notch2-Inhibitor enthaltendes (insbesondere ein Gliotoxin-haltiges) Medikament, das wie oben beschrieben hergestellt werden kann, verabreicht wird. Bevorzugte Verabreichungen erfolgen oral, nasal, intravenösen, intraarteriellen, intramuskulären, intravaskulären, intraperitonealen, topisch oder subkutanen.

Die vorliegende Erfindung wird weiters durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele näher erläutert, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

F i g u r e n :

Fig. 1: Die Rolle von Notch2 in binären B-Zell-Differenzierungsentscheidungen und dessen Involvierung in der B-CLL Pathogenese. Die frühe B-Zell Entwicklung findet in der fötalen Leber (B1-B-Zellen) und postnatal im Knochenmark statt (B2-B-Zellen).

Fig. 2: Molekulargewicht und Strukturformel von Gliotoxin (2,3,5a,6-Tetrahydro-6-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methyl-10H-3a,10aepidithiopyrazino[1,2a]indole-1,4-dione), Molgewicht 326.4 Da, Formel: $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$.

Fig. 3: Gliotoxin inhibiert die transkriptionelle Aktivität von Notch2 in kultivierten B-CLL-Zellen. B-CLL-Zellen wurden 24 Stunden mit 0.2µM Gliotoxin inkubiert. Die Notch2-Aktivität wurde mittels EMSA quantifiziert (A) und die Apoptoserate bzw., die CD23 Expression (Notch2-Zielgen) mittel FACS determiniert (B). Die Zahlen reflektieren den Prozentsatz an CD23 exprimierenden / apoptotischen Zellen.

Fig. 4: Gliotoxin induziert die Apoptose in unstimulierten sowie in TPA stimulierten B-CLL-Zellen innerhalb von 4 Stunden. Normale PBMC's (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Spendern zeigen eine deutlich geringere Notch2-Aktivität. Obwohl Gliotoxin Notch2 auch in normalen, TPA stimulierten Zellen inhibiert, ist im Vergleich zu B-CLL-Zellen die Gliotoxin verursachte Apoptoserate in normalen Zellen deutlich geringer.

Fig. 5: Modell für die Wirkung von Gliotoxin in der B-CLL: Die Homöostase von B1-B-Zellen wird über definierte Auto-Antigene durch positive/negative Selektion gesteuert. B1-B-Zellen sind in der Milz und in bestimmten Arealen des Peritoneums lokalisiert, wo sie über benachbarte Zellen ein physiologisches Notch2-Signal empfangen (B). Außerhalb dieser Gewebe verlieren diese Zellen den Notch2-Stimulus, wodurch die Interaktion mit Selbstantigenen über Induktion von TR3 (NR4A1) zum AICD führt (A). B-CLL-Zellen exprimieren ein Ligand unabhängiges Notch2-Protein, wodurch der AICD-Mechanismus blockiert ist. Nukleäres Notch2 bindet im Zellkern an TR3, wodurch dieser Faktor seine apoptotische Funktion im Zytoplasma nicht ausführen kann. Gliotoxin hemmt die nukleäre Notch2-Aktivität. Somit wird die Homöostase wieder zu Gunsten der negativen Selektion verschoben, wodurch sich die massive Apoptose in Gliotoxin behandelten Leukämiezellen erklären lässt.

Fig. 6: Zytostatischer Effekt von Gliotoxin auf diverse Zelllinien von hepatozellulären Karzinomen (Huh7, Hepg2, Hep3B, Hela, Snu398), Gallengangskarzinom (Nec), Pankreas-Karzinom (Panc-1) und Melanomen (MelJuso und MelJuso+BCL2). Die angegebenen Zelllinien wurden 72h mit 0.2µM Gliotoxin inkubiert und anschließend die Zellzahl ($\times 10^3$) bestimmt (graue Balken: Kontrolle = 100%; schwarze Balken: Gliotoxin Behandlung, Zellzahl in % relativ zur Kontrolle).

Fig. 7: (A) Die Ligand-induzierte wt-Notch2-Signaltransduktion ist von der γ -Sekretase-Spaltung an einem konservierten Valin (S3-Stelle) abhängig. Die Translokation in den Kern von N2^{IC} ist durch post-translatorische Modifikationen der Notch-Cytokin-Antwort-Region (NCR) reguliert. Zwei weitere trunkierte Notch2-Fragmente (N2^{IC} und N2^{ICAPEST}) werden gezeigt, die für retroviralen

Gentransfer verwendet werden. Beide Konstrukte nehmen hierfür ein Startkodon strangabwärts von der S3-Stelle zunutze, das auch zur Translation der γ -Sekretase unabhängigen N2^{IC}-Proteinen in Neoplasten dient. EGF: Epidermal Growth Faktor-ähnliche Wiederholungen; NLR: Cystein-reiche Lin-1/Notch-Wiederholungen; TM: Transmembrandomäne; RAM: CLS Bindungsdomäne; Ank: Ankyrin/CD10 Wiederholungen; TAD: Transaktivierungsdomäne; PEST: Protein Abbau Signal.

(B) Tumorzellen der Melanomzelllinie MelJuso zeigen eine, zur B-CLL vergleichbare Notch2-Aktivität. 3 μ g Zellkernproteinextrakte von B-CLL sowie MelJuso Zellen wurden mit einer CBF1 DNA-Sonde +/- eines Notch2-Antikörpers in einem „bandshift“ Experiment auf Notch2-Aktivität getestet. Bei der Zelllinie MelJuso zeigte sich der Notch2-Inhibitor Gliotoxin besonders wirksam.

Fig. 8: Die apoptotische Wirkung von Gliotoxin an weitere B-CLL Patientenproben (CLL4-CLL8) wird dargestellt. Die (nicht Notch2-assoziierten bzw. nicht durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisierten) Leukämiezelllinien Jurkat (T-ALL), SH-1 (Haarzellkarzinom), RL-7 und K562 (CML) sind gegenüber einer Behandlung mit 0.2 μ M (entspricht 60ng/ml) GLIOTOXIN resistent. Zellen wurden 24h +/- GLIOTOXIN inkubiert und der Prozentsatz an apoptotischen Zellen (Probidiumjodid+/AnnexinV+) mittels FACS Analyse bestimmt. In keiner, der 4 angeführten nicht-Notch2 assoziierten Zelllinien führte die Applikation von 0.2 μ M Gliotoxin zu einer signifikanten Induktion der Apoptose innerhalb von 24 Stunden.

B e i s p i e l e :

Als Drugscreening Modell wurde ein Zellkultursystem etabliert, das den Phänotyp von frisch isolierten B-CLL-Zellen konserviert (3x10⁶ B-CLL Zellen/ml RPMI Medium +10%FCS supplemented mit 1ng/ml TPA). Die Notch2-Aktivität im Zellkern wird mit Hilfe von EMSA (electrophoretic mobility shift assays)-Experimenten bestimmt und die Zellviabilität (Probidiumiodid/AnnexinV) bzw. die CD23 Expression (Notch2-Zielgen) über FACS (Durchflußzytometrie) Analysen determiniert.

Beispiel 1: Wirkung von Gliotoxin auf die Notch2-Aktivität

B-CLL-Zellen wurden 24h in Gegenwart von 0.2µM/ml Gliotoxin 24 Stunden kultiviert. Diese Behandlung führte zu einem dramatischen Verlust der transkriptionellen Notch2-Aktivität, wie im folgendem repräsentativen EMSA gezeigt wird (Fig. 3). Da die Notch2-Aktivität in B-CLL-Zellen mit deren Zellviabilität korreliert, führte der Verlust des nukleären Notch2 nicht nur zum Verlust der CD23-Expression, sondern auch zu einer massiven Induktion der Apoptose (n=10; Mittelwert Apoptose: 73%). Die Fig. 3 zeigt zwei repräsentative Gliotoxin sensitive B-CLL Fälle (CLL 1 & 2) und einen relativ resistenten B-CLL Fall (CLL 3), der sich durch eine außergewöhnlich hohe Notch2-Aktivität auszeichnet.

Um die Spezifität des Notch2-inhibierenden Effekts von Gliotoxin zu demonstrieren, wurden B-CLL-Zellen sowie als Kontrolle PBMC's von gesunden Spendern (innerhalb von 4 Stunden zeigen auch normale rezirkulierende Lymphozyten eine gewisse Rest-Notch2-Aktivität) kurzzeitig (4 Stunden) mit 0.2µM Gliotoxin behandelt, wo sich die Notch2-inhibierende Funktion von Gliotoxin bestätigte. Nach 4 Stunden Gliotoxin-Behandlung waren bereits massive Anzeichen der einsetzenden Apoptose (AnnexinV+) in B-CLL-Zellen zu erkennen. Dieser Effekt wurde durch TPA (ein Phorbol-ester, der die Aktivierung von Lymphozyten simuliert) verstärkt.

In der Kontrolle zeigte sich nur in TPA stimulierten PBMC's eine deutliche Verringerung der physiologischen Notch2-Aktivität durch Gliotoxin. Im Vergleich zu B-CLL-Zellen sind normale PBMC's weit weniger sensitiv gegenüber dem pro-apoptotischen Effekt von Gliotoxin (unstimuliert: 20% Apoptose in PBMC's versus 54% in B-CLL-Zellen; TPA stimuliert: 17% Apoptose in PBMC's versus 73% in B-CLL-Zellen).

Beispiel 2: Wirkung von Gliotoxin in weiteren Notch2-assoziierten Neoplasien

Ein Screening auf die Wirksamkeit von Gliotoxin in Zelllinien von hepatischen Karzinomen, Melanomen und Pankreas-Karzinomen ergab, dass Gliotoxin massiv die Apoptose in bestimmten Zelllinien induziert. In Fig. 6 ist ein repräsentatives „Screening“ zu sehen, wo die angegebenen Zelllinien (hepatische Karzinomzelllinien: Hu7, Hepg2, Hela, Hep3B, SNU398;

Gallengangskarzinom: Nec; Pankreas-Karzinomzelllinie: Panc-1; Melanom-Zelllinien: MelJuso-wT. MelJuso+BCL2 transduziert) 72 Stunden in Gegenwart von 0.2 μ M Gliotoxin kultiviert wurden und anschließend die Zellmenge determiniert wurde ($\times 10^3$ Zellzahl). Als besonders wirksam zeigte sich Gliotoxin in den hepatozellulären Zelllinie SNU398 und Gallengangskarzinom Zelllinie Nec, sowie in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1. Besonders auffällig war die Wirkung in Melanom-Zelllinien, die als besonders resistent gegenüber gängigen Therapieformen gelten. Selbst eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins BCL2 in der Melanomzelllinie MelJuso zeigte nur einen geringen schützenden Effekt gegenüber einer Gliotoxin-Behandlung. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass BCL2 im Zuge des AICD über Interaktion mit TR3 (NR4A1) durch Konformationsänderung zu einem Inducer der Apoptose wird.

Beispiel 3: Trunkierte Notch2-Formen in B-CLL

Gen Aberrationen (Nickoloff et al., oben; Radke et al., oben) können zur Expression eines trunkierten, Ligand-unabhängigen N^{IC} Proteins führen. Solche neoplastischen Notch-Formen sind entweder konstitutiv aktivierbar durch die γ -Sekretase an einem konservierten Valin in der Nähe der Transmembrandomäne (S3, Fig. 7) oder sind γ -Sekretase unabhängig durch Translation eines trunkierten Notch2-Proteins durch Initiation stromabwärts der S3 Stelle. Durch Inkubation von B-CLL-Zellkulturen mit 50nM Dapt, einem γ -Sekretase-Inhibitor (IC₅₀ = 5-10nM) und Inhibitor des Ligand-abhängigen Notch2-Signals, wurde bewiesen, dass die hohe N2^{IC} Aktivität von frisch isolierten peripheren B-CLL-Lymphozyten und in TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetat) behandelten B-CLL-Suspensions-Zellkulturen auf die Expression eines Ligand-unabhängigen Notch2 zustande kommt. Dapt hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von N2^{IC}. Dadurch lässt sich schließen, dass B-CLL Zellen ein trunkiertes Notch2 exprimieren, das über keine Transmembran Domäne verfügt.

Im Speziellen blockt N2^{IC} die apoptotische Funktion des Steroidrezeptors NR4A1, der zu den unmittelbaren nahen Genen zählt, die durch apoptotische BCR-Signale induziert werden (AICD). Interessanterweise ist in B-CLL-Zellen die NR4A1 Expression stark erhöht, was darauf schliessen lässt, dass diese Leukämiezellen für die Apoptose programmiert wurden. Durch das aberrante Not-

ch2-Signal sind diese Zellen jedoch nicht zur negativen Selektion fähig.

Beispiel 4: Wirkung auf nicht-Notch2 assoziierte Krebsarten

In EP 926 241 A1 wird in Tabelle 1 die Wirkung von Gliotoxin in 7 Zelllinien an Hand der IC₅₀ Werte (ng/ml) bezüglich Zellviabilität gezeigt. In diesen Zelllinien zeigte sich nur in U937 (Makrophagenzelllinie; IC₅₀: 14); HCT-15 (IC₅₀: 39) sowie in der Mauszelllinie P388 (IC₅₀: 5,8) eine zu den vorliegenden Daten vergleichbare Wirksamkeit (0.2µM entspricht 60ng/ml: Hier findet man einen nahezu 100% Respons in B-CLL Fällen und in den Zelllinien Snu-398, Panc-1 und MelJuso+/- Bcl2). In der Melanomzelllinie MelJuso, in der sich Gliotoxin als besonders wirksam gezeigt hat, eine zur B-CLL vergleichbare Notch2-Aktivität gefunden worden ist (Fig. 7B).

Unter weiteren Kontrollen, in denen Gliotoxin keinen Effekt gezeigt hat, sind Leukämien (als Kontrollzelllinien wurden Jurkat (T-ALL), K562 (CML), RL7 und SH1 (Haarzellleukämie) getestet (Fig. 8)) und solide Tumore (0.2µM Gliotoxin hat keinen signifikanten Effekt auf die Zellzahl von Hela-Zellen (Cervixkarzinom) innerhalb von 72 Stunden). Weiter Beispiele sind oben angegeben (Hepatozelluläres Karzinom der Zelllinien Huh7, Hepg2, Hep3B).

In Blindversuchen hat sich in keiner Leukämiezelllinie eine zur B-CLL vergleichbare Wirkung von Gliotoxin gezeigt. Bei soliden Tumoren geht der Trend in eine ähnliche Richtung: MelJuso (Melanom), wo eine Involvierung von Notch2 gezeigt wird (Fig. 7B, und Hoek et al., *Cancer Research* 64: 5270; 2004). Einige Zelllinien des Hepatozellulären Karzinoms, des Gallengangskarzinoms und des Pankreaskarzinoms sind gegenüber niedrigen Gliotoxin-Dosen extrem empfindlich, während sich in diesem Dosisbereich in den bis jetzt blind getesteten Zelllinien (z.B. Hela, Cervix Karzinom) kein zytotoxischer Effekt dieser Substanz beobachten lässt.

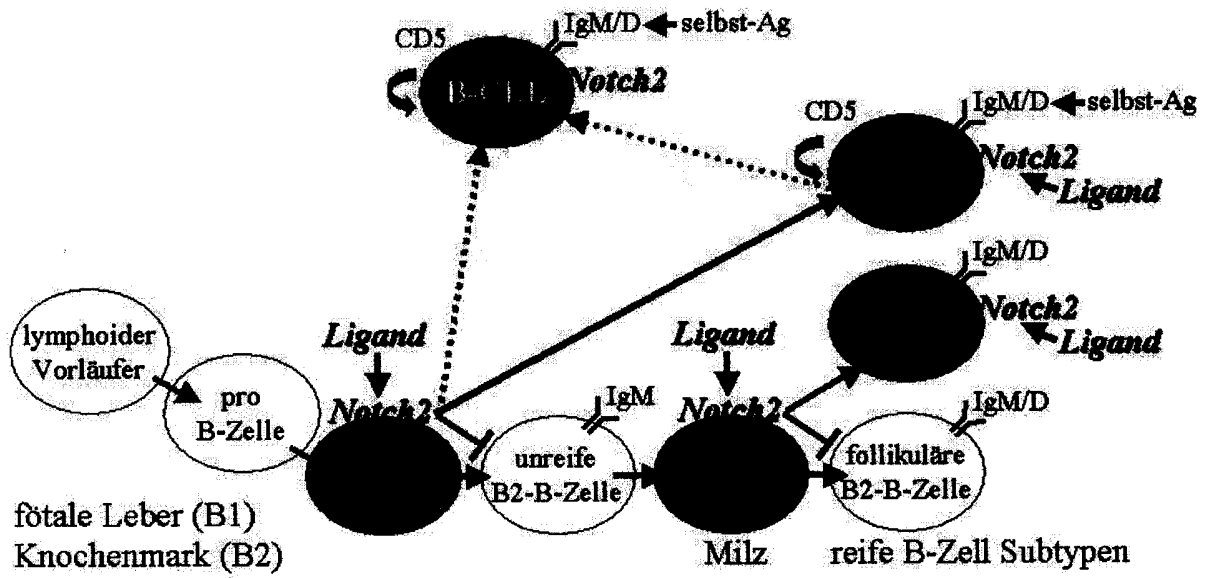
P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verwendung von Notch2-Inhibitoren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren, die durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiert sind.
2. Verwendung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor Gliotoxin ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor ein Gliotoxin-Derivat, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acetylgliotoxin, 6-C₁₋₃-Alkoxygliotoxin, 6-C₂₋₃-Acyloxy-Gliotoxin, 6-dihydro-Gliotoxin, 6-dihydroxy-Gliotoxin 6-[(Methoxycarbonyl)methoxy]-Gliotoxyin, 6-Cyanomethoxy-Gliotoxin und ihren Salzen, ist.
4. Verwendung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor ein Gliotoxin-Derivat, ausgewählt aus (3S, 10aR)-6-X-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-2-methyl-10H-3,10a-epidithiopyrazino[1,2-a]indole-1,4-dione, wobei X Wasserstoff oder eine funktionelle Gruppe ausgewählt aus Hydroxyl, Cyanomethoxyl, Methoxy, Ethoxy, Acetoxy, Propionyloxy und Methoxycarbonylmethoxy sein kann, und ihren Salzen.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor in einer therapeutischen Konzentration unterhalb 1 µM vorliegt, bevorzugt zwischen 0,01 bis 1 µM, weiters bevorzugt zwischen 0,05 bis 0,5µM, und am meisten bevorzugt in einer Konzentration von 0,2µM vorliegt.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor B-CLL ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor aus der Gruppe bestehend aus hepatozellulärem Karzinom, Melanom, Medulloblastom, Gallengangskarzinom, Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom und Prostatakarzinom, ausgewählt ist.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass den

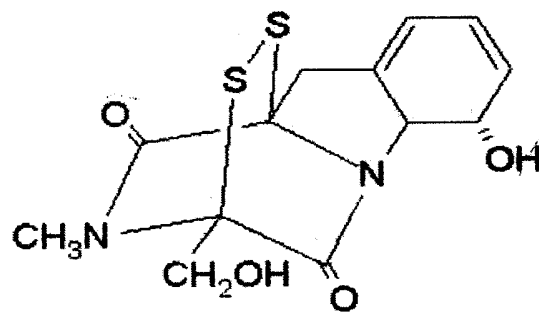
Tumoren das klinische Bild der Zelllinien SNU398, MelJuso, Nec oder Panc-1 zugrunde liegt.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament pharmazeutische Träger umfasst.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament Puffer oder tonische Substanzen umfasst.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur oralen oder intranasalen Verabreichung geeignet ist.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur intravenösen, intraarteriellen, intramuskulären, intravaskulären, intraperitonealen oder subkutanen Verabreichung geeignet ist.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur topischen Verabreichung geeignet ist, vorzugsweise als Pflaster.
14. Verfahren zur Behandlung von Tumoren, die durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiert sind, wobei eine effektive Menge an Notch2-Inhibitor, bevorzugt Gliotoxin, an einen Patienten verabreicht wird.

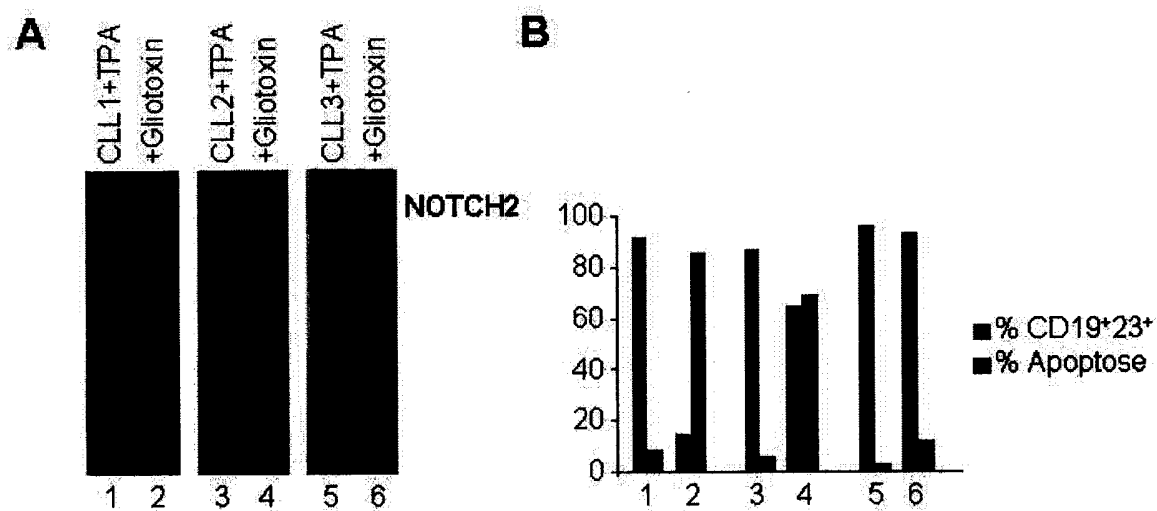
Figur 1



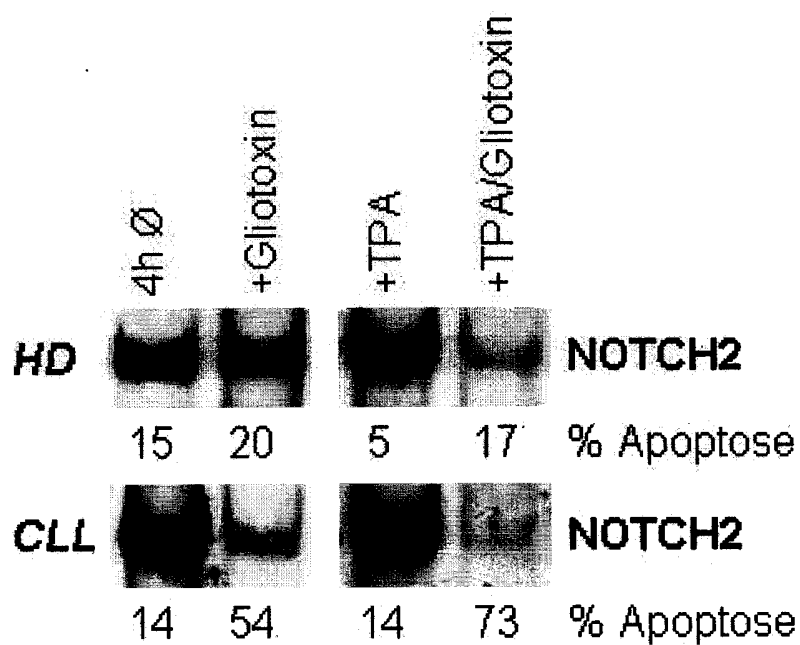
Figur 2



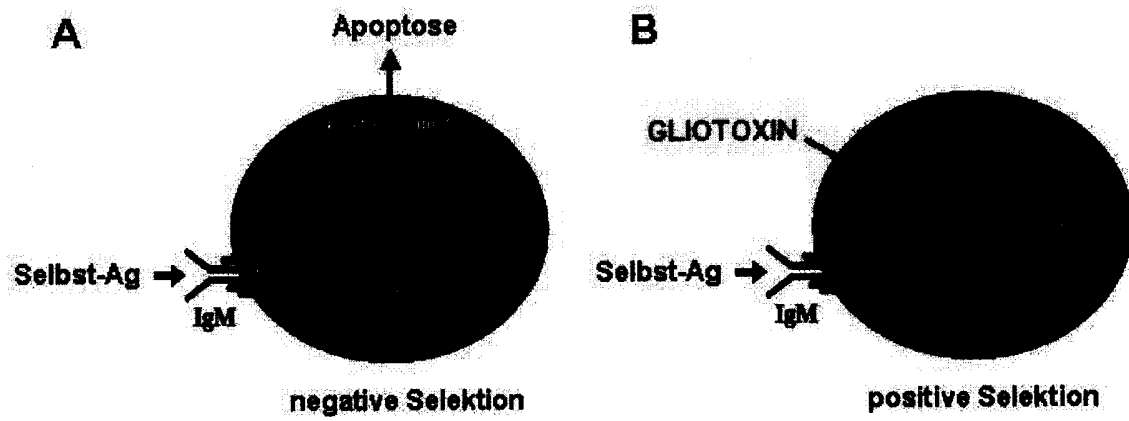
Figur 3



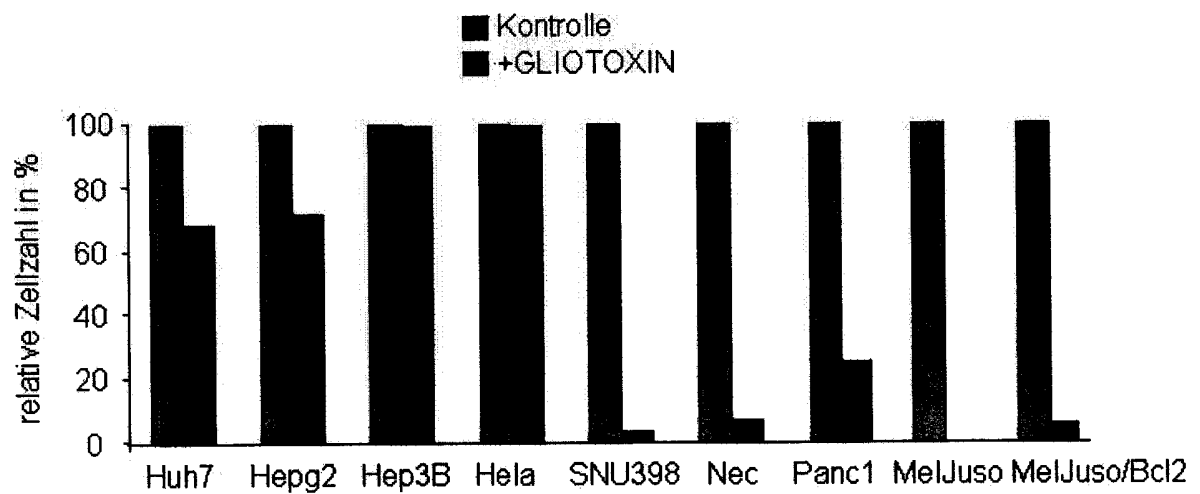
Figur 4



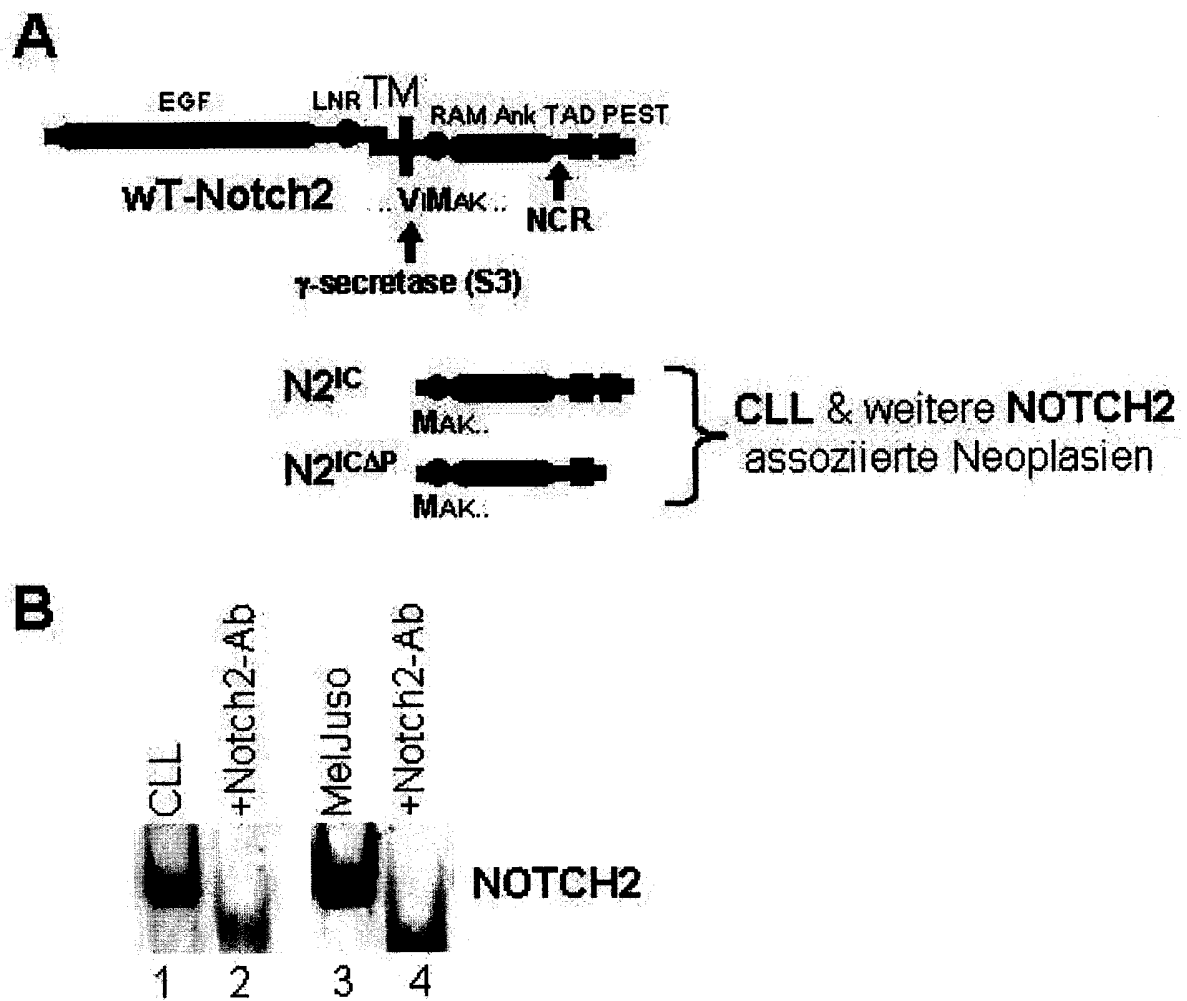
Figur 5



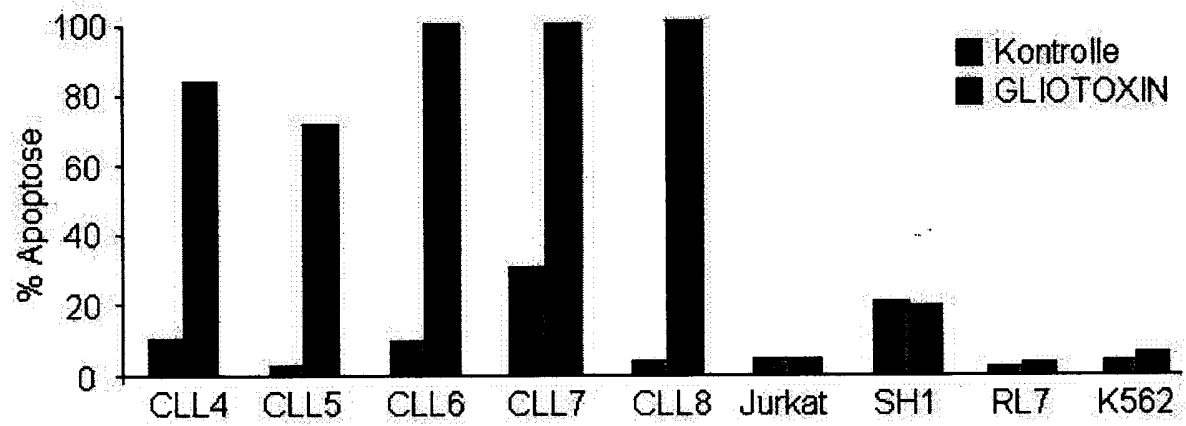
Figur 6

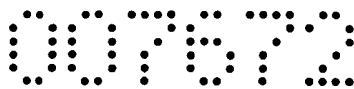


Figur 7



Figur 8





P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verwendung von Notch2-Inhibitoren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren, die durch Ligand-unabhängige Notch2-Fragmente charakterisiert sind.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor Gliotoxin ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor ein Gliotoxin-Derivat, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acetylgliotoxin, 6-C₁₋₃-Alkoxygliotoxin, 6-C₂₋₃-Acyloxy-Gliotoxin, 6-dihydro-Gliotoxin, 6-dihydroxy-Gliotoxin 6-[(Methoxycarbonyl)methoxy]-Gliotoxyin, 6-Cyanomethoxy-Gliotoxin und ihren Salzen, ist.
4. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Notch2-Inhibitor ein Gliotoxin-Derivat, ausgewählt aus (3S, 10aR)-6-X-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-2-methyl-10H-3,10a-epidithiopyrazino[1,2-a]indole-1,4-dione, wobei X Wasserstoff oder eine funktionelle Gruppe ausgewählt aus Hydroxyl, Cyanomethoxyl, Methoxy, Ethoxy, Acetoxy, Propionyloxy und Methoxycarbonylmethoxy sein kann, und ihren Salzen.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor B-CLL ist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor aus der Gruppe bestehend aus hepatozellulärem Karzinom, Melanom, Medulloblastom, Gallengangskarzinom, Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom und Prostatakarzinom, ausgewählt ist.
7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass den Tumoren das klinische Bild der Zelllinien SNU398, MelJuso, Nec oder Panc-1 zugrunde liegt.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament pharmazeutische Träger umfasst.

NACHGEREICHT

007072

R45666

- 18 -

A 1044/2005

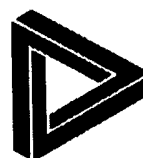
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament Puffer oder tonische Substanzen umfasst.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur oralen oder intranasalen Verabreichung geeignet ist.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur intravenösen, intraarteriellen, intramuskulären, intravaskulären, intraperitonealen oder subkutanen Verabreichung geeignet ist.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur topischen Verabreichung geeignet ist, vorzugsweise als Pflaster.

NACHGEREICHT



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : A61K 31/495 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01)		
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: A61K 31/495		
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): A61K, A61P		
Konsultierte Online-Datenbank: WPI, Medline		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 21. Juni 2005 eingereichten Ansprüchen 1-14 erstellt.		
Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	EP 926242 A1 (AJINOMOTO CO., INC) 30. Juni 1999 (30.06.1999) <i>Ansprüche 1-6</i>	1-14
A	WO 1992/010198 A1 (JOHNSON & JOHNSON RESEARCH PTY LIMITED) 25. Juni 1992 (25.06.1992) <i>Ansprüche 1, 6, 8, 13</i>	1-14
A	LEE, H.J. Anti-angiogenic activities of gliotoxin and its methylthioderivative, fungal metabolites. Archives of pharmacal research. Korea (South), 2001, Vol. 24, Nr. 5, pages 397-401 <i>Medline Zusammenfassung NLM11693538</i>	1-14
A	US 2004/01001847 A1 (Freier et al.) 27. Mai 2004 (27.05.2004) <i>Seite 11, Absätze [0113] - [0114]; Seite 16, Absatz [0185], Ansprüche</i>	1-14
A	SAI, H. et al. Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. Blood, 2004, Vol. 104, Nr. 6, pages 1696-1702. <i>Figur 4</i>	1-14
Datum der Beendigung der Recherche: 4. Mai 2006		☒ Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): Mag. MOSSER
¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente: X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. Y Veröffentlichung von Bedeutung : der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist. A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert. P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht wurde. E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein älteres Recht hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). & Veröffentlichung, die Mitglied der selben Patentfamilie ist.		



Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	PARR, C. et al. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer. International Journal of Molecular Medicine, 2004, Vol. 14, Nr. 5, pages 779-786 <i>Medline Zusammenfassung NLM15492845</i> ----	1-14