



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 31/70</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/56342</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 28 septembre 2000 (28.09.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR00/00676 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 17 mars 2000 (17.03.00)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 99/03433 19 mars 1999 (19.03.99) FR  <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS [FR/FR]; 3, avenue Victoria, F-75004 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).  <b>(72) Inventeur; et</b> <b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement):</b> CARPENTIER, Antoine [FR/FR]; 28, avenue Bosquet, F-75007 Paris (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> USE OF STABILISED OLIGONUCLEOTIDES FOR PREPARING A MEDICINE WITH ANTITUMOUR ACTIVITY <b>(54) Titre:</b> UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES STABILISES POUR LA PREPARATION D'UN MEDICAMENT A ACTION ANTITUMORALE  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns the use of stabilised oligonucleotides comprising at least an octamer motif of the type: 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-3' wherein the pair X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> is AT, AA, CT or TT, for preparing a medicine with antitumour activity.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui comprennent au moins un motif octamérique du type: 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-3', dans lequel la paire X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub> est AT, AA, CT ou TT, pour la préparation d'un médicament à action antitumorale.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'OLIGONUCLÉOTIDES STABILISÉS POUR LA  
PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT A ACTION ANTITUMORALE.

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'oligonucléotides stabilisés pour la préparation  
5 d'un médicament à action antitumorale.

Le traitement efficace des cancers reste l'un des défis majeurs de la médecine d'aujourd'hui.

L'efficacité des thérapeutiques conventionnelles chirurgicales ou à visée cytolytique (chimiothérapie et radiothérapie) reste très limitée dans de nombreux  
10 cancers.

Pour les astrocytomes par exemple, dont le traitement repose principalement sur l'exérèse chirurgicale et l'irradiation cérébrale locale, la médiane de survie est seulement de 4 à 6 mois après exérèse chirurgicale  
15 et de 8 à 10 mois avec l'association chirurgie et radiothérapie. Une chimiothérapie complémentaire allonge la survie chez les patients de moins de 60 ans, mais de façon très modeste, de l'ordre de 3 mois. Sous ce triple  
20 traitement, la médiane de survie reste inférieure à deux ans pour le grade histologique III (astrocytome anaplasique) et inférieure à 1 an pour le grade IV (glioblastome). La mortalité pour ces deux groupes est de 100% (Daumas-Duport C. et al. (1988), Cancer 62(10) pp 2152-65).

25 La stimulation du système immunitaire dans le traitement des cancers est une idée ancienne et de très nombreux produits ont été testés, comme par exemple les extraits bactériens (Jaeckle K. A. et al. (1990), J. Clin. Oncol. 8(8) pp 1408-18), l'ADN bactérien, notamment celui  
30 de *Mycobacterium bovis* (MY-1) (Tokunaga T. et al. (1984), JNCI 72 pp 955-62). MY-1 est cependant inefficace pour

augmenter la survie dans un modèle de gliome chez la souris (Nakaichi M. et al. (1995), *J. Vet. Med. Sci.* 57(3) pp 583-5). L'IL2 (Herrlinger U. et al. (1996), *J. Neurooncol.* 27(3) pp 193-203) et plus récemment l'IL12 (Kishima H. et al. (1998), *Br. J. Cancer* 78(4) pp 446-53 ; Jean W. C. et al. (1998), *Neurosurgery* 42(4) pp 850-6) ont également été étudiés.

Malheureusement, la plupart de ces produits ont une efficacité limitée ou une toxicité inacceptable et à ce jour, seul le BCG de *Mycobacterium bovis* a abouti à des applications cliniques, mais seulement dans des indications très limitées de cancers de la vessie (Soloway M. S. et al. (1988), *Urol. Clin. North Am.* 15 pp 661-9).

Les oligonucléotides sont des polymères, formés par la combinaison de bases puriques ou pyrimidiques et de sucres, notamment des ribonucléotides ou des désoxyribonucléotides. A l'état naturel, les liaisons sont des liaisons phosphoesters sensibles aux nucléases de l'organisme humain. Ainsi les oligonucléotides présentent une demi-vie très courte (de l'ordre de la minute) quand ils sont injectés chez l'homme, ce qui limite leurs effets biologiques. Aussi, plusieurs études ont cherché à stabiliser les oligonucléotides en modifiant leur structure chimique pour les rendre résistants aux nucléases. Plusieurs types d'oligonucléotides stabilisés ont ainsi été créés comme, entre autres, les phosphorothioates ou les méthylphosphonates, (Crooke R. M. (1991), *Anti-Cancer Drug Design* 6 pp 609-46). Les plus fréquemment utilisés sont les oligonucléotides phosphorothioates.

Certains oligodésoxynucléotides et notamment certains oligodésoxynucléotides synthétiques possèdent

parfois des effets biologiques propres, en dehors de leurs propriétés antisens classiques.

Ainsi certains oligodésoxynucléotides, indépendamment de toute séquence antisens connue, stimulent, *in vitro* et *in vivo*, la prolifération des lymphocytes B, l'activité des cellules NK et induisent la sécrétion par ces cellules d'IFN  $\alpha$ , d'IFN  $\beta$ , d'IFN  $\gamma$ , d'IL6, d'IL12 ou de TNF  $\alpha$  (Yamamoto S. et al. (1992), *J. Immunol.* **148**(12) pp 4072-6 ; Yamamoto T. et al. (1994), *Microbiol. Immunol.* **38**(10), pp 831-6 ; Yi A. K. et al. (1996), *J. Immunol.* **157**(12) pp 5394-402 ; Ballas Z. K. et al. (1996), *J. Immunol.* **157**(5) pp 1840-5 ; Cowdery J. S. et al. (1996), *J. Immunol.* **156**(12) pp 4570-5 ; Stacey K. J. et al. (1996), *J. Immunol.* **157**(5) pp 2116-22). L'ensemble de ces cytokines oriente vers une réponse immunitaire de type Th1 (Chu R.S. et al. (1997), *J. Exp. Med.* **186**(10) pp 1623-31).

Des Auteurs ont montré que les propriétés immunostimulantes de ces oligodésoxynucléotides sont en grande partie dépendantes de motifs CG non méthylés (dinucléotides CpG non méthylés) qui sont sous-représentés dans l'ADN de mammifères (Kuramoto E. et al. (1992), *Jpn. J. Cancer Res.*, **83** pp 1128-31).

Si les Auteurs s'accordent sur le fait que la séquence CG non méthylée est indispensable et que les deux nucléotides adjacents au motif CG, sont également cruciaux pour l'activité immunostimulante, les données publiées sur la nature des séquences adjacentes sont contradictoires.

En effet, Krieg A. M. et al. ((1996), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **6**(2) pp 133-9 revendiquent un motif hexamérique du type 5'purine purine CG pyrimidine pyrimidine 3', alors que la demande EP 468 520 revendique un motif hexamérique palindromique. La Demande

internationale WO 9855495 montre, que tous les hexamères tels que définis par Krieg et al. 1996 (précité) ne sont pas immunostimulants et qu'il convient plutôt de définir des octamères, de séquence 5' purine purine CG pyrimidine pyrimidine CC-3' ou de séquence 5'-purine purine CG pyrimidine pyrimidine CG-3', pour avoir une activité immunostimulante.

D'autres oligodésoxynucléotides immunostimulants, qui ne sont pas définis comme des oligonucléotides possédant un motif CG non méthylé ont été décrits dans la Demande EP 855 184 : ils comprennent la séquence de fixation de facteurs de transcription eucaryote tels que NFkB ou la famille AP-1. Parmi ces oligonucléotides, certains comprennent néanmoins le motif CG non méthylé.

L'utilisation des propriétés immunostimulantes des oligodésoxynucléotides comprenant un motif de type CG non méthylé, fait l'objet de recherches dans des domaines très variés :

(1) dans le domaine de la vaccination ils sont utilisés, en association avec l'antigène, comme adjuvant pour stimuler spécifiquement une réponse immunitaire de type Th1 (Davis H. L. et al. (1998), *The Journal of Immunology* 160(2) pp 870-6 ; demande EP 855 184 ; Demande internationale WO 9818810 au nom de The University of Iowa Research Foundation dont A. M. Krieg est l'un des inventeurs; Demande internationale WO 9855495),

(2) dans le domaine de l'allergie, ils sont utilisés seuls pour moduler la réponse immunitaire (Demandes internationales WO 9818810 et WO 9855495) et

(3) dans le domaine du cancer, ils sont utilisés :

- soit en association avec un antigène tumoral, comme adjuvant d'un vaccin antitumoral (demande EP 855 184; Weiner G. J. et al. (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, pp 10833-7 ; Wooldridge J. E. et al. (1997) *Blood* 5 89(8) pp 2994-8),

- soit seuls comme antitumoraux (Connell et al.(1999), *Proceedings of the American association for Cancer Research* 40 pp 299 ; demande EP 468 520; Carpentier A. F. et al. (1999), *Cancer Research* 59, pp 5429-5432.

10 Dans ce dernier cas, l'activité antitumorale de quelques séquences seulement, parmi celles décrites, a été effectivement démontrée :

- Weiner G. J. et al. et Wooldridge J.E. et al. (déjà cités) qui utilisent un oligonucléotide comprenant un motif CG non méthylé de séquence 5'-TCTCCC 15 AGCGTGCGCCAT-3' montrent que cet oligonucléotide ne possède aucun effet antitumoral lorsqu'il est utilisé seul,

- Carpentier et al., Tokunaga et al. et Connell et al. (précités) qui utilisent respectivement un 20 oligonucléotide phosphorothioate du type octamérique (5'TGACTGTGAACGTTCGAGATGA3'), un oligonucléotide hexamérique palindromique non stabilisé (5' ACCGAT GACGTCGCCGGTGACGGCACCACGACGACGGCCACGTGCT 3') et un oligonucléotide phosphorothioate hexamérique du type 5' purine 25 purine CG pyrimidine pyrimidine 3', montrent que lesdits oligonucléotides possèdent une activité antitumorale.

Il ressort de l'Art antérieur qu'en dehors du motif CG non méthylé, la nature exacte des séquences actives de ces oligodésoxynucléotides immunostimulants, pour 30 l'obtention d'une activité antitumorale, n'est pas clairement définie ; en particulier, les données publiées sur la nature des séquences adjacentes au motif CG non méthylé (2

bases en 5' et 2 bases en 3' (motifs hexamériques) ou 4 bases en 3' (motif octamérique)) sont contradictoires.

Des études récentes rapportées par Hartmann G. et al. ((2000), *The Journal of Immunology* 164 pp 1617-24) donnent des explications sur la difficulté de définir la séquence de tels oligonucléotides.

En effet, les Auteurs montrent que, selon la nature de leur séquence, les oligodésoxynucléotides immunostimulants ont des effets différentiels sur l'activation NK, la prolifération des lymphocytes B, la sécrétion d'IL12, d'IL6 et d'INF $\gamma$ .

Ces données indiquent que tous les oligodésoxynucléotides immunostimulants ne sont pas équivalents et efficaces pour toutes les utilisations telles que définies ci-dessus puisqu'il faut stimuler des compartiments du système immunitaire différents afin d'obtenir l'activité désirée : adjuvante, antiallergique ou antitumorale.

De plus, les mécanismes immunitaires de rejet tumoral sont mal connus et les données de stimulation des compartiments du système immunitaire, *in vitro*, telles que définies ci-dessus ne permettent pas de prévoir à l'avance l'efficacité antitumorale d'un oligonucléotide donné et il importe donc de tester leur activité antitumorale *in vivo*.

En outre, la toxicité d'oligonudésoxy-nucléotides contenant un motif de type CG a été rapportée lors de leur utilisation par voie systémique (IV et IP) et est aussi à prendre en compte pour des applications thérapeutiques (Demande EP 855 184).

En conséquence, les oligonucléotides immunostimulants comprenant un motif CG de l'Art antérieur (motif hexamérique palindromique, motif 5' purine purine CG pyrimidine pyrimidine 3' ou motif octamérique) qui présentent



des activités antitumorales variables et aléatoires et sont toxiques, ne permettent pas de définir un ensemble de séquences immunostimulantes non toxiques, efficaces, pour une utilisation antitumorale.

5 Or, les Inventeurs ont montré, de manière surprenante, que certaines paires de bases en 3' du motif 5' purine purine CG pyrimidine pyrimidine 3' participent, de manière cruciale, à une activité antitumorale optimale.

10 En conséquence, les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir à un ensemble de séquences d'oligonucléotides immunostimulants qui répondent mieux aux besoins de la pratique en ce qu'ils :

- possèdent une activité antitumorale optimale,
- 15 - ne sont pas toxiques et
- sont adaptés à une utilisation antitumorale chez l'homme ou l'animal.

Ainsi la présente invention a pour objet, l'utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui comprennent au moins un motif octamérique du type :

20 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine- $X_1X_2$ -3', dans lequel la paire  $X_1X_2$  est AT, AA, CT ou TT, pour la préparation d'un médicament à action antitumorale.

25 Au sens de la présente invention, on entend par oligonucléotide, un oligodésoxynucléotide.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les oligonucléotides stabilisés comprennent au moins un motif octamérique sélectionné dans le groupe constitué par : AACGTT- $X_1X_2$ , GACGTT- $X_1X_2$ , AGCGTT- $X_1X_2$ ,  
30 GGCGTT- $X_1X_2$ , AACGTC- $X_1X_2$ , GACGTC- $X_1X_2$ , AGCGTC- $X_1X_2$  et GGCGTC- $X_1X_2$ , dans lequel  $X_1X_2$  est AT, AA, CT ou TT.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation préféré de l'invention, les oligonucléotides stabilisés comprennent de préférence au moins l'un des motifs octamériques suivants : AACGTT-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> et GACGTC-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'une au moins des bases du motif octamérique décrit ci-dessus peut être modifiée, notamment l'une au moins des cytosines peut être remplacée par une 5-bromocytosine.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'oligonucléotide stabilisé est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :8 à 48

Conformément à l'invention, les oligonucléotides stabilisés sont sélectionnés notamment dans le groupe constitué par les oligonucléotides phosphorothioates, les oligonucléotides phosphorodithioates, les oligonucléotides mixtes phosphodiester-phosphorothioates, les oligonucléotides méthylphosphonates ou les oligonucléotides dont au moins une extrémité a été stabilisée (Crooke R. M. (1991), *AntiCancer Drug Design*, 6 pp 609-46). De préférence, les oligonucléotides stabilisés utilisés selon la présente invention sont des phosphorothioates.

Conformément à l'invention, les oligonucléotides stabilisés peuvent être utilisés sous forme de simple brin ou de double brin.

De préférence, les oligonucléotides stabilisés peuvent avoir n'importe quelle longueur supérieure à 8 bases ou 8 paires de bases, de préférence plus de 20 ba-

ses ou de 20 paires de bases. De manière préférée lesdits oligonucléotides comprennent entre 20 et 100 nucléotides.

Conformément à la présente invention, les oligonucléotides peuvent comprendre plusieurs motifs octamériques tels que définis ci-dessus adjacents ou non ; ils peuvent comprendre également d'autres séquences biologiquement actives, comme des séquences antisens. Les séquences octamériques peuvent elles-mêmes être incluses dans des séquences antisens.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des oligonucléotides stabilisés tels que définis ci-dessus, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des cancers chez l'homme, quels que soient leur nature et leur degré d'anaplasie, en particulier les cancers des systèmes nerveux central et périphérique, notamment les astrocytomes, les glioblastomes, les médulloblastomes, les neuroblastomes, les mélanomes et les carcinomes.

Les oligonucléotides stabilisés, peuvent avantageusement être couplés par des liaisons covalentes, ioniques ou faibles à une molécule susceptible d'augmenter l'affinité tumorale, comme par exemple un anticorps spécifique du tissu tumoral.

Les oligonucléotides stabilisés sont utilisés préférentiellement par voie intra-tumorale, mais ils peuvent être administrés également par toutes autres voies, éventuellement par voies multiples, notamment par voies intraveineuse, intrapéritonéale, topique, transdermique, sous-cutanée, intra-artérielle, pulmonaire, naso-pharyngée ou orale, en solution, en suspension aqueuse ou huileuse, en poudre ou sous toute forme pharmaceutiquement acceptable.

Ils peuvent être administrés en une ou plusieurs fois ou en libération continue, notamment au moyen de micropompes osmotiques ou associés à tout moyen physique ou chimique, notamment à des agents encapsulants  
5 comme les systèmes de dispersion colloïdaux et les polymères, afin d'avoir une dose thérapeutiquement efficace au site tumoral.

Les doses efficaces seront déterminées en fonction de l'âge, de l'état de santé, du poids du patient et du type de cancer à traiter. Typiquement, les  
10 doses efficaces chez l'homme sont telles que, dans le cas d'une injection intra-tumorale, l'on obtienne une dose d'oligonucléotide de 10 à 1000 µg/g de tumeur, au moins dans une partie de la tumeur.

15 Conformément à l'invention, l'utilisation des oligonucléotides peut être combinée avec d'autres thérapies, notamment la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et des thérapies différenciantes.

20 Également conformément à l'invention, lesdits oligonucléotides sont associés avec des cellules du système immunitaire, telles que des macrophages, des lymphocytes ou des cellules présentatrices d'antigène, des adjuvants de l'immunité, des cytokines, des anticorps  
25 anti-tumoraux, des extraits tumoraux, des antigènes tumoraux ou des cellules tumorales normales, irradiées ou génétiquement modifiées.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressorti-  
30 ront de la description qui va suivre, qui se réfère aux exemples de réalisation de l'utilisation, objet de la

présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels:

- la figure 1 illustre les résultats obtenus après une injection intra-tumorale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAAGTTCGAGATGA-3'), dans le modèle du gliome CNS1 dans le cerveau de rat Lewis (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol.* 22 pp 191-200), sur le temps de survie des animaux témoins (-) ; PT1 50µg injecté à J1 (-.-.-.), PT1 50µg injecté à J5 (....) et PT1 50µg injecté à J9 (---), après l'injection des cellules tumorales. L'évaluation statistique des résultats est réalisée par le test de Kaplan-Meier.

- la figure 2 illustre l'effet d'une injection intra-tumorale à J1 de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), à différentes doses, dans le modèle du gliome CNS1 du rat Lewis, sur le temps de survie des animaux témoins (-) ; PT1 50µg (----), PT1 10µg (-.-.-.) et PT1 1 µg (....).

- la figure 3 illustre l'effet d'une injection intra-tumorale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') ou de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate IMM (SEQ ID N° 1 5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA-3'), dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées. A J2 après l'injection des cellules tumorales, les animaux reçoivent, par voie sous-cutanée, au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin -♦-), ou 50 µg de PT1 (-△-) ou 100 µg de PT1 (-●-) ou 50 µg d'IMM (-□-). Le volume de la tumeur est évalué tous les deux jours. Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m. (Test Anova).

- la figure 4 illustre l'effet d'une injection intra-tumorale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 ou de l'oligodésoxynucléotide phosphodiester PE1 ayant tous les deux la SEQ ID N° 2 (5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées. A J2 après l'injection des cellules tumorales, les animaux reçoivent par voie sous cutanée, au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin -◆-), ou 100 µg de PE1 (-□-) ou 100 µg de PT1 (-△-). Le volume de la tumeur est évalué tous les deux jours. Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m. (Test Anova).

- la figure 5 illustre l'effet d'une injection intra-tumorale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), ou de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate IMM (SEQ ID N° 1 5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA-3'), dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J (Sigal R. K. et al. (1991), *J. Pediatr. Surg.* 26 pp 389-96). A J2 après l'injection de ces cellules tumorales, les animaux reçoivent, par voie sous cutanée au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin -◆-), 50 µg de PT1 (-■-), 100 µg de PT1 (-▲-) ou 50 µg d'IMM (-□-). Le volume de la tumeur est évalué tous les quatre jours. Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m. (Test Anova).

- la figure 6 illustre l'effet d'une injection par voie sous-cutanée ou par voie intrapéritonéale de l'oligodésoxynucléotide phosphorothioate PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), à la dose de 50 µg dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J (Sigal R.K. et al. (1991), *J. Pediatr. Surg.* 26 pp 389-96). A J2

après l'injection de ces cellules tumorales, les animaux (n=6 par groupe) reçoivent 100 µl de chlorure de sodium (groupe témoin -◆-) ou 50 µg de PT1 injectés par voie i.p. (-■-) ou par voie s.c. à distance de la tumeur (-▲-) dans 100 µl de chlorure de sodium.

- la figure 7 illustre l'effet de la stabilisation d'un oligonucléotide (SEQ ID NO:9 5'-TGACTGTGAACGTTATAGATGA-3') par une liaison du type phosphorothioate (PT), phosphodiester (PDE), méthylphosphonate (MP) ; phosphodiester stabilisé en 3' par une base didésoxycytosine (3') ou mixte : phosphodiester avec les 3 premières liaisons en 5' et les trois dernières liaisons en 3' de type phosphorothioates (mixte), sur l'activité antitumorale dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées. A J2 après l'injection des cellules tumorales, les groupes d'animaux reçoivent par voie sous cutanée, au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin NaCl, n= 9) ou 50 µg des oligonucléotides PT (n= 9) , PDE (n= 8), MP (n= 9), 3' (n= 7) et mixte (n= 9). Le volume de la tumeur est évalué à J10. Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m..

- les figures 8 à 11 illustrent l'effet des séquences 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-3' sur la modulation de l'activité antitumorale dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées. A J2 après l'injection des cellules tumorales, les groupes d'animaux (n= 6) reçoivent par voie sous cutanée, au niveau du site tumoral, du chlorure de sodium (témoin NaCl) ou 50 µg des oligonucléotides (SEQ ID NO :2 à 13). Le volume de la tumeur est évalué à J8 (figure 8 à 10) ou à J10 (figure 11). Les résultats sont exprimés en moyenne ± s.e.m. :

- la figure 8 illustre l'effet des séquences des oligonucléotides sur l'efficacité antitumorale,

- la figure 9 illustre l'effet de la séquence du motif hexamérique 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' et des séquences adjacentes sur l'efficacité antitumorale des oligonucléotides,

- la figure 10 illustre l'effet des 2 bases ( $X_1X_2$ ) adjacentes à la séquence 3' du motif hexamérique 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' sur l'efficacité antitumorale des oligonucléotides,

- la figure 11 illustre l'effet de différentes séquences  $X_1X_2$  sur l'efficacité antitumorale des oligonucléotides

Les exemples qui suivent illustrent l'invention, sans toutefois la limiter à ces modes de réalisation particuliers.

**Exemple 1 : Effet d'une injection intra-tumorale ou d'une injection intrapéritonéale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') sur la survie des animaux dans le modèle du gliome CNS1 dans le cerveau de rat Lewis**

1. Mode opératoire :

Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro* sont greffées dans le cerveau de rat Lewis sains, à raison de  $10^5$  cellules dans le cortex pariétal droit de rats (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol*, 22 pp 191-200).

a) *injection intra-tumorale* :

50  $\mu$ g de PT1 dans 7  $\mu$ l de chlorure de sodium sont injectés au niveau du site tumoral à 1, 5 ou 9 jours après la greffe (groupe traité à J1, n=6 ; groupe traité



15

à J5, n=8 ; groupe traité à J9, n=4) ; un groupe témoin (n=14) reçoit du chlorure de sodium.

b) *injection intrapéritonéale* :

50 µg de PT1 sont injectés par voie intrapéritonéale, à J1 (n = 5) ; un groupe témoin reçoit du chlorure de sodium (n = 5).

2. Résultats :

a) *injection intra-tumorale* :

Ils sont illustrés dans la figure 1.

10 Le groupe témoin montre une survie moyenne de 15 jours et tous les animaux meurent avant le 23ème jour.

La survie des animaux traités par PT1 est très augmentée avec des survies à long terme (>90 jours) de 67% ( $p<0,01$ ), de 88% ( $p<0,002$ ) et de 50% ( $p<0,02$ ) pour 15 les rats traités à J1, J5 et J9 respectivement.

Tous les animaux morts présentent des tumeurs cérébrales à l'autopsie.

Chez les rats survivants, aucun ne présente de signes neurologiques et aucune tumeur n'est trouvée à 20 l'autopsie pratiquée à J90.

L'étude histologique des cerveaux ne révèle aucune lésion inflammatoire, démyélinisante ou toxique dans le parenchyme adjacent au site d'injection.

b) *injection intrapéritonéale* :

25 Dans ces conditions le PT1 n'a pas d'effet significatif.

Exemple 2 : Comparaison des effets d'une injection intra-tumorale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') sur la survie des animaux dans le modèle du gliome CNS1 du rat Lewis avec celle d'un oligodésoxynucléotide (IMM) comprenant une séquence non immunostimulante octanucléotidique (SEQ ID N° 1 5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA -3')

### 1. Mode opératoire :

Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro* sont greffées dans le cerveau de rat Lewis sains, à raison de  $10^5$  cellules dans le cortex pariétal droit de rats (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol*, 22 pp 191-200).

Les rats reçoivent à J1 après la greffe réalisée dans les conditions décrites à l'exemple 1, une injection intra-tumorale de 50 µg de IMM dissous dans 7 µl de chlorure de sodium ou le véhicule seul (n=5 par groupe).

### 2. Résultats :

La durée de vie entre le groupe témoin, ayant reçu le chlorure de sodium, et le groupe traité, ayant reçu l'IMM n'est pas statistiquement différente.

Ainsi, un oligonucléotide ne comportant pas de séquence immunostimulante ne permet pas d'augmenter la survie, à l'inverse d'un oligonucléotide comportant une telle séquence (exemple 1).

Exemple 3 : Effet d'une injection intra-tumorale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') à différentes doses sur la survie des animaux dans le modèle du gliome CNS1 du rat Lewis

5                   1. Mode opératoire :

Les rats reçoivent à J1 après la greffe réalisée dans les conditions décrites à l'exemple 1, une injection intra-tumorale de 1 µg, 10 µg ou 50 µg de PT1 dissous dans 7 µl de chlorure de sodium ou le véhicule seul (n= 5 par  
10 groupe).

2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 2.

Une survie supérieure à 90 jours est obtenue dans 60% des cas ( $p < 0,01$ ) après une injection unique de  
15 50 µg, et dans 20% des cas (non significatif) après une dose de 10 µg.

Il n'y a aucun survivant après une dose de 1 µg (n= 5).

Tous les rats témoins sont morts.

20                   Chez les rats survivants, aucun ne présente de signes neurologiques et aucune tumeur n'est trouvée à l'autopsie pratiquée à J90.

Exemple 4 : Recherche du mécanisme des effets du PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'), *in vitro* et *in*  
25 *vivo* sur les cellules du gliome CNS1

1. Mode opératoire :

a) *in vitro* :

A J0, on met des cellules de gliome CNS1 en culture. A J1, on ajoute à ces cellules PT1 à des  
30 concentrations de 0,05 µM, 0,5 µM et de 5 µM et à J3 on

18

traite les cellules par de la trypsine et on mesure leur viabilité.

b) *in vivo* : voir le mode opératoire de l'exemple 1.

5                   2. Résultats :

a) *in vitro*

PT1, à des concentrations de 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  et de 5  $\mu\text{M}$  ne possède pas d'action cytotoxique directe sur les cellules CNS1 après 48 heures de culture.

10                   b) *in vivo*

En revanche, les études immunohistochimiques montrent que l'injection de 50  $\mu\text{g}$  de PT1 au sein de la tumeur, déclenche une infiltration massive de cellules NK, de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> de macrophages et de cellules microgliales alors que l'injection de chlorure de sodium est sans effet.

Ces résultats suggèrent que l'action du PT1 est due à une activation du système immunitaire au site tumoral.

20 **Exemple 5 : Effet d'une injection intratumorale de PT1, au niveau d'un site tumoral, sur le développement d'une tumeur greffée simultanément, à distance de ce site.**

1. Mode opératoire :

25 Les cellules tumorales sont greffées dans les conditions décrites à l'exemple 1, à deux sites distincts séparés de 4 mm.

Un groupe de rat (n= 7) reçoit à J5 après la greffe, une injection intra-tumorale de 50  $\mu\text{g}$  de PT1 dissous dans 7  $\mu\text{l}$  de chlorure de sodium à un seul de ces sites et le groupe contrôle (n= 6) reçoit le véhicule seul.

## 2. Résultats

Tous les rats du groupe contrôle meurent en moins de 25 jours alors que 44% des rats du groupe traité par PT1 ont une survie prolongée ( $> 90$  jours), ( $p < 0,05$ ).

5 Ces résultats montrent que l'oligonucléotide PT1 a un effet à distance et que la réponse immunitaire induite au niveau du site d'injection empêche le développement d'une tumeur greffée simultanément, à distance de ce site.

10 **Exemple 6 : Etude de la mémoire immunitaire à 3 mois dans le modèle du gliome CNS1 du rat Lewis après injection de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3')**

### 1. Mode opératoire :

Chez des rats ( $n = 5$ ), traités à J5 après la greffe, par 50  $\mu\text{g}$  de PT1 et ayant survécu grâce ce traitement au PT1, une nouvelle greffe de  $10^6$  cellules est pratiquée 12 semaines plus tard, sur un autre site du cortex cérébral dans les conditions décrites à l'exemple 1. Parallèlement, une greffe de  $10^5$  cellules est réalisée chez des rats non traités auparavant.

### 2. Résultats :

A 90 jours tous les animaux préalablement traités au PT1 ont survécu sans traitement supplémentaire.

25 L'analyse histologique montre qu'il n'y a aucune tumeur résiduelle tant pour le premier site d'implantation des cellules tumorales que pour le second site.

Tous les animaux témoins sont morts.

Ces résultats montrent que les oligonucléotides ont un effet prolongé qui permet d'empêcher le développement d'une tumeur, plusieurs semaines après l'injection dudit oligonucléotide. L' "effet mémoire " observé indique que l'oligonucléotide PT1 active la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale spécifique.

Exemple 7 : Effet d'une injection intra-tumorale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') ou d'un oligodésoxynucléotide (IMM) comprenant une séquence non immunostimulante octanucléotidique (SEQ ID N° 1 5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA -3') dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées.

1. Mode opératoire :

Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro*, sont injectées par voie sous-cutanée à des rats Lewis sains, à raison de  $2 \times 10^6$  cellules dans le flanc droit (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol.* 22 pp 191-200).

Ce modèle permet de suivre avec plus de précision la croissance de la tumeur, qui peut être aisément évaluée tous les jours chez l'animal vivant. Dans ce modèle 100% des animaux injectés développent une tumeur qui croît pendant au moins 2 semaines.

Ensuite, à J2 après l'injection des cellules tumorales, 50  $\mu$ g ou 100  $\mu$ g de PT1 ou 50  $\mu$ g d'IMM, dans 100  $\mu$ l de chlorure de sodium, sont injectés au niveau du site tumoral (groupe traité par 50  $\mu$ g de PT1, n=9 ; groupe traité par 100  $\mu$ g de PT1, n=6 ; groupe traité par 50  $\mu$ g d'IMM, n=9) ; un groupe témoin (n=9) reçoit 100  $\mu$ l de chlorure de sodium.

La croissance tumorale est mesurée tous les deux jours, et le volume tumoral est estimé au moyen de la formule :

$$\text{Vol} = (\text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{largeur} \times \pi) / 6.$$

5 Les animaux sont sacrifiés à J12 après l'injection des cellules tumorales.

## 2. Résultats.:

Ils sont illustrés dans la figure 3.

10 Dans le groupe témoin, 9 animaux sur 9 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 900 mm<sup>3</sup>.

Dans le groupe traité par l'IMM, 9 animaux sur 9 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 1100 mm<sup>3</sup>.

15 Dans le groupe traité par PT1 50 µg, 7 animaux sur 9 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 400 mm<sup>3</sup>, alors que dans le groupe traité par PT1 100 µg, seulement 3 animaux sur 6 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 200 mm<sup>3</sup>.

L'ensemble de ces résultats confirme donc que le PT1 a un effet antitumoral marqué, lié à la présence d'une séquence immunostimulante.

Cet effet est dose-dépendant.

Exemple 8: Effet d'une injection intra-tumorale de PT1 (oligodésoxynucléotide phosphorothioate) ou de PE1 (oligodésoxynucléotide non stabilisé) dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées ; PT1 et PE1 ayant tous les  
5 deux la même séquence immunostimulante (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3')

1. Mode opératoire :

Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro*, sont injectées par voie sous-cutanée à des rats  
10 Lewis sains, à raison de  $2 \times 10^6$  cellules dans le flanc droit, dans les conditions décrites à l'exemple 7.

Ensuite, à J2 après l'injection des cellules tumorales, 100  $\mu$ g de PT1 ou 100  $\mu$ g de PE1 sont injectés au niveau du site tumoral (groupe traité par 100  $\mu$ g de  
15 PT1 dans 100  $\mu$ l de chlorure de sodium, n=6 ; groupe traité par 100  $\mu$ g de PE1 dans 100  $\mu$ l de chlorure de sodium, n=6) ; un groupe témoin (n=6) reçoit 100  $\mu$ l de chlorure de sodium.

La croissance tumorale est mesurée tous les  
20 deux jours, et le volume tumoral comme il est décrit dans l'exemple 7.

Les animaux sont sacrifiés à J12 après l'injection des cellules tumorales.

2. Résultats :

25 Ils sont illustrés dans la figure 4.

Dans le groupe témoin, 6 animaux sur 6 ont développé une tumeur avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 1200 mm<sup>3</sup>.

Dans le groupe traité par PE1, 6 animaux sur 6  
30 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 1000 mm<sup>3</sup>.



Dans le groupe traité par PT1 100 µg, seulement 3 animaux sur 6 ont développé une tumeur, avec un volume moyen de la tumeur à J12 d'environ 200 mm<sup>3</sup>.

Exemple 9 : Effet d'une injection intra-tumorale de PT1  
5 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') et d'IMM (SEQ  
ID N° 1 5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA-3') dans le modèle du  
neuroblastome neuro2a chez la souris A/J

1. Mode opératoire :

La tumeur est obtenue par injection d'un mil-  
10 lion de cellules neuro2a dans le flanc droit de souris  
A/J (Sigal R. K. et al. (1991), *J. Pediatr. Surg.*, 26  
pp 389-96). Cette tumeur grossit en 15-20 jours, aboutis-  
sant généralement au décès de l'animal ou obligeant à son  
sacrifice.

15 A J2 après l'injection de ces cellules tumo-  
rales, 50 µg ou 100 µg de PT1 ou 50 µg d'IMM dans 100 µl  
de chlorure de sodium ou 100 µl de chlorure de sodium  
(groupe témoin) sont injectés au même endroit (n=6 ani-  
maux par groupe).

20 La croissance tumorale est mesurée tous les  
quatre jours et le volume tumoral est mesuré comme indi-  
qué dans l'exemple 7.

Les animaux sont sacrifiés à J22 après l'in-  
jection des cellules tumorales.

25 2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 5.

Dans ce modèle, le volume moyen de la tumeur à  
J22 est d'environ 800 mm<sup>3</sup> dans le groupe témoin, d'environ  
1200 mm<sup>3</sup> dans le groupe traité par 50 µg d'IMM, d'environ  
30 200 mm<sup>3</sup> dans les groupes traités par 50 µg ou 100 µg de  
PT1.

Exemple 10 : Effet d'une injection par voie sous-cutanée ou par voie intrapéritonéale de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') à la dose de 50 µg dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J

5                   1. Mode opératoire :

La tumeur est obtenue selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 9.

A J2 après l'injection des cellules tumorales, 50 µg de PT1 dans 100 µl de chlorure de sodium ou 100 µl de chlorure de sodium (groupe témoin) sont injectés soit 10 par voie sous-cutanée à distance de la tumeur, soit par voie intrapéritonéale (n=6 animaux par groupe).

La croissance tumorale est mesurée tous les quatre jours et le volume tumoral est mesuré comme indiqué dans l'exemple 7. 15

Les animaux sont sacrifiés à J22 après l'injection des cellules tumorales.

2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 6.

20                   Dans ce modèle, le volume moyen de la tumeur à J22 est d'environ 1000 mm<sup>3</sup> dans le groupe témoin, d'environ 400 mm<sup>3</sup> dans le groupe traité par 50 µg de PT1 injecté par voie sous-cutané et d'environ 500 mm<sup>3</sup> dans le groupe traité par 50 µg de PT1 injecté par voie intrapéritonéale. 25

Exemple 11 : Effet d'une injection répétée par voie sous-cutanée de PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3') ou d'IMM (SEQ ID N° 1 5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA-3') à la dose de 10 µg pendant 15 jours dans le modèle du neuroblastome neuro2a chez la souris A/J

1. Mode opératoire :

La tumeur est obtenue selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 9.

La croissance tumorale est mesurée régulièrement chez tous les animaux et lorsque le diamètre de la tumeur atteint 5 mm, PT1 est injecté, par voie sous-cutanée, autour de la tumeur, pendant 15 jours, à la dose de 10 µg par jour dans 100 µl de chlorure de sodium (groupe traité par PT1, n=7) ou IMM est injecté par voie sous-cutanée autour de la tumeur pendant 15 jours à la dose de 10 µg par jour dans 100 µl de chlorure de sodium (groupe traité par IMM, n=4) ou 100 µl de chlorure de sodium est injecté par voie sous-cutanée autour de la tumeur pendant 15 jours (groupe témoin, n=6).

2. Résultats :

Dans le groupe témoin et dans le groupe traité par l'IMM, la croissance tumorale n'est pas ralentie et tous les animaux de ces deux groupes meurent de leur tumeur.

Dans le groupe traité par PT1, la disparition complète de la tumeur, sans récidence à long terme, est observée chez 3 souris ; chez 3 autres les tumeurs se stabilisent pendant 3 semaines mais reprennent ensuite leur progression jusqu'aux décès des animaux.

Ces résultats montrent que les oligonucléotides immunostimulants stabilisés utilisés selon l'inven-

tion, possèdent un effet anti-tumoral intrinsèque marqué, lié à la présence de la séquence immunostimulante et à leur stabilisation.

Exemple 12 : Effet de la stabilisation d'un oligonucléotide (SEQ ID N :9 5'-TGACTGTGAACGTTATAGATGA-3') sur l'activité antitumorale dans un modèle de tumeurs gliales sous-cutanées

#### 1. Mode opératoire :

Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro*, sont injectées par voie sous-cutanée à des rats Lewis sains, à raison de  $2 \times 10^6$  cellules dans le flanc droit (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol.* 22 pp 191-200).

A J2 après l'injection des cellules tumorales, 50  $\mu$ g des oligonucléotides possédant les différentes liaisons chimiques sont injectés au niveau du site tumoral et le volume tumoral est mesuré à J10 (groupes traités par un oligonucléotide de liaison : phosphorothioate (PT, n= 9), phosphodiester (PDE, n= 8), méthylphosphonate (MP, n= 9) ; phosphodiester stabilisé en 3' par une base didésoxycytosine (groupe 3', n= 7), ou mixte : phosphodiester avec les trois premières liaisons en 5' et les trois dernières liaisons en 3' du type phosphorothioate (groupe mixte, n= 9). Le groupe témoin reçoit 100  $\mu$ l de chlorure de sodium (NaCl n= 9).

#### 2. Résultats :

Ils sont illustrés dans la figure 7

Dans ce modèle, les ODN les plus efficaces sont, les oligonucléotides de type phosphorothioate, stabilisés en 3', ou mixte, avec une diminution du volume tumoral de respectivement 50 %, 53 % et 34 %, par rapport au volume des témoins.

Exemple 13 : Effet des séquences 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>-3' sur la modulation de l'activité antitumorale

1. Mode opératoire :

5 Des cellules de gliome CNS1 cultivées *in vitro*, sont injectées par voie sous-cutanée à des rats Lewis sains, à raison de 2x10<sup>6</sup> cellules dans le flanc droit (Kruse C. A. et al. (1994), *J. Neurooncol.* 22 pp 191-200).

10 A J2 après l'injection des cellules tumorales, 50 µg des différents oligonucléotides (SEQ ID NO :2 à 13) sont injectés au niveau du site tumoral et le volume tumoral est mesuré à J10 (figure 8 à 10) ou à J8 (figure 11).

15 2. Résultats

2.1. Effet de la séquence des oligonucléotides sur l'efficacité antitumorale

Les résultats sont illustrés à la figure 8.

L'oligonucléotide PT1 (SEQ ID N° 2 5'-TGACTGTG  
20 AACGTTCGAGATGA-3') utilisé précédemment (exemples 1 à 10) est moins efficace que l'oligonucléotide An 2 (SEQ ID NO :8 5'-TGCCAGTGACGTCATGTGAC-3').

La différence d'efficacité de ces deux oligonucléotides est liée soit à la séquence du motif hexamérique 5'-  
25 purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' comprenant le motif CG non méthylé (séquence soulignée) soit aux séquences adjacentes à ce motif.

2.2. Effet de la séquence du motif hexamérique 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' et des sé-  
30 quences adjacentes sur l'efficacité antitumorale des oligonucléotides.

Les résultats sont illustrés à la figure 9

Ils montrent que des oligonucléotides possédant un motif hexamérique différent, GACGTC (An2, SEQ ID NO :8 5'-TGCCAGTGACGTCATGTGAC-3') ou AACGTT (An21, SEQ ID NO :10 5'-TGCCAGTAACGTTATGTGAC-3') et des séquences adjacentes identiques ont la même efficacité antitumorale.

En conséquence les différences d'efficacité observées, à l'exemple 2.1, entre les oligonucléotides PT1 et An2 sont liées à la nature des séquences adjacentes au motif hexamérique. Les séquences antitumorales optimales se trouvent dans les séquences adjacentes de l'oligonucléotide An2.

2.3.Effet des 2 bases (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) adjacentes à la séquence 3' du motif hexamérique 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' sur l'efficacité antitumorale

Les résultats sont illustrés à la figure 10.

Ils montrent que les 2 bases adjacentes à la séquence 3' du motif hexamérique, à elles seules, modulent l'efficacité des oligonucléotides puisque 2 oligonucléotides identiques sur toute leur séquence à l'exception de ces 2 nucléotides ont des efficacités différentes, de l'ordre de celles précédemment observées avec les oligonucléotides de l'exemple 2.1. Ainsi, l'oligonucléotide An 14 (SEQ ID NO :3 5'-TGACTGTGAACGTTCCAGATGA-3') est moins efficace que l'oligonucléotide An 15 (SEQ ID NO :9 , 5'-TGACTGTGAACGTTATAGATGA-3'). Les nucléotides AT en 3' du motif hexamérique (An2 (figure 8) et An 15 (figure 10) permettent d'augmenter l'efficacité antitumorale, alors que les nucléotides CC (An 14, figure 10) et CG (PT1, figure 8) ont des effets antitumoraux moins marqués.

#### 2.4. Effet de différentes séquences $X_1X_2$ sur l'efficacité antitumorale

Les résultats sont illustrés à la figure 11

L'effet antitumoral optimal est observé avec

5 les séquences  $X_1X_2 = AT, AA, CT$  ou  $TT$  (An2 SEQ ID NO :8 5'-TGCCAGTGACGTCATGTGAC-3' ; An22 SEQ ID NO :11 5'-TGCCAGTAACGTTAAGTGAC-3' ; An25 SEQ ID NO :12 5'-TGCCAGTAACGTTCTGTGAC-3 ; An27 SEQ ID NO :13 5'-TGCCAGTAACGTTTGTGAC-3')).

10 Les séquences  $X_1X_2 = AC, AG, GT$  et  $CC$  et  $CG$  (An23 SEQ ID NO :4 5'-TGCCAGTAACGTTACGTGAC-3' ; An24 SEQ ID NO :5 5'-TGCCAGTAACGTTAGGTGAC-3' ; An26 SEQ ID NO :6 5'-TGCCAGTAACGTTGTGTGAC-3' ; An 28 SEQ ID NO :7 5'-TGCCAGTAACGTTCCGTGAC-3' et PT1 SEQ ID N° 2  
15 5'-TGACTGTGAACGTTCCGAGATGA-3' (voir figure 8)) n'améliorent pas l'activité antitumorale des oligonucléotides possédant un motif hexamérique 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3'.

Ces résultats montrent que l'ensemble  
20 d'oligonucléotides stabilisés du type 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine- $X_1X_2$ -3' avec  $X_1X_2 = AA, AT, CT$  ou  $TT$  a une activité antitumorale optimisée.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés qui comprennent au moins un motif octamérique du type :  
5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine- $X_1X_2$ -3', dans  
5 lequel la paire  $X_1X_2$  est AT, AA, CT ou TT, pour la préparation d'un médicament à action antitumorale.
2. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 1 caractérisée en ce que lesdits oligonucléotides comprennent au moins une séquence octa-  
10 mérique sélectionnée dans le groupe constitué par : AACGTT- $X_1X_2$ , GACGTT- $X_1X_2$ , AGCGTT- $X_1X_2$ , GGCGTT- $X_1X_2$ , AACGTC- $X_1X_2$ , GACGTC- $X_1X_2$ , AGCGTC- $X_1X_2$  et GGCGTC- $X_1X_2$ , dans laquelle  $X_1X_2$  est AT, AA, CT ou TT.
3. Utilisation selon l'une quelconque des re-  
15 vendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'oligonucléotide est choisi dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 8 à SEQ ID N°48.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'au moins une  
20 cytosine du motif octamérique est remplacée par une cytosine modifiée.
5. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les oligonucléotides stabilisés sont sélectionnés dans le groupe constitué par les phosphorothioates, les phosphorodithioates, les oligonucléotides mixtes phosphodiester-phosphorothioates, les méthylphosphonates et les oligonucléotides dont au moins une extrémité a été stabilisée.  
25
6. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caracté-  
30



risée en ce que les oligonucléotides sont sous forme de simple brin ou de double brin.

7. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caracté-  
5 risée en ce que les oligonucléotides comprennent au moins 8 nucléotides, et de préférence entre 20 nucléotides et 100 nucléotides.

8. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caracté-  
10 risée en ce que les oligonucléotides sont couplés par des liaisons covalentes, ioniques ou faibles à une molécule susceptible d'augmenter l'affinité tumorale.

9. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la  
15 préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers chez l'homme, quels que soient leur nature et leur degré d'anaplasie.

10. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 9, caractérisée en ce que le can-  
20 cer est choisi dans le groupe constitué par les cancers des systèmes nerveux central et périphérique.

11. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 9, caractérisée en ce que le can-  
cer est choisi dans le groupe constitué par les astrocy-  
25 tomes, les glioblastomes, les médulloblastomes, les neuroblastomes, les mélanomes et les carcinomes.

12. Utilisation des oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce que le médicament est administré par  
30 voie intratumorale.

13. Utilisation d'oligonucléotides stabilisés selon la revendication 12, caractérisée en ce que le

médicament est administré de manière à avoir une dose de 10 à 1000 µg/g de tumeur, au moins dans une partie de la masse tumorale.

14. Utilisation des oligonucléotides stabilisés selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce que le médicament est administré par une voie choisie dans le groupe constitué par les voies intraveineuse, intrapéritonéale, topique, transdermique, sous-cutanée, intra-artérielle, pulmonaire, naso-pharyngée ou orale.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 14, caractérisée en ce que les oligonucléotides stabilisés sont associés à tout moyen physique ou chimique facilitant l'obtention d'une dose efficace au site tumoral.

16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 15, caractérisée en ce que les oligonucléotides sont administrés sous toute forme pharmaceutiquement acceptable.

17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 16, caractérisée en ce que les oligonucléotides sont associés avec des cellules du système immunitaire, des adjuvants de l'immunité, des cytokines, des anticorps anti-tumoraux, des extraits tumoraux, des antigènes tumoraux ou des cellules tumorales normales, irradiées ou génétiquement modifiées.

1/11

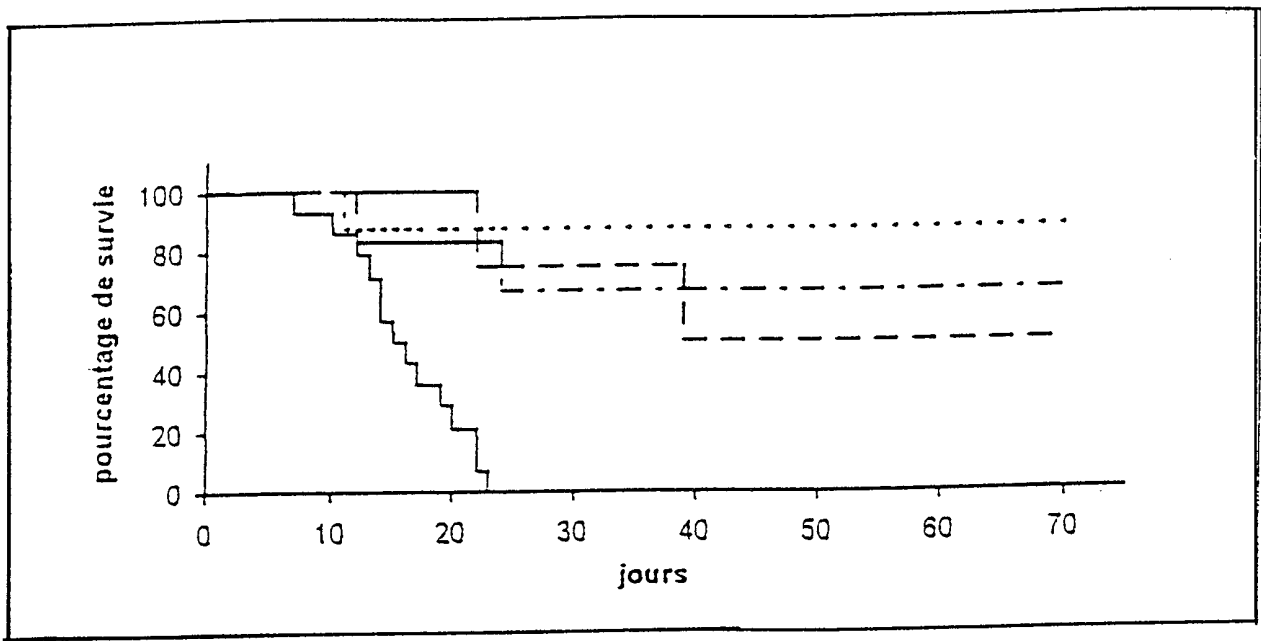
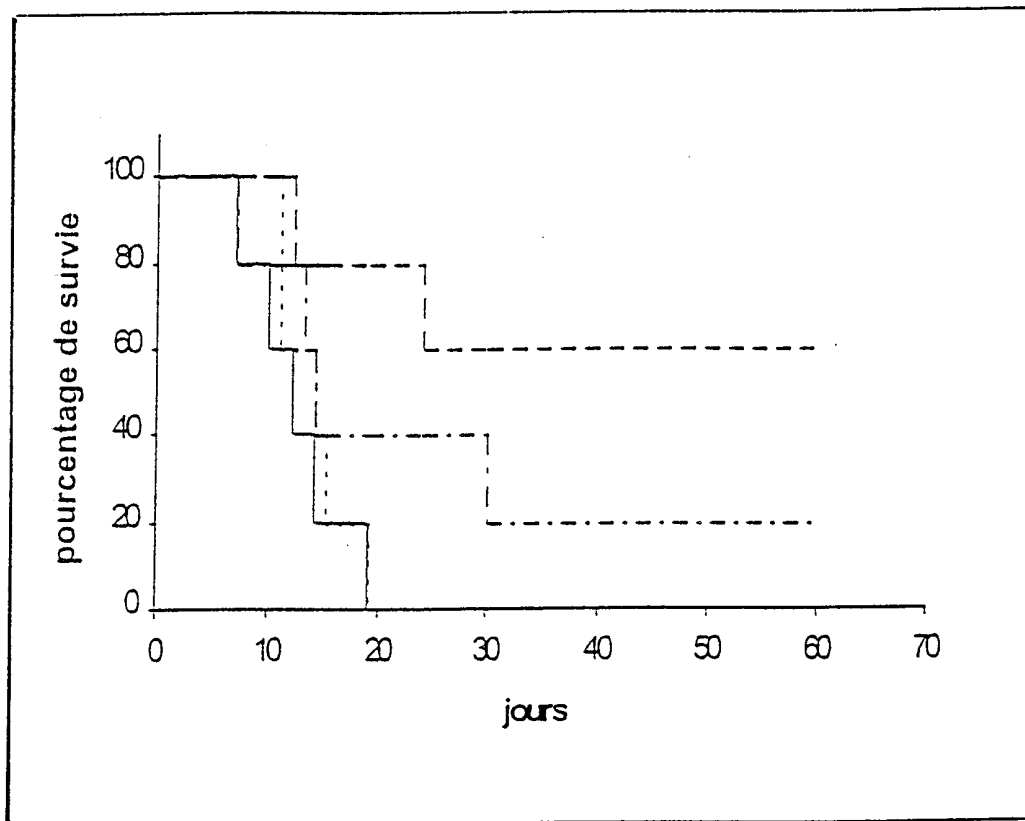
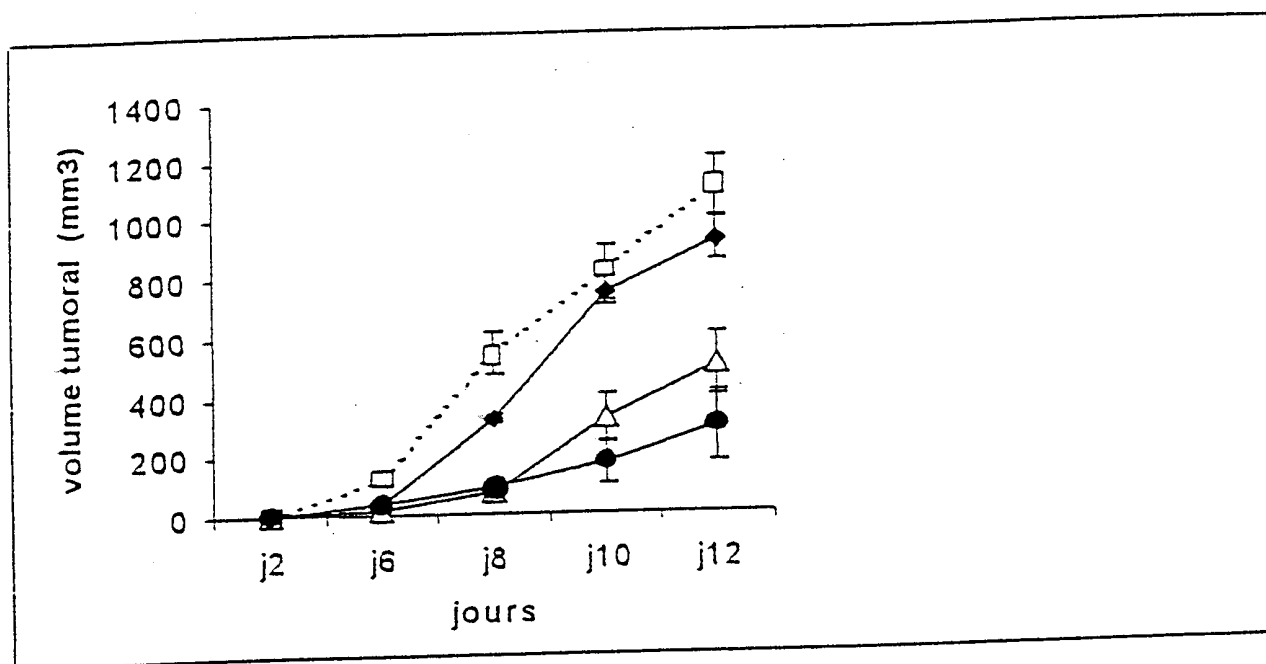


FIGURE 1

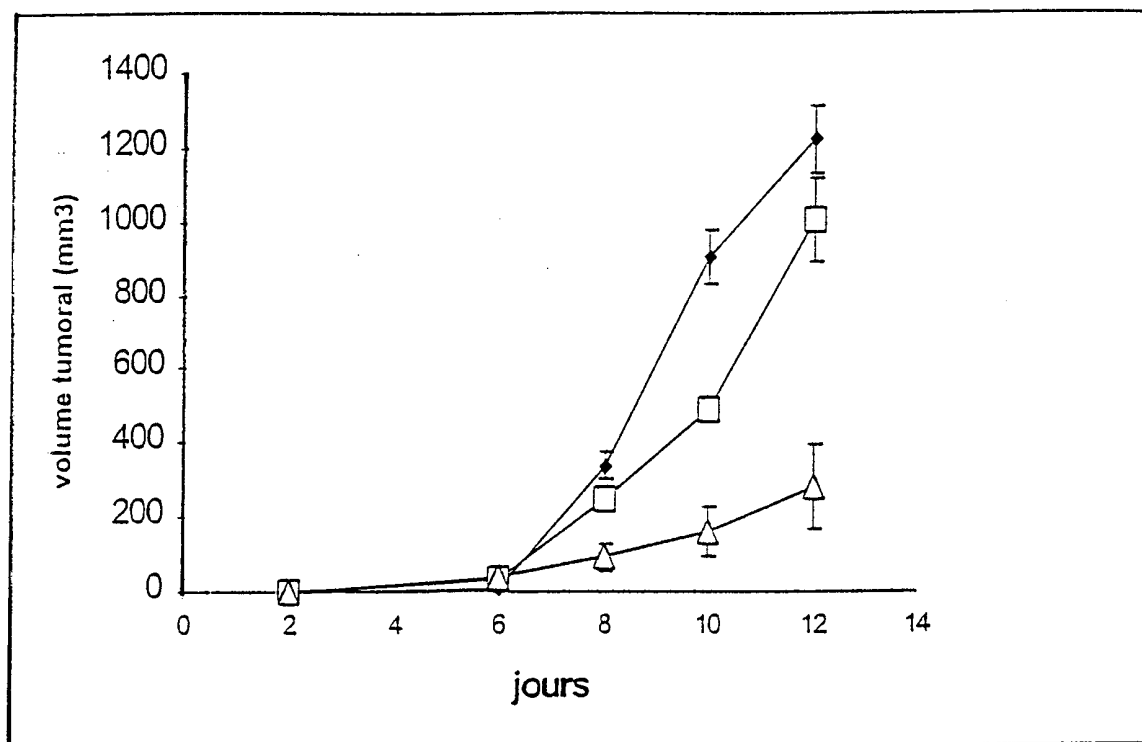
2/11

FIGURE 2

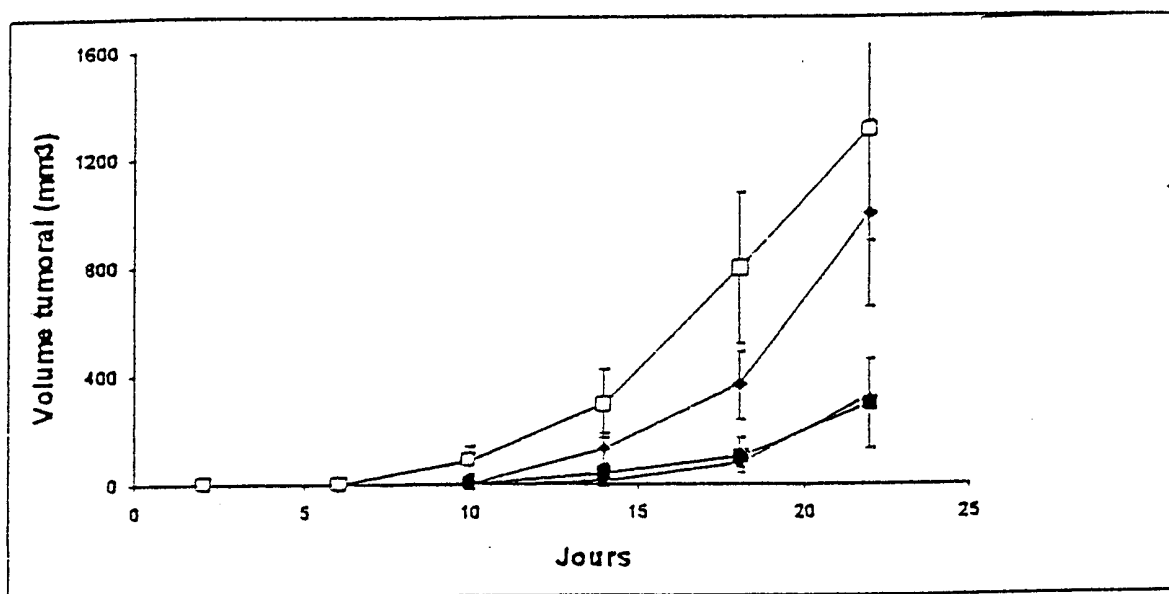
3/11

FIGURE 3

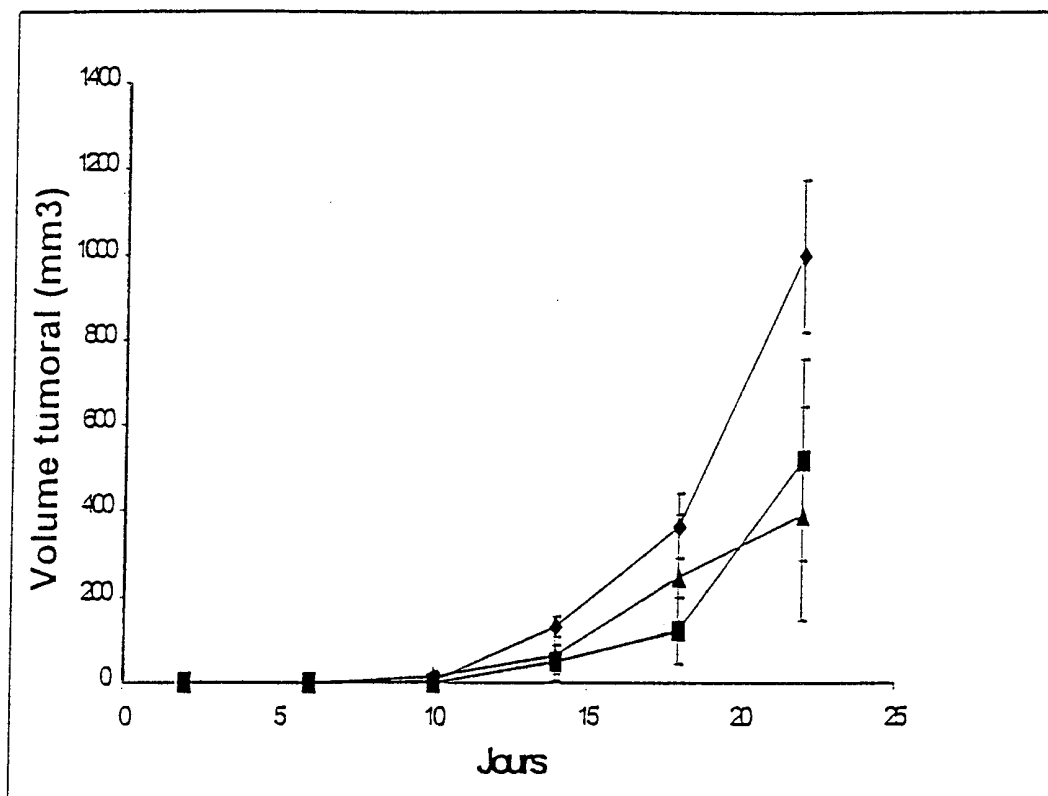
4/11

**FIGURE 4**

5/11

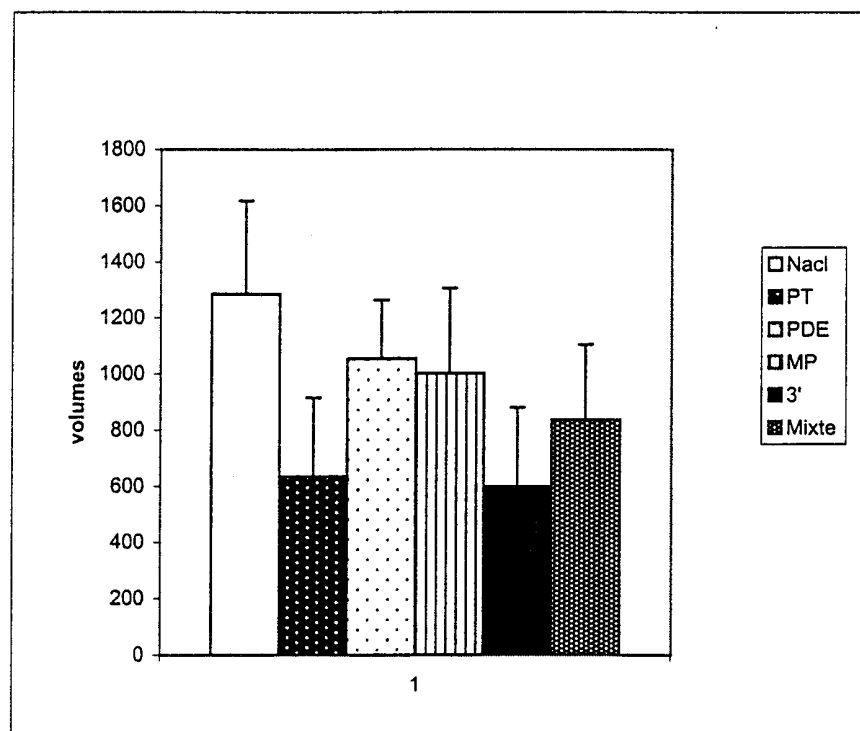
**FIGURE 5**

6/11

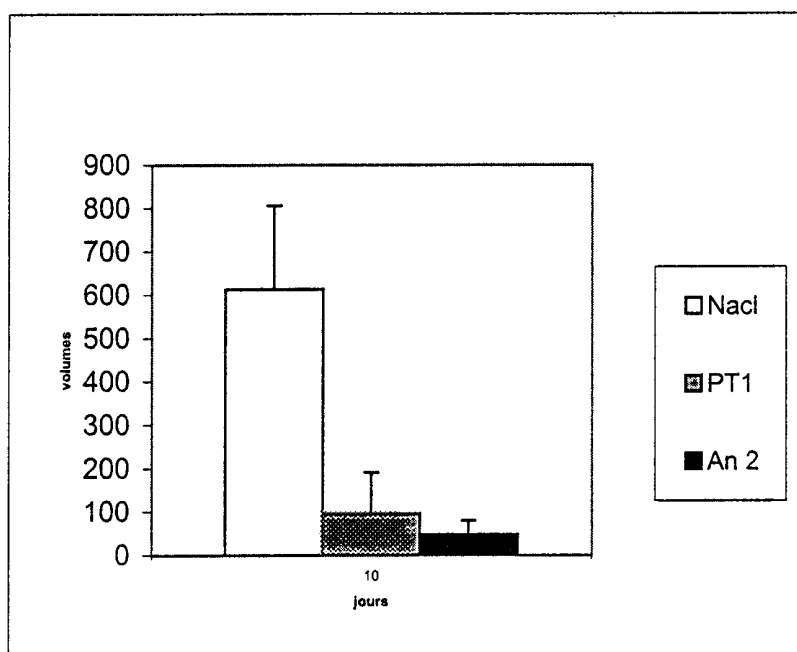
FIGURE 6



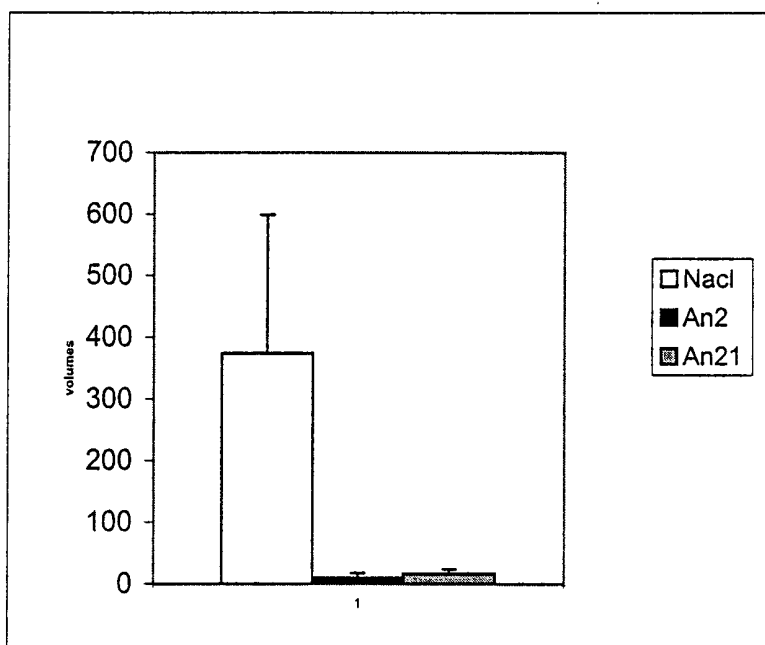
7/11

**FIGURE 7**

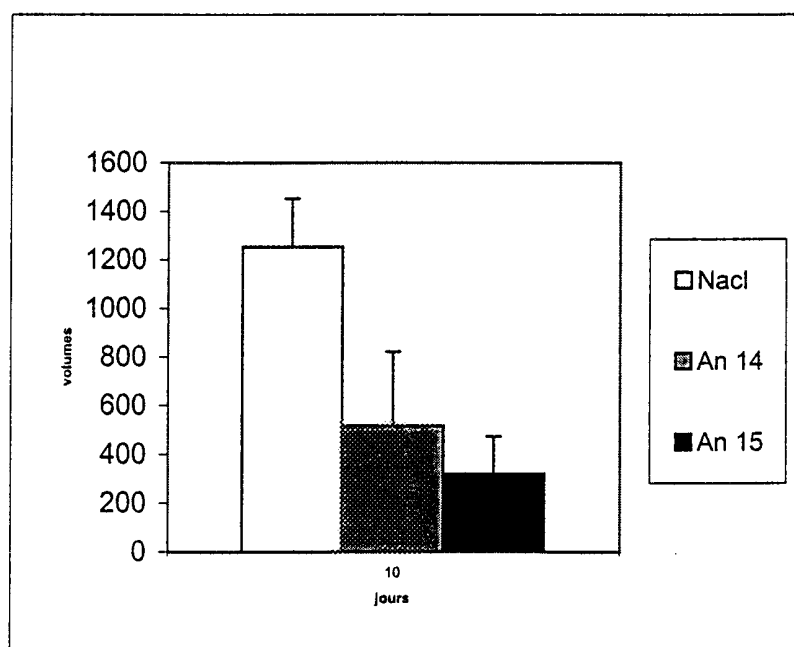
8/11

**FIGURE 8**

9/11

**FIGURE 9**

10/11

**FIGURE 10**

11/11

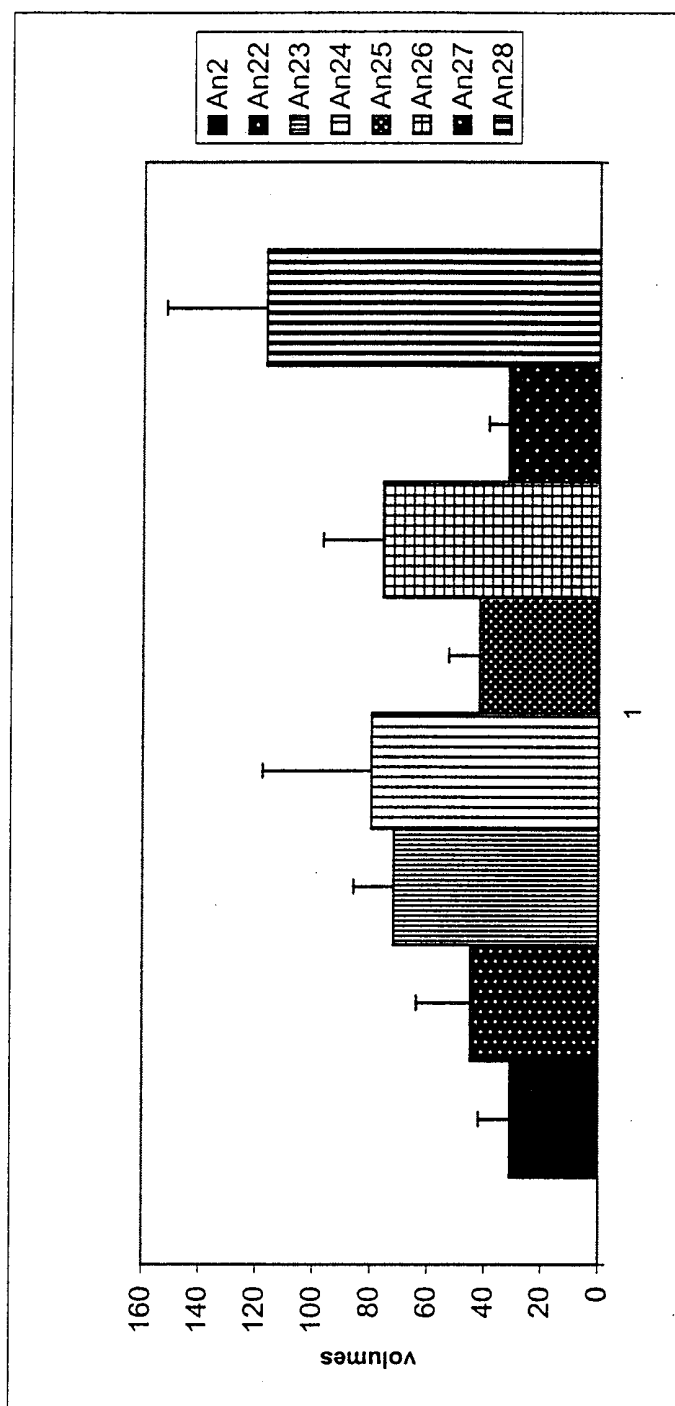


FIGURE 11

## LISTE DE SEQUENCES

<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> UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES STABILISES POUR LA  
PREPARATION D'UN MEDICAMENT A ACTION ANTITUMORALE

<130> 10208EXT

<140>

<141>

<160> 48

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 1

tgactgtgaa ggtagagat ga

22

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 2

tgactgtgaa cgtagagat ga

22

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 3

tgactgtgaa cgtagagat ga

22

<210> 4  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 4  
tgccagtaac gttacgtgac 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 5  
tgccagtaac gttaggtgac 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 6  
tgccagtaac gttgtgtgac 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 7  
tgccagtaac gttccgtgac 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 8  
tgccagtgcac gtcacgtgcac 20

<210> 9  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 9  
tgactgtgaa cggtatagat ga 22

<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 10  
tgccagtaac gttatgtgcac 20

<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 11  
tgccagtaac gttacgtgcac 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 12  
tgccagtaac gttctgtgcac 20



<210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 13  
tgccagtaac gttttgtgac 20

<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 14  
gtatgacgac gtcatttagc 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 15  
tactgcagac gtcattatgc 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 16  
ataacgttat gtaacgttat 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 17

atgacgtcat gtgacgtcat

20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 18

atgacgtcat gtaacgttat

20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 19

tgaacgttat tgaacgttat

20

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 20

tggacgtcat tggacgtcat

20

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 21  
tggacgtcat tgaacgttat 20

<210> 22  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 22  
aggacgtcaa tgaacgttaa 20

<210> 23  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 23  
agaacgttaa tgaacgttaa 20

<210> 24  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 24  
aggacgtcaa tggacgtcaa 20

<210> 25  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 25  
aggacgtcctt gtaacgtttt 20

<210> 26  
<211> 20

<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 26  
agaacgtttt gtaacgtttt 20

<210> 27  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 27  
aggacgtctt gtgacgttt 19

<210> 28  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 28  
ttgacgtcct ttaacgttct 20

<210> 29  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 29  
ttaacgttct ttaacgttct 20

<210> 30  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 30  
ttgacgtcct ttgacgtcct 20

<210> 31  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 31  
taaacgttat aacgttataa cgttat 26

<210> 32  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 32  
tagacgtcat gacgtcatga cgtcac 26

<210> 33  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 33  
taaacgttat aacgttatga cgtcac 26

<210> 34  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 34  
taaacgttat gacgtcatga cgtcac 26

<210> 35  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 35  
tagacgtcat aacgttataa cggtat

26

<210> 36  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 36  
taaacgttaa aacgttaaaa cggttaa

26

<210> 37  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 37  
tagacgtcaa gacgtcaaga cgtcaa

26

<210> 38  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 38  
taaacgttaa aacgttaaga cgtcaa

26

<210> 39  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 39

taaacgttaa gacgtcaaga cgtcaa

26

<210> 40

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 40

tagacgtcaa aacgttaaaa cgttaa

26

<210> 41

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 41

taaacgttct aacgttctaa cgttct

26

<210> 42

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 42

tagacgtcct gacgtcctga cgtcct

26

<210> 43

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 43

taaacgttct aacgttctga cgtcct

26

<210> 44  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 44  
taaacgtttt aaacgtttta aacgtttt 28

<210> 45  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 45  
tagacgtctt agacgtctta gacgtctt 28

<210> 46  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 46  
taaacgtttt aaacgtttta gacgtctt 28

<210> 47  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 47  
tcaacgttat aacgttataa cgttat 26

<210> 48  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle



<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligodésoxynucléotide

<400> 48

tcgacgtcat gacgtcatga cgcat