



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 31 973 T2 2008.12.04

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 303 599 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 31 973.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CA01/01023

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 953 714.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2002/006462

(86) PCT-Anmeldetag: 13.07.2001

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 24.01.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 23.04.2003

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 19.12.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.12.2008

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

2312051 13.07.2000 CA

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

QuebePharma Recherche, Inc., Montreal, Quebec,
CA

(72) Erfinder:

RABBANI, Shafaat A., Westmount, Quebec H3Y
2T9, CA; SLEMON, Clarke, Montreal, Quebec H3G
1B6, CA

(74) Vertreter:

Schieber · Farago, 80538 München

(54) Bezeichnung: REGULATION DER UPA GEN-EXPRESSION DURCH METHYLIERTE NUKLEOTIDE

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

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

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Genexpression und insbesondere auf die Prädiktion und Regulation der Expression des Urokinase-typ-Plasminogen-Aktivatorgens („uPA“).

[0002] Eine aberrierende Genexpression wird bei Krebserkrankungen häufig beobachtet. Es wird angenommen, dass die falsche Regulation bestimmter Gene bei der Entstehung vieler Krebserkrankungen eine Rolle spielt.

[0003] Verschiedene Verfahren für das Modulieren der Genregulation sind in der Technik bekannt. Viele beinhalten Mutationen von Sequenzen, die für die Transkription oder Translation von Genprodukten wichtig sind. Jedoch legen neueste Erkenntnisse nahe, dass die Expression einiger Gene durch die selektive Methylierung von Nukleotiden (zum Beispiel Holliday, US 5840497, und Sheikhnejad, US 5874416) reguliert wird. Die DNA-Methylierung an der Position 5 des Cytosins („C“) in Cytosin-Guanosin-Sequenzen („CpG“) wurde mit der Regulation der Genexpression in Zusammenhang gebracht. Insbesondere scheinen einige methylierte Gene in geringeren Mengen exprimiert zu werden als deren nicht-methylierte Gegenstücke. (Besterman, et al., Modern Drug Discovery, April 2000, 51–58).

[0004] Nach der Entstehung von Krebs ist die Rolle der Genregulation bei der Bekämpfung der Krankheit weniger klar definierbar. Es scheint, dass einige Krebsarten eine höhere Neigung zur Metastasierung als andere aufweisen. Tumormetasierung ist ein Hauptfaktor in Bezug auf die Langzeitmorbidität und -mortalität.

[0005] Der Urokinase-typ-Plasminogenaktivator („uPA“) ist ein Protein, das bei der Metastasierung eine Rolle spielen kann. uPA scheint wichtig für den Abbau von Komponenten in der extrazellulären Matrix, wie etwa Lammin, Fibronektin und Kollagen zu sein, wodurch die Extravasation von Tumorzellen ermöglicht wird. uPA war auch an der Förderung der Tumorangiogenese, der Zellmigration und der Zelladhäsion beteiligt. Tumorzellen, die uPA nicht exprimieren, sind im Allgemeinen gutartig oder metastasieren nicht. Tumorzellen, die uPA exprimieren, sind im Allgemeinen aggressiver und weisen eine erhöhte Neigung zur Metastasierung auf. Allerdings kann es sein, dass zu dem Zeitpunkt, an dem eine uPA-Expression in Tumorzellen beobachtet wird, die Metastasierung bereits eingetreten ist, was die Heilungschancen für den Patienten verringert.

[0006] In Xing Rosie H. et al., "Transcriptional regulation of urokinase (uPA9 gene expression inn breast cancer cells: Role of the DNA methylation." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 81, Nr. 3, 5. Mai 1999 (1999-05-05), Seiten 443–450, wurde die Korrelation zwischen der Hormonempfindlichkeit und der uPA-Expression in Epithelzellen des Brustgewebes (HMEC) mit normalem HR-Status sowie in Brustkrebszellen MCF-7 und T-47D untersucht. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass die DNA-Methylierung die Transkription des uPA-Gens dahingehend regulieren kann, dass das invasive Verhalten dieser HR-Brustkrebszellen verändert wird.

[0007] WO 99/24560 stellt ein einzelnes Standard-Oligonukleotid bereit, das komplementär zu einer spezifischen Region eines Genpromotors und an Kohlenstoff 5 sämtlicher Cytosinreste in dem Cytosin-Guanin (CG)-Dinukleotid methyliert ist. Ein zu dem standardmäßigen Sense-Oligonukleotid des c-Ha-ras-Promotors komplementäres Oligonukleotid mit einer Methylgruppe an sämtlichen Cytosinresten seiner 6 CpG-Stellen war besonders wirksam für das Inhibieren der Proliferation und Karzinogenese von Tumorzellen bei Brustkrebs.

[0008] WO 97/46705 offenbart ein Verfahren für das Detektieren einer methylierten, CpG-enthaltenden Nukleinsäure, wobei das Verfahren das Kontaktieren einer Nukleinsäure enthaltend eine Probe mit einem Mittel, das nicht-methyliertes Cytosin modifiziert, das Amplifizieren CpG-spezifischer Oligonukleotid-Primer, wobei die Oligonukleotid-Primer zwischen modifizierter methylierter und nicht-methylierter Nukleinsäure unterscheiden, sowie das Detektieren der methylierten Nukleinsäure umfasst. WO 97/46705 offenbart ebenfalls ein Verfahren für das Detektieren einer Zelle mit einer methylierten CpG-Insel oder einer mit der Proliferation von Zellen assoziierten Erkrankung, die mit methyliertem CpG in Gewebe oder biologischen Flüssigkeiten eines Individuums assoziiert ist, umfassend das Kontaktieren einer Zielkomponente der Zelle, von der vermutet wird, dass sie ein Gen mit einem methylierten CpG oder mit einer CpG-assoziierten Erkrankung exprimiert, mit einem Mittel, das an die Komponente bindet.

[0009] Somit ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren für die Regulation der Genexpression und insbesondere der uPA-Genexpression bereitzustellen.

[0010] Überraschenderweise wurden spezifische Ziel-Nukleotidsequenzen in dem uPA-Gen identifiziert. Die

Erfindung stellt Antisense-Nukleotidsequenzen bereit, die diesen Ziel-Sequenzen, die methyliert werden können, entsprechen und derart verwendet werden können, dass sie zu einem Rückgang der Expression des uPA-Gens führen.

[0011] Die Fähigkeit, die Expression des uPA-Gens zu verringern, ist ein nützliches therapeutisches Hilfsmittel bei der Bekämpfung der Tumormetastasierung sowie der Angiogenese.

[0012] Außerdem wurden Regionen des uPA-Gens identifiziert, die nützlich für das Vorhersagen der Wahrscheinlichkeit, dass eine Population von Krebszellen metastasiert, sind. Insbesondere dient das Ausmaß der Methylierung der CpG-Inseln innerhalb von Zielsequenzen in der nicht-translatierten Region des uPA-Gens zur Prädiktion des Risikos der Metastasierung. Zellen mit einem niedrigeren Methylierungsgrad in diesen Zielregionen in Form von CpG-Inseln weisen eine größere Wahrscheinlichkeit für eine Metastasierung auf.

[0013] Die Expression einiger Gene kann durch die selektive Methylierung bestimmter Regionen innerhalb des Gens von Interesse reguliert werden. Allerdings ist die Identifikation der therapeutisch oder diagnostisch nützlichen Zielregionen für die Methylierung/Demethylierung des uPA-Gens und eines Mittels für die in vivo Methylierung derartiger Regionen bis zum heutigen Tag schwierig.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt eine Sequenz bereit, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 sowie methylierten Antisense-Desoxyoligonukleotiden, die im Wesentlichen komplementär zu einem stabilen Komplex mit einer Zielsequenz innerhalb der nicht-translatierten Region des zwischen den Nukleotiden 1 und 1226 lokalisierten uPA-Gens ist und geeignet, mit demselben einen solchen zu bilden, und CpG-Inseln enthält, wobei die Oligonukleotide aus der Gruppe bestehend aus Oligonukleotiden, die im Wesentlichen komplementär zu wenigstens einer aus SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 mit 5-methyliertem Cytosin anstatt des nicht-methylierten Cytosins in einer Region, die zu CpG komplementär ist, besteht, wobei die CpG-Inseln in der Zielsequenz in Bezug auf die Basensequenzen exakt komplementär sind, jedoch nicht notwendigerweise in Bezug auf den Methylierungsstatus des Oligonukleotids.

[0015] Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung eines einzelsträngigen DNA-Primers in einem Schritt eines diagnostischen Assays hinsichtlich Risiko von Metastasierung bereit, der im Wesentlichen zu einem stabilen Komplex mit einer Region des uPA-Gen innerhalb von 20 Nukleotiden einer innerhalb der Sequenz von einer aus SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17 angeordneten CpG-Insel komplementär ist, wobei in einem Schritt des Assays die Region des uPA-Gens amplifiziert wird und in einem anschließenden Schritt das Ausmaß der Methylierung der Region bestimmt wird, und wobei der Primer zu dieser CpG-Insel in Basensequenzen exakt komplementär ist, jedoch nicht notwendigerweise in Bezug auf den Methylierungsstatus.

[0016] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls die Verwendung eines methylierten Antisense-Oligonukleotids bereit, das im Wesentlichen zu wenigstens einem der Ziele umfassend die in dem uPA-Gen angeordneten SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und beim Modulieren der Expression des uPA-Gens komplementär ist, wobei die Ziele wenigstens eine CpG-Insel enthalten und die Oligonukleotide geeignet sind, einen stabilen Komplex mit dieser Sequenz zu bilden.

[0017] Außerdem stellt die vorliegende Erfindung eine DNA-Population bereit, die DNA-Segmente umfasst, die im Wesentlichen zu einem stabilen Komplex mit einer Zielsequenz einschließlich wenigstens einer aus den SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17 komplementär sind, und die geeignet sind, mit denselben einen solchen zu bilden.

[0018] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls einen Kit für das Bestimmen des Malignitätsgrades eines Krebses auf Grundlage des Methylierungsstatus der uPA-Genpromotorregion bereit, wobei der Kit Primer umfasst, die für die Verwendung in der Methylierungs-spezifischen Amplifikation der Polymerasekettenreaktion eines Teils der uPA-Genpromotorregion geeignet sind, enthaltend wenigstens eine aus SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17, sowie Anweisungen für das Durchführen des Verfahrens von Anspruch 17.

[0019] In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer methylierten Antisense-Desoxyoligonukleotid-Sequenz bereit, die im Wesentlichen zu einem stabilen Komplex mit einer Zielenkletidsequenz in Krebszellen eines Patienten komplementär ist, und geeignet ist, mit denselben einen solchen zu bilden, wobei die Zielsequenz wenigstens eine aus SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16 oder 17 enthaltend eine CpG-Insel in einem uPA-Gen einschließt, wobei die Oligonukleotidsequenz 5'-methyliertes Cytosin anstelle des nicht-methylierten Cytosins in der zu der CpG-Insel komplementären Region in der Zielnukleotid-Sequenz aufweist, für das Herstellen eines Medikaments für das Reduzieren der Metastasierung von Krebszellen durch die Verabreichung an einem Patienten, bei dem es sich um einen Säugern handelt, der anderenfalls eine Neigung zur Metastasierung aufweisen würde, wodurch die Oligonukleotidsequenz in den Zellkern von Tumorzellen eindringt und mit der Zielsequenz interagiert, um die Methylierung der Zielnukleotidsequenz zu begünstigen.

[0020] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls die Verwendung einer methylierten Antisense-Desoxyoligonukleotid-Sequenz bereit, die im Wesentlichen zu einem stabilen Komplex mit einer Zielnukleotidsequenz in einer Säugetierzelle komplementär ist, und geeignet ist, einen solchen mit dieser zu bilden, wobei die Zielsequenz wenigstens eine aus SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17 enthaltend eine CpG-Insel in einem uPA-Gen einschließt, wobei die Oligonukleotidsequenz 5'-methyliertes Cytosin anstelle des nicht-methylierten Cytosins in der zu der CpG-Insel komplementären Region in der Zielnukleotid-Sequenz aufweist, für das Herstellen eines Medikaments für das Regulieren des Methylierungsstatus eines Teils einer uPA-DNA-Sequenz in einer Säugetierzelle, so dass die Oligonukleotidsequenz in den Zellkern eintritt und mit der Zielsequenz interagiert.

[0021] In noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden methylierte Antisense-Oligonukleotide, die zu einem Teil der nicht-translatierten Region des uPA-Gens komplementär sind und CpG-Inseln enthalten, bereitgestellt.

[0022] In noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren für das Untersuchen des Risikos der Metastasierung einer Population von Krebszellen in einem Patienten bereitgestellt, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

- (a) Amplifizieren eines Teils einer uPA-Zielsequenz aus der Zellpopulation;
- (b) Bestimmen des Ausmaßes der uPA-Methylierung der Zielsequenz; und
- (c) Vergleichen des Ausmaßes der uPA-Methylierung von Schritt (b) mit einer Referenz.

[0023] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren für das Untersuchen des Risikos einer Metastasierung, das von einer Population von Krebszellen von Säugetieren mit einem funktionalen uPA-Gen angezeigt wird, bereit, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

- a) Bestimmen des Ausmaßes der Cytosin-5'-Methylierung in einer CpG-Insel enthaltend einen Teil der nicht-translatierten Region des uPA-Gens mit der Sequenz von wenigstens einer aus SEQ. ID. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17; und
- b) Vergleichen des Ausmaßes der Methylierung von a) mit einer Referenz.

[0024] Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren für das Untersuchen des Risikos einer Metastasierung einer Population von Krebszellen von Säugetieren mit einem funktionalen uPA-Gen bereit, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

- a) Amplifizieren einer Zielnukleotidsequenz einschließlich wenigstens einer aus SEQ. Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17;
- b) Bestimmen des Ausmaßes der uPA-Methylierung der Zielnukleotidsequenz; und
- b) Vergleichen des Ausmaßes der Methylierung von b) mit einer Referenz.

[0025] **Fig. 1** ist eine Darstellung der Ergebnisse von Beispiel 6 in bildlicher und graphischer Form.

[0026] **Fig. 2** ist eine Darstellung der Ergebnisse von Beispiel 7 in bildlicher und graphischer Form.

[0027] **Fig. 3** ist eine Darstellung eines Teils der nicht-translatierten Region des humanen uPA-Gens, das den Cytosin-Methylierungsstatus in verschiedenen Zelllinien wie in Beispiel 8 beschrieben zeigt.

[0028] Die Sequenz des uPA-Gens ist bekannt (Ricco et al., Nucleic Acids Res., 13(8), 2759 (1985), auch NCBI-Hinterlegungsnummer X02419). Die transkribierte Region beginnt bei Nukleotid 1227. Nukleotide 1–226 sind die nicht-translatierte Region, welche die Promotorregion enthält. Generalisierte Stellen innerhalb der uPA-Promotorregion und des ersten uPA-Exons, die methyliert werden könnten, wurden bereits früher identifiziert. (Int. J. Cancer, 81, 443–450, 1999). Jedoch wurden bestimmte Methylierungsstellen mit regulatorischer Aktivität vorher nicht identifiziert, noch wurde ein Verfahren für das Methylieren derartiger Stellen für das Reduzieren der uPA-Expression vorgeschlagen.

[0029] Wie hierin verwendet sind Zielnukleotidsequenzen (manchmal als „Zielsequenzen“ bezeichnet) Sequenzen, die eine oder mehr als eine CpG-Insel enthalten, die in der nicht-translatierten Region des uPA-Gens lokalisiert ist/sind. „CpG-Inseln“ sind DNA-Regionen, die zwei oder mehr als zwei Cytosin-Guanosin-Dinukleotid (CpG) Sequenzen mit nicht mehr als 28 Basen zwischen Cytosin („C“) Resten, die für die 5'-Methylierung geeignet sind, enthalten. Somit kann der Fachmann in Übereinstimmung mit der vorliegenden Offenbarung Zielsequenzen in der nicht-translatierten uPA-Region identifizieren.

[0030] Wie hierin verwendet handelt es sich bei „vorgesehenen Sequenzen“ um methylierte Oligonukleotidsequenzen, die für eine Interaktion mit Zielnukleotidsequenzen geeignet sind. Bevorzugt werden vorgesehene Sequenzen mit einer Länge zwischen 15 und 150 Basen verwendet. Bevorzugter werden vorgesehene Sequenzen mit einer Länge zwischen 15 und 60 Basen verwendet. Noch bevorzugter werden vorgesehene Sequenzen mit einer Länge zwischen 15 und 30 Basen verwendet. Beispiele von vorgesehenen Sequenzen werden in Tabelle 1 gezeigt. Allerdings gilt es für den Fachmann zu beachten, dass in Übereinstimmung mit der vorliegenden Offenbarung weitere vorgesehene Sequenzen in Betracht gezogen und in einfacher Weise gemäß den standardmäßigen Abläufen synthetisiert werden können.

[0031] Bevorzugt werden Desoxynukleotide und methylierte Oligonukleotidsequenzen, die im Wesentlichen zu einem Teil der uPA-Promotorregion innerhalb der nicht-translatierten uPA-Region komplementär sind und die CpG-Inseln enthalten, verwendet. In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, methylierte Oligonukleotide, die im Wesentlichen zu SEQ. ID. Nr. 5–17, bevorzugter SEQ. ID. Nr. 6, 7, 10, 11 und 13–16, noch bevorzugter SEQ. ID. Nr. 7 und 15 komplementär sind, zu verwenden. In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, methylierte Oligonukleotide zu verwenden, die zu einem Teil der nicht-translatierten Region des uPA-Gens, das die Sequenz 5'GGCGG einschließt, komplementär sind.

[0032] Wie hierin verwendet sind „reduzierende Sequenzen“ vorgesehene Sequenzen, die für das Reduzieren der uPA-Genexpression in wenigstens einer Zelllinie wirksam sind.

[0033] Wie hierin verwendet sind „hemmende Sequenzen“ vorgesehene Sequenzen, die geeignet sind, die Fähigkeit von in höchstem Maße invasiven Tumorzellen zu Invasion durch MATRIGEL™, signifikant zu hemmen.

[0034] Die selektive Methylierung von Zielnukleotidsequenzen kann in einfacher Weise unter Verwendung von hierin offenbarten Verfahren für das Methylieren von Zielnukleotidsequenzen durchgeführt werden, wobei Zellen, die eine Zielnukleotidsequenz enthalten, unter Bedingungen, die eine Interaktion zwischen den methylierten Oligonukleotiden und der Zielnukleotidsequenz in dem Zellkern ermöglichen, gegenüber im Wesentlichen komplementären methylierten Oligonukleotiden ausgesetzt werden.

[0035] Ein Oligonukleotid ist im Wesentlichen zu einer Zielsequenz komplementär, falls die Basen der beiden Sequenzen über wenigstens 75% der Länge des Oligonukleotids komplementär sind (C entspricht G und A entspricht T), die CpG-Inseln in der Zielsequenz in Bezug auf die Basissequenz (jedoch nicht notwendigerweise in Bezug auf die Methylierung) zu dem entsprechenden Teil des Oligonukleotids exakt komplementär sind, und das Oligonukleotid geeignet ist, einen stabilen Komplex mit der Zielsequenz in der Zelle zu bilden.

[0036] Tabelle 1 führt einige zu den entsprechenden vorgesehenen Sequenzen komplementäre Zielsequenzen auf. Wenn eine Zielsequenz 5-Methylcytosin unmittelbar an dem 5'-Ende von G enthält, dann schließt die vorgesehene Sequenz bevorzugt 5-Methylcytosin als das zu G komplementäre Nukleotid ein, sodass die zu 5'-CmG-3' komplementäre Sequenz 3'-CmG-5' wäre. (Zum Beispiel ist die vorgesehene zu SEQ. ID. Nr. 1 komplementäre Sequenz CCmGGCTTATTGCTTTCmG).

[0037] Bevorzugt enthalten methylierte Antisense-Oligonukleotidsequenzen zwei oder mehr als zwei methylierte Cytosine mit nicht mehr als 28 Basen zwischen 5'-Methylcytosinresten in der zu der CpG-Region in der Zielnukleotidsequenz komplementären Region.

[0038] Es gilt zu beachten, dass Nukleotidanaloga verwendet werden können, um einige oder sämtliche Nukleotide unter geeigneten Bedingungen in einer vorgesehenen Sequenz zu ersetzen, obwohl C und G in den CpG-Regionen bevorzugt nicht durch Analoga ersetzt werden. Somit können bei im Wesentlichen komplementären Oligonukleotiden einige oder sämtliche Nukleotidmonomere durch geeignete Analoga ersetzt werden, insbesondere Analoga wie etwa Phosphothionate, Methylphosphonate oder P-Ethoxyphosphonate können unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft sein. Derartige Nukleotide sind im Allgemeinen resistent gegenüber Nukleaseen und können aus diesem Grund eine höhere Stabilität des Oligonukleotids bereitstellen. Methylphos-

phonate und P-Ethoxyphosphonate können mit hoher Wirksamkeit in Liposome inkorporiert sein und haben eine geringere Neigung dazu, RNaseH oder Komplemente zu aktivieren, als native Nukleotide. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Offenbarung und bekannten Standardtechniken ist der Fachmann in der Lage, geeignete Analoga enthaltende Oligonukleotidsequenzen herzustellen und zu identifizieren.

[0039] Methylierte Antisense-Nukleotide können jede beliebige Länge aufweisen, die eine wirksame Aufnahme in Krebszellen, Interaktion des Oligonukleotids mit seiner entsprechenden Zielsequenz und Methylierung von Cytosin in der Zielsequenz erlaubt. Die exakte Länge des Antisense-methylierten Oligonukleotids ist nicht entscheidend, so lange zwischen der Zielsequenz (Sense-Strang) und dem methylierten Antisense-Oligonukleotid ein stabiler Komplex gebildet wird. Methylierte Oligonukleotidsequenzen weisen bevorzugt eine Länge zwischen ungefähr 15 und 60 Nukleotiden auf, bevorzugter eine Länge zwischen ungefähr 15 bis 30 Nukleotiden. (Matsuno et al., Methods in Enzymology, Bd. 313, S. 359)

[0040] Ohne die Erfindung auf einen bestimmten Wirkmechanismus einzuschränken, bezieht sich der Mechanismus wahrscheinlich auf das Binden der Antisense-Sequenz an die Zielnukleotidsequenz, wodurch das DNA-Methyltransferase (Mtase)-Enzym mit einem hemimethylierten Substrat ausgestattet wird, was es der DNA-Mtase ermöglicht, unter Verwendung eines methylierten Antisense-Strangs als Templat komplementäre GC-Stellen zu methylieren.

[0041] Verfahren für das Synthetisieren von DNA-Oligonukleotidsequenzen mit 5'-methyliertem Cytosin anstatt von nicht-methyliertem Cytosin und komplementär zu einer CpG-Insel in einer bestimmten Nukleotidsequenz sind im Stand der Technik bekannt, und gegebenenfalls können derartige Oligonukleotide käuflich erworben oder in Übereinstimmung mit Standardverfahren synthetisiert werden. Ebenso sind in der Technik Verfahren für die Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden, die natürliche Nukleotide mit analogen Monomeren kombinieren, bekannt.

[0042] Verfahren für das Aussetzen von Säugetierzellen gegenüber Oligonukleotiden unter für die Aufnahme von Oligonukleotiden in den Zellkern geeigneten Bedingungen, wodurch DNA in Zellen transfiziert wird (zum Beispiel unter Verwendung von Mitteln wie LIPOFECTIN™), sind ebenfalls im Stand der Technik bekannt. Der Begriff „geeignete Bedingungen“ wie hierin verwendet bedeutet Bedingungen, welche die Aufnahme von bestimmten vorgesehenen Sequenzen in den Zellkern der Zelle in einer Form, welche die Interaktion zwischen der vorgesehenen Sequenz und der Zielsequenz ermöglicht, ermöglicht, was zu der 5'-Methylierung von Cytosin in der Zielsequenz führt, die ausreichend ist, um dessen Expression zu reduzieren. Ein Fachmann könnte im Hinblick auf die hierin enthaltene Offenbarung die „geeigneten Bedingungen“ in Bezug auf bestimmte Oligonukleotide identifizieren.

[0043] Sämtliche geeignete, in der Technik bekannte Verfahren für das Einschleusen von Antisense-Nukleotiden können für diese Erfindung verwendet werden. Nichtsdestoweniger werden Liposome besonders in Betracht gezogen. Kationische Lipide (auch Cytofektine genannt) sind bekannte Träger für das Einschleusen und können in einigen Situationen geeignet sein. (Sean et al., in Methods Enzymol (2000), 313 (Teil A) S. 322–341).

[0044] Ein weiteres nützliches Verfahren für das Einschleusen von Oligonukleotiden ist das Koppeln der Oligonukleotide an ein relativ kleines Molekül, das dessen Eintritt in Zellen fördern kann. Dendrimere, Regenschirm-Amphiphile, Transport-fördernde Proteine und Ligand-Linker-Antisense-Konjugate können jeweils mit den methylierten komplementären Oligonukleotiden der vorliegenden Erfindung kombiniert sein, um das Einschleusen von Oligonukleotiden zu ermöglichen. (In Methods Enzymol (2000), 313 (Teil A) S. 297–321; auch Hughes et al., in Methods Enzymol (2000), 313 (Teil A) S. 342–358). Ein Fachmann kann in einfacher Weise in Übereinstimmung mit der Offenbarung hierin jede verfügbare Technologie für das Einschleusen unter Bezugnahme auf die einzuschleusenden Oligonukleotide, den zu behandelnden Zelltyp, den Zustand des Patienten und weitere Faktoren, die Toxizität und Interaktionen mit Plasma einschließen, auswählen.

[0045] Weitere Verfahren für das Einführen vorgesehener Sequenzen in Zellen sind Fachleuten in Übereinstimmung mit der Offenbarung geläufig. Zum Beispiel wird die Transfektion durch eine Infektion von Säugetierzellen durch einen viralen Vektor, der die methylierten Antisense-Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung enthält, von der Erfindung ebenfalls als ein Verfahren für das Einschleusen der DNA in die Säugetierzellen in Betracht gezogen. Ebenso kann ein viraler Vektor verwendet werden, um eine Behandlung von Zellen innerhalb eines Individuums durch Infektion desselben zu ermöglichen. Individuen können ebenfalls vorgesehene Sequenzen durch Injektion, wie etwa i. v. oder i. p. oder intramuskuläre Injektion von vorgesehenen Sequenzen in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, erhalten. In einigen Fällen kann die Injektion direkt in die Stelle des Tumor bevorzugt werden. Die Behandlung kann in festgelegten Zeitabständen wiederholt werden.

[0046] Bevorzugt werden mehrere Behandlungen über einen Zeitraum von 1–4 Wochen ausgeführt, wonach die Methylierung des uPA utr in Krebszellen von dem Patienten bestimmt und im Wesentlichen gemäß dem diagnostischen Verfahren der vorliegenden Erfindung mit einem Standardwert verglichen wird. In Fällen, in denen die Krebszellen des Patienten eine signifikante Demethylierung des uPA utr im Vergleich zu normalen, nicht bösartigen Zellen aus einer ähnlichen Quelle zeigen, sollten die Behandlungen wenigstens so lange fortgesetzt werden, bis die Methylierung ein normales Niveau erreicht hat. In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, vorgesehene Sequenzen kontinuierlich zu verabreichen, um die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer signifikanten Demethylierung zu verringern.

[0047] Somit ist ein Fachmann im Hinblick auf die Offenbarung in der Lage, eine vorgesehene Sequenz in Zellen mit einem uPA-Gen, das die Methylierung der Zielsequenz sowie eine verringerte uPA-Expression verursacht, einzuführen.

[0048] Eine diagnostische Prüfung, die den Malignitätsgrad eines Tumors entweder anhand einer Biopsie oder bevorzugter anhand einer biologischen Flüssigkeit oder Schleimhaut des Patienten bestimmt, wird ebenfalls bereitgestellt. Diagnostische Hilfsmittel, die weniger invasive Techniken erfordern, sind wertvoll, weil sie für den Patienten unangenehme Verfahren reduzieren und auch die Kosten der Diagnose verringern können. Es ist auch nützlich, über ein Verfahren für das Kategorisieren der Aggressivität eines Krebses in einem frühen Stadium zu verfügen, da dies hilfreich für das Auswählen einer geeigneten Therapie und/oder für die Lebensplanung sein kann.

[0049] In einer Ausführungsform des diagnostischen Verfahrens wird ein Teil der nicht-translatierten Region („utr“) des uPA-Gens aus einer Zellpopulation von Interesse untersucht und dessen Methylierungsstatus wird bestimmt. Der Methylierungsstatus kann durch geeignete Mittel untersucht werden, einschließlich der Verwendung von Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzymen und Methylierungs-spezifischen Polymerasekettenreaktionen („msPCR“). Üblicherweise wird msPCR verwendet, um die nicht-translatierte Region des uPA-Gens zu amplifizieren. Die Produkte der PCR-Amplifikation können dann unter Verwendung von herkömmlichen Mitteln analysiert werden, um den Methylierungsstatus der uPA utr zu bestimmen. Zellen mit vergleichsweise niedrigem Methylierungsgrad der uPA utr und insbesondere der Promotor-Region darin, weisen auf ein signifikantes Risiko der Metastasierung hin.

[0050] Der Methylierungsstatus kann in Übereinstimmung mit einem geeigneten Verfahren klassifiziert werden. Zum Beispiel kann der Methylierungsstatus einer bestimmten uPA-Genregion mit normalem, nicht bösartigem Gewebe von derselben oder einer ähnlichen Quelle wie die Probe verglichen werden. Von Proben mit einer geringeren Methylierung als die normale Referenz nimmt man an, dass sie ein Metastasierungsrisiko darstellen. In einigen Fällen können die Proben auch mit Zellen von derselben oder einem ähnlichen Gewebequelle, von denen bekannt ist, dass die hoch invasiv sind (wie etwa Zellen mit definierten Eigenschaften) verglichen. Man nimmt an, dass eine Probe mit einem Methylierungsstatus, der in hohem Maße dem Methylierungsstatus der hochinvasiven Zellen ähnelt, ein höheres Metastasierungsrisiko darstellt als eine Probe mit einem höheren Ausmaß der Methylierung.

[0051] Zum Beispiel wäre bei der Untersuchung von Brustkrebszellen eine geeignete „normale“ Referenz normale Brustkrebsepithelzellen aus einem gesunden Individuum, dessen Alter und Zugehörigkeit zu einer ethnischen Gruppe mit dem Patienten vergleichbar sind. Eine geeignete Referenz für hochinvasive Zellen wären MDA-231-Zellen. Das diagnostische Verfahren kann für jeden beliebigen Krebs, der ein Risiko für mit uPA in Beziehung stehender Metastasierung darstellt, angewendet werden. Das diagnostische Verfahren ist insbesondere geeignet für die Verwendung mit Brustkrebs, Prostatakrebs, Lungenkrebs und Darmkrebs.

[0052] Verfahren für das Ausführen von msPCR sind in der Technik bekannt und können leicht angewendet werden, um die uPA utr in Übereinstimmung mit der Offenbarung zu amplifizieren. [Siehe zum Beispiel Herman, et al., PNAS 93: 9821 (1996)].

[0053] Die durch msPCR amplifizierte Region schließt bevorzugt wenigstens eine Region der nicht-translatierten uPA-Region, die eine oder mehr als eine CpG-Insel enthält, ein. In einigen Fällen ist es wünschenswert, eine Region zu amplifizieren, die wenigstens einen Teil der uPA-Promotors enthaltenden CpG-Inseln einschließt. Noch bevorzugter enthält die amplifizierte Region uPA-Basenpaare 592 bis 891. In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, einen Teil der nicht-translatierten Region des uPA-Gens einschließlich der Sequenz 5'GGCGGG zu amplifizieren. In einer Ausführungsform des diagnostischen Verfahrens der vorliegenden Erfindung enthält die amplifizierte uPA-Region eine Nukleotidsequenz, die identisch ist mit oder im Wesentlichen homolog zu einer aus SEQ. ID. Nr. 5 bis 17, bevorzugt eine aus SEQ. ID. Nr. 7, 9, 14, 15, 16 und 17, noch

bevorzugter eine aus SEQ. ID. Nr. 7, 9 und 15 ist. msPCR-Primer sind zu einem Teil des uPA-Gens komplementär und bevorzugt zu einem Teil der uPA utr. Noch bevorzugter liegt die Region des uPA-Gens, zu dem der Primer komplementär ist, innerhalb von 20 Nukleotiden einer CpG-Insel. Faktoren, die für die Auswahl der PCR-Primer berücksichtigt werden müssen, sind bekannt, und ein Fachmann kann im Hinblick auf die Offenbarung geeignete Primer herstellen.

[0054] Die Erfindung stellt ein Verfahren für das Untersuchen des Risikos der Metastasierung bei einer Population von Krebszellen von Säugetieren mit einem funktionalen uPA-Gen bereit, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: a) Bestimmen des Ausmaßes der Cytosin-Methylierung in einem Teil der nicht-translatierten 5'-Region, die eine CpG-Insel des uPA-Gens enthält; und (b) Vergleichen des Ausmaßes der Methylierung von (a) mit einer Referenz.

[0055] Als Behandlung unterscheidet sich das Verfahren der vorliegenden Erfindung mit dem methylierten Oligonukleotid von herkömmlichen Antisense-Zusammensetzungen, von denen man annimmt, dass sie die Translation der mRNA hemmen, jedoch nicht die Transkription des Gens, um mRNA herzustellen, und weist signifikante Vorteil im Vergleich zu denselben auf. Promotor-spezifische methylierte Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung können Genaktivität auf der Transkriptionsebene hemmen, so dass Zellen der Inhibition durch Regenerierung ihrer mRNA nicht entkommen können. Methylierungsprägung in einer ausgewählten Region des Promoters oder der nicht-transkribierten Region kann das uPA-Gen durch Vererbung stilllegen, wodurch die Zellregeneration gehemmt wird, die anderenfalls die inhibitorische Wirkung von Oligonukleotiden verringern könnte.

[0056] Somit verringert die vorliegende Erfindung die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Einschleusens von großen Mengen von chemisch modifizierten Antisense-Mitteln.

Beispiele

Beispiel 1

[0057] Menschliche Tumorzellen, die große Mengen uPA exprimieren, werden ausgewählt. Geeignete Zelllinien schließen PC-3- und MDA-MB-231-Zelllinien ein.

[0058] Die ausgewählten Zellen werden mit abgestuften Dosen von bestimmten vorgesehenen Sequenzen behandelt. Die optimale Dosierungshöhe wird empirisch bestimmt. Die Dosierungshöhe liegt bevorzugt im Bereich von 0,5 bis 30 Mikrogramm pro ml, bevorzugter in dem Bereich von 1 bis 15 Mikrogramm pro ml, und noch bevorzugter in dem Bereich von 5 bis 10 Mikrogramm pro ml.

[0059] Eine Kontrollpopulation von Tumorzellen wird entweder mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) oder unspezifischen Oligonukleotiden mit einer ähnlichen Länge wie die verwendeten vorgesehenen Sequenzen, jedoch ohne Austausch von Cytosin gegen Methylcytosin, behandelt.

[0060] Die Tumorzellen werden unter geeigneten Bedingungen zwischen 6 und 48 Stunden lang mit den Oligonukleotiden inkubiert. Der genaue Zeitraum für die Inkubation kann empirisch im Hinblick auf die Sequenz-eigenschaften und die hierin enthaltene Offenbarung von einem Fachmann bestimmt werden.

[0061] Nach der Inkubation der Tumorzellen mit den Oligonukleotiden wird zelluläre RNA extrahiert und für uPA-mRNA unter Verwendung von Northern Blot-Analyse in Übereinstimmung mit in der Technik bekannten Verfahren überprüft. Die Expression von Aktin, Cyclophilin oder 18S-RNA wird als eine Kontrolle für die Quantifizierung der uPA-Expression verwendet. Mit vorgesehenen Sequenzen behandelte Tumorzelllinien zeigen eine statistisch signifikante Reduzierung der uPA-Genexpression. Einige vorgesehene Sequenzen reduzieren uPA-Genexpression in einigen Zelllinien, in anderen jedoch nicht.

[0062] Somit ist ein Fachmann in Übereinstimmung mit der Offenbarung in der Lage, methylierte Oligonukleotide auf ihre Wirksamkeit für das Reduzieren der Expression von uPA in spezifischen Zelllinien zu screenen. Vorgesehene Sequenzen, die für das Reduzieren der uPA-Expression in wenigstens einer Zelllinie wirksam sind, werden als „reduzierende“ Sequenzen bezeichnet.

Beispiel 2

[0063] Die Fähigkeit von vorgesehenen Sequenzen, das Durchlaufen durch MATRIGEL (ein Maß für das me-

tastatische Potential von Zellen) zu hemmen, wird unter Verwendung eines Assays zur Bestimmung der Invasion mit einer Boydenkammer mit zwei Kompartimenten in Übereinstimmung mit Verfahrensweisen, die in der Technik bekannt sind, untersucht. (Albini, A. et al., Chemical Research, 47: 3239–3245, 1987).

[0064] Hochinvasive Tumorzellen werden in einem Kompartiment einer Boyden-Kammer angeordnet. Der Einfluss der Inkubation der hochinvasiven Tumorzellen mit reduzierenden Sequenzen auf die Fähigkeit der hochinvasiven Tumorzellen zu Invasion durch das MATRIGAL™ wird durch das Inkubieren einer Zellpopulation in der Gegenwart von reduzierenden Sequenzen unter geeigneten Bedingungen und das Vergleichen dieser Population mit einer Population, die den reduzierenden Sequenzen nicht ausgesetzt ist, untersucht. Diese vorgesehenen Sequenzen, die signifikant die Fähigkeit hochinvasiver Tumorzellen zu Invasion durch MATRIGEL™ hemmen, sind von besonderem Interesse. Dies sind „hemmende“ Sequenzen.

Beispiel 3

[0065] Die Fähigkeit von methylierten Oligonukleotiden, in vivo uPA-Expression von Tumorzellen zu reduzieren, wird in Übereinstimmung mit Standard-Verfahren für das Untersuchen der Genexpression untersucht. (Zum Beispiel Xing, R. et al., Cancer Research, 57: 3585–3593, 1997).

[0066] 1 000 000 uPA-exprimierende Zellen werden in Fettpolster der Brust von 4–6 Wochen alten weiblichen C/nu/nu-Mäusen inkokuliert. Den Tieren werden dann interperitoneal (i. p.) entweder PBB, nicht-spezifische Oligonukleotide oder hemmende Sequenzen verabreicht. Diese i. p.-Behandlung wird alle 7–8 Wochen wiederholt, und regelmäßig werden die Tiere überwacht und das Tumorvolumen wird bestimmt.

[0067] Eine statistisch signifikante Reduzierung der Geschwindigkeit des Tumorwachstums, die bei Tieren beobachtet wurde, denen hemmende Sequenzen verabreicht wurden, im Vergleich zu anderen Tieren, weist darauf hin, dass die hemmenden Sequenzen für das Reduzieren des Tumorwachstums vorteilhaft sind.

[0068] Am Ende der Studie werden alle Tiere geopfert und auf das Vorhandensein von makroskopischen und mikroskopischen Tumormetastasen in den Lungen und Lymphknoten hin untersucht. Statistisch signifikante Reduzierung makroskopischer und mikroskopischer Metastasen wird bei mit hemmenden Sequenzen behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet.

Beispiel 4

[0069] Tiere werden wie in Beispiel 3 mit uPA-exprimierenden Zellen inkokuliert. Allerdings dürfen die Tumoren in Tieren bis zu dem Stadium von fühlbaren oder messbaren Tumoren ($2\text{--}5 \text{ mm}^2$) wachsen, bevor die Behandlung mit Oligonukleotiden initiiert wird. Das Tumorwachstum wird untersucht. Dieses Beispiel wird in Übereinstimmung mit in der Technik bekannten und im Hinblick auf die Offenbarung hierin enthaltenen Verfahren ausgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit hemmenden Sequenzen behandelten Tieren und anderen Tieren zeigen die Wirksamkeit der hemmenden Sequenzen für das Umkehren oder Verlangsam der Progression der Krebskrankung.

[0070] Somit ist offensichtlich, dass ein Verfahren für die Regulation der Genexpression mittels methylierter Nukleotide bereitgestellt wurde.

Beispiel 5

[0071] Tumorzellen werden entweder aus einer Tumorbiopsie oder aus Blut, Urin oder Schleimhaut von menschlichen Krebspatienten entnommen. Methylierungsspezifische PCR wird verwendet, um die DNA der uPA-Promotorregion zu amplifizieren. (uPA ist in Nicht-Tumorzellen minimal exprimiert, so dass diese nicht signifikant interferieren.) DNA-Sequenzanalyse wird durchgeführt, um das Ausmaß und die Veränderung des Methylierungsstatus des uPA-Gens zu messen. Der Methylierungsstatus der Tumorzellen wird mit dem Methylierungsstatus der vergleichbaren DNA-Region von Kontrollzellen mit unterschiedlicher metastatischer Aggressivität verglichen. Es wurde gefunden, dass aggressive Zelltypen geringere Methylierungsgrade der uPA-Promotorregion als normale Zelle aufweisen. Die Demethylierung der uPA-Promotorregion kann bei menschlichen Krebspatienten mit einem erhöhten Risiko zur Metastasierung in Verbindung stehen.

Beispiel 6

[0072] Menschliche Brustkrebszellen MCF-7 wurden in Kultur aufbewahrt und 10 Tage lang bei zu 65% kon-

fluente Zellen nur mit Träger (MCF-7) oder mit 25 µM des Demethylierungsmittels 5 azc (MCF-7+5azc) behandelt. MDA-231-Zellen wurden als positive Kontrolle (MDA-231) für uPA-Expression verwendet. Nach Ablauf dieses Zeitraums wurden 20 µg zelluläre RNA aus jeder Gruppe mittels Elektrophorese auf einem 1,1%igem Agarose/Formaldehyd-Gel und menschlicher uPA-cDNA oder mit einer ³²P-markierten 18SRNA-Sonde getrennt. Die Ergebnisse werden in **Fig. 1** gezeigt. Sämtliche Blots (**Fig. 1A**) wurden durch densitometrisches Scannen (**Fig. 1B**) quantifiziert. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen wird durch ein Sternchen ($p < 0,05$) dargestellt.

[0073] Die Behandlung von MCF-7-Zellen, die keine signifikante Menge von uPA mit Methylierungsinhibitor 5-azc exprimieren, führt zu einer ausgeprägten Induzierung von uPA-mRNA, wie in der Northern Blot Analyse ersichtlich ist.

Beispiel 7

[0074] In einem Experiment mit 2 unterschiedlichen Behandlungsdosen wurden menschliche Brustkrebszellen MDA-231 mit einem Element aus der folgenden Gruppe transfiziert: methyliertes Antisense-Oligonukleotid, das zu SEQ. ID. Nr. 15 (mAS) komplementär ist; das Oligonukleotid von SEQ. ID Nr. 15 (mS); oder nicht-methyliertes Antisense-Oligonukleotid, das zu SEQ. ID. Nr. 15 (AS) komplementär ist. In Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers wurde die Transfektion 18 Stunden lang unter Verwendung von LIPFECTAMIN™ (GIBCO™) weitergeführt. Nach Abschluss dieser Behandlung wurden in Übereinstimmung mit Standardverfahren 20 Mikrogramm zelluläre RNA aus jeder Behandlungsgruppe erhalten und durch Elektrophorese auf einem 1,1%igem Agarose/Formaldehydgel getrennt und durch Kapillarwirkung auf eine Nylonmembran getropft. Die Blots wurden mit einer ³²P-markierten humanen uPA cDNA oder mit einer ³²P markierten 18S RNA-Sonde hybridisiert. Das Verhältnis der uPA-Expression zu der 18S-mRNA-Expression wurde berechnet.

[0075] Die Ergebnisse dieses Beispiels werden in **Fig. 2** gezeigt. Sämtliche Blots (**Fig. 2A**) wurden durch densitometrisches Scannen (**Fig. 2B**) quantifiziert. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen wird durch ein Sternchen ($p < 0,05$) dargestellt. Die Behandlung von MD-231-Zellen mit 30 mikromolarem mAS führte unter ähnlichen Versuchsbedingungen zu einer signifikanten Hemmung von uPA-mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrollgruppen von mit mS- oder AS-Oligonukleotiden behandelten Zellen, wie durch Northern Blot Analyse gezeigt wird.

Beispiel 8

Bestimmung des Methylierungsstatus von uPA-Genpromotor in menschlichen Brustkrebszellen und menschlichen Prostatakrebszellen

[0076] Die gesamte zelluläre genomische DNA wurde aus MDA-231, LNCap und MCF-7-Zellen extrahiert. 2 Mikrogramm genomische DNA wurden mit Natriumbisulfat bei 55°C 14 Stunden lang verarbeitet, was dazu führt, dass alle nicht-methylierten Cytosine (C) in Uracil (U) umgewandelt werden. Während der nachfolgenden Amplifikation werden dieses Uracile mittels Amplifikation unter Verwendung verschachelter Primer, die 5'UTR 572–591 bp (caggtgcattggaggaagca) und 892–911 bp (gagtggcccggtcctgagat) von uPA entsprechen, weiter in Thymin (T) umgewandelt. Dies ermöglicht eine einfache Detektion der Höhe der Cytosinmethylierung in der Probe.

[0077] Wie in **Fig. 3** dargestellt, die eine vergleichende Ansicht eines Teils der uPA utr über die Zelltypen bereitstellt, sind mehr als 90% der Cytosine innerhalb der CpG-Inseln des uPA-Promotors in MCF-7 Zellen (Linie 4) methyliert. Die obere Linie von **Fig. 3** zeigt die nicht modifizierte Sequenz eines Teils der nicht-translatierten Region des uPA-Gens. Dagegen enthalten MD-231-Zellen, die hohe uPA-Mengen aufweisen, nicht-methyliertes Cytosin (Linie5). Somit ist der Methylierungsstatus der uPA utr prädiktiv für die uPA-Expression und das Risiko der Metastasierung.

Tabelle 1

SEQ. ID. Nr.

1 CmGAAAGCA ATAAGCCmGG
 2 TGTCm GCmGTGATGAA GACTTCACAG CTCCATCCAG CmGACC
 3 Cm GCmGTGATGAA GACTTCACAG CTCCATCCAG CmG
 4 CmGGGGACTCCTGCCTGGG GCAGGCCmG
 5 ACmG CTGTTGGGTC CCCTCCmGCTG GAGATCmGCmGC
 6 AG CmGTTGCmGGAA GCACGCmGGGG TC
 7 GCCmGG GCmGGGAGAGG GAGGGGmGGC GCCmGGGGCmGGG
 8 GGmG CCmGCmGGGTCmG CAGCACAGTC GGAGACCmGCA
 GCCCmGGAGCC CmGGG
 9 CmGCTG GAGATCmGCmGC TTCCCCCAA TCTTTGTGAG
 CmGTTGCmGGAA GCACmGCmGGGG TCCmGGGTCmGC TGAGCmGCTGC
 AAGACAGGGG AGGGAGCCmGG G CmGGGAGAGG GAGGGGmGGC
 GCCmGGGGCmGG GCCCTGATAT AGAGCAGGCmG CCmGCmGGGTCmG
 C
 10 CmGCmGGGG TCCmGGGTCmGC TGA
 11 GGGCmGGCm GCCmGGGGCm GGG
 12 GGmG CCmGCmGGGTCmG C
 13 GGGCmGGCm GCCmGGGGCmGG GCCCTGATAT AGAGCAGGCmG
 CCmGCmGGGTCmG C
 14 CmG G GCmGGGAGAGG GAGGGGmGG
 15 AGCCmGGGCmGGGAGAGGGAGGGGmG
 GmGCCmGGGGCmGG
 16 GTC CCCmGCAGCGC CmGGCTCmGCGC CCT
 17 GCCmG CAGCCACmGG T

SEQUENZPROTOKOLL DER BESCHREIBUNG

<110> QuebePharma Inc.

<120> Regulation der Genexpression durch methyliertes Nukleotid

<130> 38748-0002

<150> CA 2,312,051

<151> 2000-07-13

<160> 17

<170> Patent In version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n an Position 1 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n an Position 16 ist m5c

<400> 118

ngaaagcaat aagccnng

18

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n an Position 4 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n an Position 6 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> n an Position 35 ist m5c

<400> 2

tgtngngtga tgaagacttc acagctccat ccagngacc

39

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n an Position 1 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n an Position 3 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> n an Position 32 ist m5c

<400> 3

ngngtgcata agacttcaca gctccatcca gng

33

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> n an Position 1 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> n an Position 29 ist m5c

<400> 4

nggggactcc ttgcactggg gcaggcccn

30

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n an Position 2 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> n an Position 19 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> n an Position 29 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> n an Position 31 ist m5c

<400> 5

angctgttgg gtccccctcng ctggagatng ngc

33

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n an Position 3 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n an Position 8 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n an Position 8 ist m5c

<400> 624

agntgttnggg aagcacgnggg ggtc

24

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n an Position 3 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n an Position 7 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> n an Position 22 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> n an Position 28 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> n an Position 33 ist m5c

<400> 7

gcngggnggg agagggaggg gnggcgcngg ggnggg

36

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n an Position 3 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n an Position 6 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n an Position 8 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n an Position 13 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> n an Position 31 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> n an Position 38 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (45) .. (45)

<223> n an Position 45 ist m5c

<400> 8

ggngcngngg gtngcagcac agtcggagac ngcagccngg agccnngg

48

<210> 9

<211> 156

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1)

<223> n an Position 1 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n an Position 11 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n an Position 13 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n an Position 36 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> n an Position 41 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> n an Position 49 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n an Position 51 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(58)
<223> n an Position 58 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)

<223> n an Position 63 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (70)..(70)

<223> n an Position 70 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (93)..(93)

<223> n an Position 93 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (97)..(97)

<223> n an Position 97 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (112)..(112)

<223> n an Position 112 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (118)..(118)

<223> n an Position 118 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (123)..(123)

<223> n an Position 123 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (144)..(144)

<223> n an Position 144 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (147)..(147)

<223> n an Position 147 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (149)..(149)

<223> n an Position 149 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (159)..(154)

<223> n an Position 154 ist m5c

<400> 9

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ngctggagat | ngngcttccc | ccaaatcttt | gtgagngttg | nggaagcang | nggggtcngg | 60 |
| gtngctgagn | gctgcaagac | aggggaggga | gcngggnggg | agagggaggg | gnngcgcngg | 120 |
| ggngggccct | gatatacagac | aggngcngng | ggtnnc | | | 156 |

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1). (1)

<223> n an Position 1 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n an Position 3 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n an Position 10 ist m5c

<220>

<221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n an Position 15 ist m5c

<400> 10
 ngnggggtcn gggtnngctga 20

<210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n an Position 4 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n an Position 7 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n an Position 10 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n an Position 15 ist m5c

<400> 11 18
 gggnggngcn ggggnnggg 18

<210> 12
 <211> 15
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n an Position 3 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n an Position 6 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n an Position 8 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n an Position 13 ist m5c

<400> 12

ggngcngngg gtngc

15

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n an Position 4 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n an Position 7 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n an Position 10 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n an Position 15 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)..(36)
<223> n an Position 36 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)..(39)
<223> n an Position 39 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> n an Position 41 ist m5c

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> n an Position 46 ist m5c

<400> 13
gggnngngcn gggngggcc ctgatataga gcagggcng ngggtngc

48

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n an Position 1 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n an Position 5 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n an Position 20 ist m5c

<400> 14
 nggngggag agggagggn gg 22

<210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4).. (4)
 <223> n an Position 4 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n an Position 8 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> n an Position 23 ist m5c

<220>

<221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n an Position 26 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n an Position 29 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(34)
 <223> n an Position 34 ist m5c

<400> 15
 agcngggngg gagagggagg ggnggngcng gggngg

36

<210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n an Position 6 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n an Position 14 ist m5c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> n an Position 19 ist m5c

<400> 16
 gtcccnngcag cgcnngctng cgcctt

26

<210> 17

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n an Position 3 ist m5c

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> n an Position 12 ist m5c

<400> 17

gcngcagcca cnggt 15

Patentansprüche

1. Methylierte Antisense-Desoxyoligonukleotide, die im Wesentlichen komplementär sind zu einer Zielsequenz und in der Lage sind mit der Zielsequenz einen stabilen Komplex einzugehen, innerhalb der untranslatierten Region des uPA-Gens, angeordnet zwischen den Nukleotiden 1 und 1226, und welche CpG-Inseln enthält, worin die Oligonukleotide gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Oligonukelotiden, die im Wesentlichen komplementär sind zu mindestens einer der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17, die 5'-methyliertes Cytosin anstelle des unmethylierten Cytosins in einer Region haben, die komplementär ist zu CpG; worin die CpG-Inseln in der Zielsequenz in ihren Basensequenzen exakt komplementär zu dem Oligonukleotid sind, jedoch nicht notwendigerweise in dem Methylierungstatus.

2. Die Oligonukleotide gemäß Anspruch 1, worin die Zielsequenz, zu der die Oligonukleotide komplementär sind, Teil der Promotorregion des uPA-Gens ist.

3. Oligonukleotide gemäß Anspruch 1, komplementär zu einer Zielsequenz, die GGC GG umfasst.

4. Oligonukleotide gemäß einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, gewählt aus der Gruppe bestehend aus Oligonukleotiden, die zu mindestens einer der SEQ. ID. Nummern 1 bis 17 komplementär sind.

5. Oligonukleotide gemäß Anspruch 4, gewählt aus der Gruppe bestehend aus Oligonukleotiden, die zu SEQ. ID. Nummern 7, 9 und 11 komplementär sind.

6. Oligonukleotide gemäß einem der Ansprüche 1–5, die zwischen 15 und 60 Nukleotide lang sind.

7. Ein Verfahren zur Amplifizierung eines Teils einer untranslatierten Region eines uPA Gens, einschließlich einer Region mit einer Nukleotidsequenz von mindestens einer der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17, die aus einem Patienten gewonnen wird, der möglicherweise an einem Tumor erkrankt ist, zum Zwecke der Bestimmung des Risikos der Metastasierung, umfassend das Unterziehen des Teils des uPA-Gens einer Polymerase-Kettenreaktion.

8. Verwendung eines einzelsträngigen DNS-Primers, der im Wesentlichen komplementär ist zu einer Region des uPA-Gens und in der Lage ist damit einen stabilen Komplex zu bilden, innerhalb von 20 Nukleotiden einer CpG-Insel, angeordnet innerhalb der Sequenz von einer der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17, in einem Schritt eines diagnostischen in vitro Assays zur Bestimmung des

Metastasierungs-Risikos, worin in einem Schritt des Assays die Region des uPA-Gens amplifiziert wird, und in einem darauf folgenden Schritt der Umfang der Methylierung der Region bestimmt wird, und worin der Primer in den Basensequenzen exakt komplementär zu der CpG-Insel ist, jedoch nicht zwingend in dem Methylierungsstatus.

9. Verwendung eines methylierten Antisense-Oligonukleotids, das im Wesentlichen komplementär ist zu mindestens einem der Ziele, die SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 and 17 umfassen, angeordnet in dem uPA-Gen, bei der Modulierung der uPA-Genexpression, wobei die Ziele mindestens eine CpG-Insel enthalten und das Oligonukleotid in der Lage ist, einen stabilen Komplex mit der Sequenz einzugehen.

10. Verwendung gemäß Anspruch 9, worin das Oligonukleotid zu einem Teil der Promotor-Region des uPA-Gens, enthaltend eine CpG-Insel, komplementär ist.

11. Verwendung gemäß Anspruch 9, worin das methylierte Antisense-Oligonukleotid zu einer der SEQ. ID. Nummern 7, 9, 11, 13, 14 und 15 komplementär ist.

12. Verwendung gemäß Anspruch 9, worin das Oligonukleotid komplementär zu dem Ziel ist.

13. Ein Kit, umfassend ein Oligonukleotid gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie ein Transfektionsmittel, das zum Einschleusen des Oligonukleotids in eine Säugetierzelle geeignet ist.

14. Ein Verfahren zur in vitro Bestimmung des Risikos der Metastasierung, das durch eine Population von Säugetierkrebszellen mit einem funktionellen uPA-Gen gegeben ist, umfassend:

- a) Bestimmung des Umfangs der Cytosin 5'-Methylierung innerhalb eines CpG-Insel enthaltenden Teils der untranslatierten Region des uPA-Gens, die die Sequenz von mindestens einer der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17 hat; und
- b) Vergleich des Methylierungsumfangs von a) mit einer Referenz.

15. Das Verfahren gemäß Anspruch 14, worin der die CpG-Insel enthaltende Teil in der Promotorregion des uPA-Gens liegt.

16. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, worin der die CpG-Insel enthaltende Teil die Sequenz GGC_n einschließt.

17. Ein Verfahren zur in vitro Bestimmung des Risikos der Metastasierung einer Säugetierkrebszellenpopulation mit einem funktionellen uPA-Gen, umfassend:

- a) Amplifizierung einer Zielnukleotidsequenz, einschließlich mindestens einer der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17;
- b) Bestimmung des uPA-Methylierungsumfangs der Zielnukleotidsequenz; und
- c) Vergleich des Methylierungsumfangs von Schritt b) mit einer Referenz.

18. Das Verfahren gemäß Anspruch 17, weiterhin umfassend die Umwandlung von unmethyliertem Cytosin in dem Teil des uPA-Gens in eine andere Base, vor Beginn von Schritt a).

19. Das Verfahren gemäß Anspruch 17, worin das uPA-Gen aus einer oder mehreren malignen Zellen stammt.

20. Das Verfahren gemäß Anspruch 19, worin der maligne Tumor aus der Gruppe gewählt ist bestehend aus Brustkrebs, Prostatakarzinom, Lungenkrebs und Darmkrebs.

21. Die DNS-Population, umfassend DNS-Segmente, die im Wesentlichen komplementär zu einer Zielsequenz sind, eingeschlossen mindestens eine der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 und 17, und mit dieser einen stabilen Komplex ausbilden können.

22. Die Population gemäß Anspruch 21, umfassend als Hauptanteil DNS, die zur untranslatierten Region des uPA-Gens zwischen den Nukleotiden 1 und 1226 komplementär ist.

23. Die Population gemäß Anspruch 21, worin der Hauptanteil aus DNS besteht, welche dieselbe Sequenz wie der Teil des uPA-Gens aufweist, sowie DNS, die mit dem Teil des uPA-Gens komplementär ist.

24. Ein Kit zur Bestimmung des Grades der Malignität einer Krebserkrankung, basierend auf der Bestimmung des Methylierungsstatus der Promotorregion des uPA-Gens, wobei der Kit Primer, die für die Verwendung in der Methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktions-Amplifizierung eines Teils der uPA-Gen Promotorregion, enthaltend mindestens eine der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, oder 17 geeignet sind, sowie Anweisungen zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 17 umfasst.

25. Verwendung einer methylierten Antisense-Desoxyoligonukleotidsequenz, die im Wesentlichen komplementär zu einer Zielnukleotidsequenz in Krebszellen eines Patienten ist und mit dieser einen stabilen Komplex ausbilden kann, wobei die Zielsequenz mindestens eine der SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17 einschließt, enthaltend eine CpG-Insel in einem uPA-Gen, wobei die Oligonukleotidsequenz ein 5'-methyliertes Cytosin anstelle eines unmethylierten Cytosins in der Region aufweist, die zur CpG-Insel in der Zielnukleotidsequenz komplementär ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Verringerung der Metastasierung von Krebszellen, und geeignet zur Verabreichung an einen Säugetier-Patienten, der ansonsten zu einer Metastasierung neigen würde, wodurch die Oligonukleotidsequenz in den Zellkern der Tumorzellen eingeschleust wird und mit der Zielsequenz interagiert, um die Methylierung der Zielnukleotidsequenz zu begünstigen.

26. Die Verwendung gemäß Anspruch 25, worin die Oligonukleotidsequenz eine Länge von zwischen 15 und 60 Basen hat.

27. Die Verwendung gemäß Anspruch 25, worin die Oligonukleotidsequenz aus der Gruppe gewählt ist, bestehend aus Oligonukleotiden komplementär zu SEQ. ID. Nummern 7, 9, 11, 13, 14 und 15.

28. Die Verwendung gemäß Anspruch 27, worin die Sequenz aus der Gruppe gewählt ist, bestehend aus Oligonukleotiden komplementär zu SEQ. ID. Nummern 7, 9 und 11.

29. Die Verwendung gemäß Anspruch 25, worin die Oligonukleotidsequenz ein Nukleotidanalog umfasst.

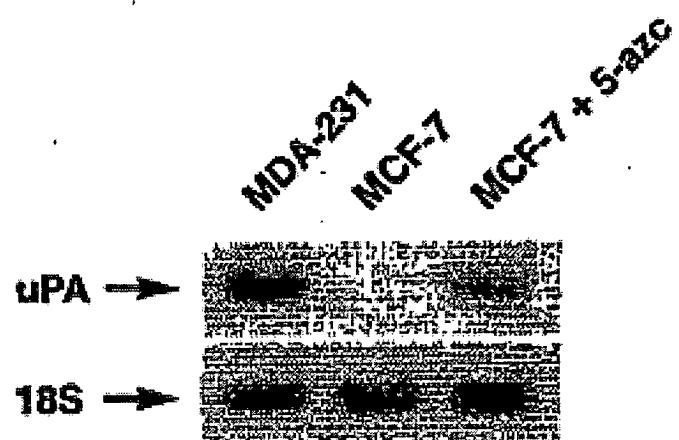
30. Verwendung einer methylierten Antisense-Desoxyoligonukleotidsequenz, die im Wesentlichen komplementär zu einer Zielnukleotidsequenz in einer Säugetierzelle ist und mit dieser einen stabilen Komplex ausbilden kann, wobei die Zielsequenz mindestens eine von SEQ. ID. Nummern 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder 17 einschließt, enthaltend eine CpG-Insel in einem uPA-Gen, wobei die Oligonukleotidsequenz ein 5'-methyliertes Cytosin anstelle eines unmethylierten Cytosins in der Region aufweist, die zu der CpG-Insel in der Zielnukleotidsequenz komplementär ist, für die Herstellung eines Medikaments zur Regulierung des Methylierungsstatus eines Teils einer uPA-DNS-Sequenz in einer Säugetierzelle, so dass die Oligonukleotidsequenz in den Zellkern eintritt und mit der Zielsequenz interagiert.

31. Eine Sequenz, gewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ. ID. No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 and 17.

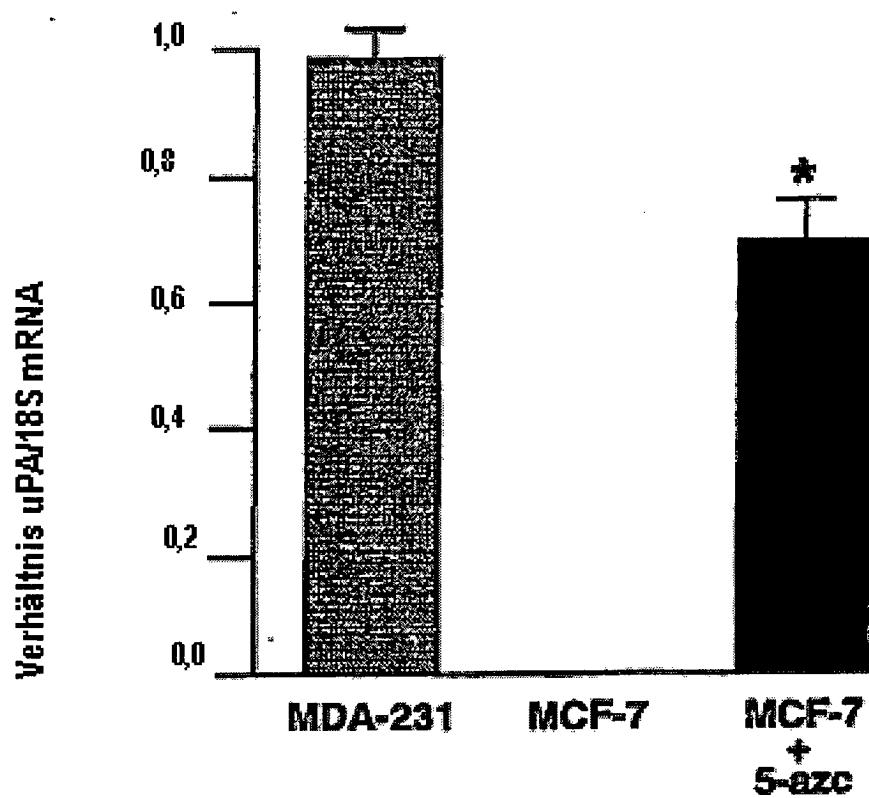
Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

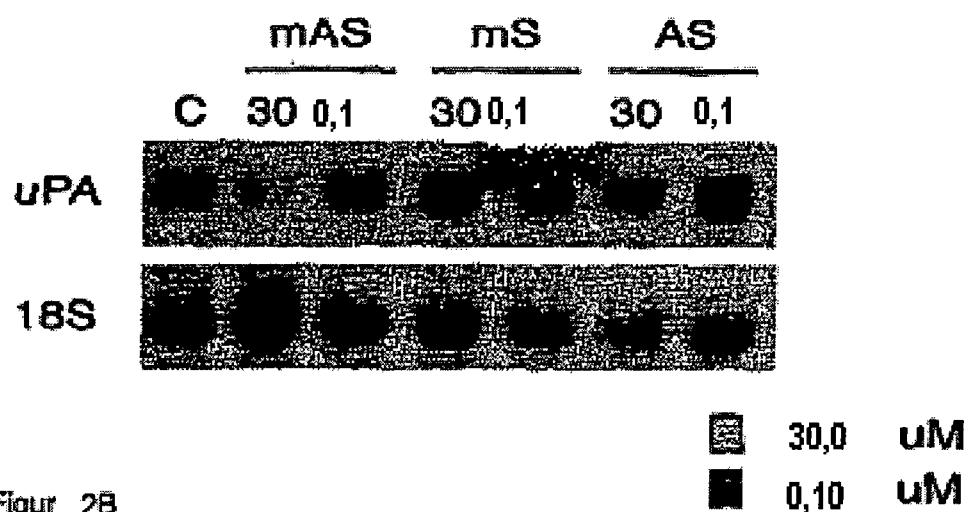
Figur 1A



Figur 1B



Figur 2A



Figur 2B

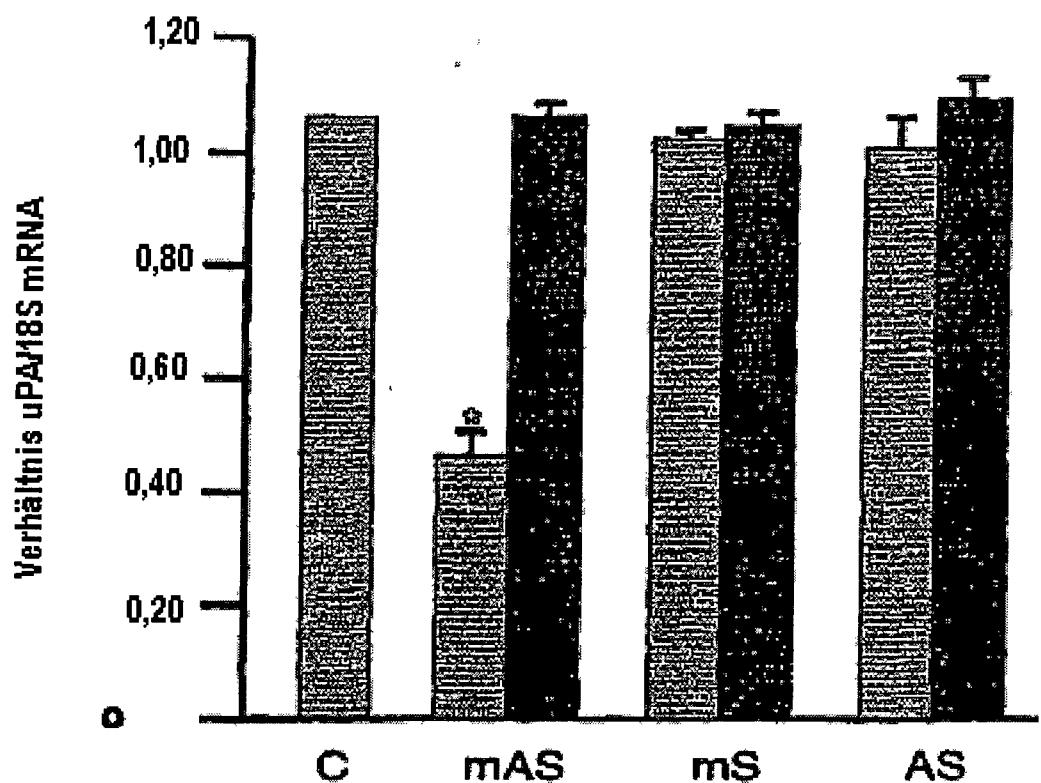


Figure 3