

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Februar 2001 (01.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/07602 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11, (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/07345
- (22) Internationales Anmeldedatum:
21. Juli 2000 (21.07.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 35 303.4 28. Juli 1999 (28.07.1999) DE
- (71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt (DE).
- (72) Erfinder: UHLMANN, Eugen; Zum Talblick 31, D-61479 Glashütten (DE). GREINER, Beate; Königsteinerstrasse 45, D-65812 Bad Soden (DE). UNGER, Eberhard; Rosenweg 19, D-07751 Jena-Cospeda (DE). GOTHE, Gislinde; Falkenweg 4, D-07751 Jena-Cospeda (DE). SCHWERDEL, Marc; Kahlaische Strasse 27, D-07745 Jena (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 01/07602 A2

(54) Title: OLIGONUCLEOTIDES FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF HUMAN EG5

(54) Bezeichnung: OLIGONUKLEOTIDE ZUR INHIBIERUNG DER EXPRESSION VON HUMANEM EG5

(57) Abstract: The invention relates to an oligonucleotide or one of its derivatives that is characterized by a sequence that corresponds to a nucleotide sequence that encodes a defined part of human eg5 or a mutated form thereof. The invention further relates to a method of producing said oligonucleotide and to its use.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Oligonukleotid oder eines seiner Derivate, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Sequenz aufweist, die einem bestimmten Teil einer humanen eg5 oder einer davon mutierten Form kodierenden Nukleinsäuresequenz entspricht; darüberhinaus betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des Oligonukleotids und dessen Verwendung.

Beschreibung

Oligonukleotide zur Inhibierung der Expression von humanem eg5

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Oligonukleotid oder eines seiner Derivate mit einer Sequenz, die einem bestimmten Teil einer Nukleinsäuresequenz, die humanes eg5 oder eine mutierte Form davon kodiert, entspricht, und die Erfindung betrifft weiterhin eine Methode zur Herstellung des Oligonukleotids und dessen Verwendung.

10

Während der Mitose hilft ein auf Mikrotubuli basierender Spindelapparat, die duplizierten Chromosomen gleichmäßig auf die Tochterzellen zu verteilen. Dem Kinesin verwandte Motorproteine machen einen Teil der Kräfte aus, die zum Zusammenbau der Spindel und der Aufteilung der Chromosomen erforderlich sind.

15 Die Bildung einer bipolaren mitotischen Spindel erfordert die Aktivität vieler verschiedener Motorproteine. Eines der menschlichen, mit Kinesin verwandten Motorproteine ist humanes eg5, das mit den mitotischen Centrosomen wechselwirkt und von dem gezeigt wurde, daß es für die Bildung der bipolaren Spindel essentiell ist (Blangy et al., Cell (1995) 83, 1159). Die Mikroinjektion von spezifischen anti-
20 human-eg5 Antikörpern blockiert die Centrosomenwanderung und bringt Zellen dazu, in der Mitose anzuhalten.

Eine andere Möglichkeit zur Blockierung der Bildung einer bipolaren Spindel wäre die Inhibierung der eg5-Expression. Ein Weg, eg5-Expression spezifisch zu
25 inhibieren, ist die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden, die gegebenenfalls zur Verbesserung ihrer Eigenschaften modifiziert sein können (E. Uhlmann und A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990); S. Agrawal, TIBTECH 1996, 376). Man nimmt an, daß Antisense-Oligonukleotide sich an spezifische Sequenzen der mRNA binden, was zu einem Abbau der mRNA und/oder der Hemmung der
30 Proteinsynthese führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Oligonukleotid oder eines seiner Derivate, das einem Teil der eg5 kodierenden Sequenz entspricht - vorzugsweise

- humanem eg5 oder dem eg5 eines Krankheitserregers, z.B. Plasmodium falciparum (Malaria). Vorzugsweise entspricht das Oligonukleotid 8 bis 100 Nukleotiden, besonders bevorzugt 8 bis 20 Nukleotiden der eg5 Sequenz. Das Oligonukleotid oder das Derivat davon bindet sich an die besagte Sequenz und hemmt die Bildung des eg5-Proteins. Die humane eg5-Sequenz ist veröffentlicht worden (Blangy et al., 5 Cell (1995) 83, 1159). SEQ ID NO.: 20 zeigt ein Beispiel einer Sequenz, die humanes eg5 kodiert. SEQ ID NO.: 21 zeigt ein Beispiel einer Plasmodium falciparum eg 5-Sequenz.
- 10 Das Oligonukleotid weist vorzugsweise eine Sequenz auf, die einem Teil einer Nucleinsäure, die humanes eg5 oder Plasmodium falciparum eg5 kodiert, entspricht. Der Begriff "entspricht" bedeutet, daß die Basensequenz des Oligonukleotids zu einem Teil einer Nucleinsäuresequenz, die eg5 kodiert (z.B. Gen, cDNA, mRNA), komplementär ist, was dem Oligonukleotid erlaubt, mit dem "Sense-Teil" der das eg5 15 kodierenden Nucleinsäure zu hybridisieren (sich daran zu binden). Aus diesem Grund wird es "Antisense-Oligonukleotid" genannt. In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung ist deshalb das Oligonukleotid ein Antisense-Oligonukleotid. In einer weiteren bevorzugten Ausführung der Erfindung ist das Oligonukleotid ein Ribozym. Ein Ribozym ist eine katalytische Nucleinsäure, die mRNA spaltet. Das Ribozym ist 20 vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe der Hammerhead-Ribozyme (Vaish et al., Nucleic Acids Res. (1998) 26, 5237).

Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid bindet an einen für die Hybridisierung geeigneten Teil der eg5-mRNA und hemmt die Bildung des eg5-Proteins. Zur 25 Bindung an eg5-mRNA und zur Inhibierung der Expression geeignete Oligonukleotide sind z.B. auf die Translations-Startregion von eg5 gerichtet.

Der dem Oligonukleotid entsprechende Teil der eg5 kodierenden Nucleinsäuresequenz hat eine Länge von 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 30 20 oder mehr Nukleotiden, und das Oligonukleotid entspricht vorzugsweise einer Länge von 12 Nukleotiden oder 19 Nukleotiden einer eg5 kodierenden Sequenz. Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid hat also eine Länge von 10 (10mer), 11 (11mer),

12 (12mer), 13 (13mer), 14 (14mer), 15 (15mer), 16 (16mer), 17 (17mer), 18 (18mer) oder 19 (19mer) Nukleotiden.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung hat das Oligonukleotid eine Länge von 12 oder 19 Nukleotiden; solche Oligonukleotide können zum Beispiel eine der Sequenzen SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 oder einen Teil davon aufweisen, wobei

10 SEQ ID NO. 1: 3'-CTTAAGGCAGTACCGCAGC-5'; 5'-CGACGCCATGACGGAATTC-3'
SEQ ID NO. 2: 3'-ACCACTCTACGTCTGGTAA-5'; 5'-AATGGTCTGCATCTCACCA-3'
SEQ ID NO. 3: 3'-GGCAGTACCGCAGCGTCGG-5'; 5'-GGCTGCGACGCCATGACGG-3'
SEQ ID NO. 4: 3'-CTTAAGGCAGTA-5'; 5'-ATGACGGAATTC-3'
SEQ ID NO. 5: 3'-TAAGGCAGTACC-5'; 5'-CCATGACGGAAT-3'
15 SEQ ID NO. 6: 3'-GGCAGTACCGCA-5'; 5'-ACGCCATGACGG-3'
SEQ ID NO. 7: 3'-AGTACCGCAGCG-5'; 5'-GCGACGCCATGA-3'
SEQ ID NO. 8: 3'-CCGCAGCGTCGG-5'; 5'-GGCTGCGACGCC-3'
SEQ ID NO. 9: 3'-GCAGCGTCGGTT-5'; 5'-TTGGCTGCGACG-3' ist.

20 Ganz besonders bevorzugt ist, daß das Oligonukleotid zur Verbesserung seiner Eigenschaften modifiziert ist; z.B. zur Erhöhung seiner Resistenz gegen Nukleasen bzw. um es gegen Nukleasen resistent zu machen, zur Verbesserung seiner Bindungsaffinität zu einer komplementären eg5 kodierenden Nukleinsäure, z.B. mRNA, oder um seine Aufnahme in die Zelle zu erhöhen.

25 Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb vorzugsweise ein Oligonukleotid, welches eine wie oben angegebene spezifische Sequenz aufweist und welches darüber hinaus im Vergleich zu einer "natürlichen" DNA, die aus den "natürlichen" Nukleosiden Desoxyadenosin (Adenin + β -D-2'-Desoxyribose), Desoxyguanosin
30 (Guanin + β -D-2'-Desoxyribose), Desoxycytidin (Cytosin + β -D-2'-Desoxyribose) und Thymidin (Thymin + β -D-2'-Desoxyribose), die durch Phosphodiesterbrücken zwischen den Nukleosiden verbunden sind, besteht, eine oder mehrere chemische Modifikationen aufweist. Die Oligonukleotide können eine oder mehrere Modifikationen des gleichen Typs und/oder Modifikationen eines verschiedenen
35 Typs enthalten; jeder Modifikationstyp kann unabhängig von den anderen aus den

für die Modifizierung von Oligonukleotiden bekannten Modifikationstypen ausgewählt sein.

Die Erfindung betrifft auch Derivate der Oligonukleotide, zum Beispiel ihre Salze, insbesondere ihre physiologisch verträglichen Salze. Salze und physiologisch verträgliche Salze sind z.B. beschrieben in Remingtons Pharmaceuticals Science (1985) Mack Publishing Company, Easton, PA (Seite 1418). Derivate bezieht sich auch auf modifizierte Oligonukleotide, die eine oder mehrere Modifikationen enthalten (z.B. an bestimmten Nukleotidpositionen und/oder an bestimmten Internukleosidbrücken), Oligonukleotidanalogue (z.B. Polyamid-Nukleinsäuren (PNAs), Phosphomonoester-Nukleinsäuren (PHONAs = PMENAs), Oligonukleotid-Chimere (z.B. bestehend aus einem DNA- und einem PNA-Teil oder bestehend aus einem DNA- und einem PHONA-Teil)). Derivate bezieht sich auch auf Oligonukleotide, die Allelen und/oder mutierten Formen (Mutanten), von normalem oder natürlichem eg5 entsprechen, z.B. Allelen und/oder Mutanten von humanem eg5 (z.B. bezüglich SEQ ID NO. 20) und Allelen und/oder Mutanten von Plasmodium falciparum eg5 (z.B. in bezug auf SEQ ID NO. 21).

Beispiele chemischer Modifikationen sind dem Fachmann bekannt und zum Beispiel in E. Uhlmann und A. Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543 und "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Hrsg., Humana Press, Totowa, USA 1993 und S.T. Crooke, F. Bennet, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36 (1996) 107-129; J. Hunziker und C. Leuman (1995) Mod. Synt. Methods, 7, 331-417 beschrieben.

25

Im Vergleich zu natürlicher DNA kann zum Beispiel eine Phosphodiesterbrücke zwischen Nukleosiden, eine β -D-2'-Desoxyriboseeinheit und/oder eine natürliche Nukleosidbase (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin) modifiziert bzw. ausgetauscht sein. Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid kann eine oder mehrere dieser Modifikationen aufweisen, wobei sich jede Modifikation im Vergleich zu einem aus natürlicher DNA bestehenden Oligonukleotid der gleichen Sequenz an einer bestimmten Phosphodiester-Internukleosidbrücke und/oder an einer bestimmten β -

30

D-2'-Desoxyriboseeinheit und/oder an einer bestimmten natürlichen Nukleosidbasenposition befindet.

Die Erfindung betrifft zum Beispiel ein Oligonukleotid, das eine oder mehrere

5 Modifikationen enthält, wobei jede Modifikation unabhängig aus der folgenden Liste ausgewählt ist:

- a) der Austausch einer Phosphodiesterbrücke zwischen Nukleosiden, die sich am 3'- und/oder am 5'-Ende eines Nukleosids befindet, durch eine modifizierte Internukleosidbrücke,
- 10 b) der Austausch einer sich an dem 3'- und/oder dem 5'-Ende eines Nukleosids befindenden Phosphodiesterbrücke durch eine Dephosphobrücke,
- c) der Austausch einer Zuckerphosphateinheit aus dem Zuckerphosphatgerüst durch eine andere Einheit,
- d) der Austausch einer β -D-2'-Desoxyriboseeinheit durch eine modifizierte
15 Zuckereinheit,
- e) der Austausch einer natürlichen Nukleosidbase durch eine modifizierte Nukleosidbase,
- f) die Anbindung an ein Molekül, das die Eigenschaften des Oligonukleotids beeinflusst,
- 20 g) die Anbindung an ein 2'5'-verbundenes Oligoadenylat oder ein Derivat davon, gegebenenfalls über einen geeigneten Linker, und
- h) die Einführung einer 3'-3' und/oder einer 5'-5'-Inversion am 3'- und/oder am 5'-Ende des Oligonukleotids.

25 Genauere Beispiele für die chemischen Modifikationen eines Oligonukleotids sind

- a) der Austausch einer Phosphodiesterbrücke zwischen Nukleosiden, die sich am 3'- und/oder am 5'-Ende eines Nukleosids befindet, durch eine modifizierte Internukleosidbrücke, wobei die modifizierte Internukleosidbrücke zum Beispiel aus Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, NR^1R^1 -Phosphoramidat-, Boranophosphat-,
30 Phosphat-(C_1 - C_{21})-O-Alkylester-, Phosphat-[(C_6 - C_{12})-aryl-((C_1 - C_{21})-O-alkyl]ester, (C_1 - C_8)-Alkylphosphonat- und/oder (C_6 - C_{12})-Arylphosphonatbrücken und (C_7 - C_{12})- α -Hydroxymethylaryl (bekannt z.B. aus WO 95/01363) ausgewählt ist, wobei (C_6 - C_{12})-

Aryl, (C₆-C₂₀)-Aryl und (C₆-C₁₄)-Aryl gegebenenfalls durch Halogen, Alkyl, Alkoxy, Nitro, Cyano substituiert sind, und wobei R¹ und R^{1'} unabhängig voneinander Wasserstoff, (C₁-C₁₈)-Alkyl, (C₆-C₂₀)-Aryl, (C₆-C₁₄)-Aryl-(C₁-C₈)-Alkyl sind, vorzugsweise Wasserstoff, (C₁-C₈)-Alkyl, 5 vorzugsweise (C₁-C₄)-Alkyl und/oder Methoxyethyl, oder R¹ und R^{1'} zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5- bis 6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Gruppe O, S und N enthalten kann,

10

b) der Austausch einer sich an dem 3'- und/oder dem 5'-Ende eines Nukleosids befindlichen Phosphodiesterbrücke durch eine Dephosphobrücke (Dephosphobrücken sind zum Beispiel in Uhlmann, E. und Peyman, A. in "Methods in Molecular Biology", Band 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", 15 S. Agrawal, Hrsg., Humana Press, Totowa 1993, Kapitel 16, 355ff beschrieben), wobei eine Dephosphobrücke zum Beispiel Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethyl-hydrazo, Dimethylensulfon und/oder eine Silylgruppe ist;

20

c) der Austausch einer Zuckerphosphateinheit (β-D-2'-Desoxyribose und die Phosphodiesterbrücke zwischen den Nukleosiden bilden zusammen eine Zuckerphosphateinheit) aus dem Zuckerphosphatgerüst (das Zuckerphosphatgerüst besteht aus Zuckerphosphateinheiten) durch eine andere Einheit, wobei die andere Einheit zum Beispiel zum Aufbau

25

- eines "Morpholinoderivativ"-Oligomeren geeignet ist (wie zum Beispiel in E.P. Stirchak et al., Nucleic Acids Res. 17 (1989) 6129 beschrieben ist); das heißt z.B. der Austausch durch eine Morpholino-Derivativ-Einheit;

- einer Polyamid-Nukleinsäure ("PNA") (wie zum Beispiel in P.E. Nielsen et al., Bioconj. Chem. 5 (1994) 3 und in EP 0672677 A2 beschrieben) geeignet ist;

30

das heißt z.B. der Austausch durch eine PNA-Gerüsteinheit, z.B. durch 2-Aminoethylglycin;

- einer Phosphonsäuremonoester-Nukleinsäure ("PHONA") (wie z.B. in Peyman et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 (1996) 2632-2638 und in

EP 0739898 A2 beschrieben) geeignet ist; das heißt z.B. der Austausch durch eine PHONA-Gerüsteinheit;

- d) der Austausch einer β -D-2'-Desoxyriboseeinheit durch eine modifizierte Zuckereinheit, wobei die modifizierte Zuckereinheit zum Beispiel aus β -D-Ribose, α -D-2'-Desoxyribose, L-2'-Desoxyribose, 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C₁-C₆)-Alkylribose, wobei die bevorzugte 2'-O-(C₁-C₆)-Alkylribose 2'-O-Methylribose ist, 2'-O-(C₂-C₆)-Alkenylribose, 2'-[O-(C₁-C₆)-Alkyl-O-(C₁-C₆)-alkyl]ribose, 2'-NH₂-2'-Desoxyribose, β -D-Xylo-furanose, α -Arabinofuranose, 2,4-Didesoxy- β -D-erythro-hexo-pyranose und carbocyclischen (zum Beispiel in Froehler, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 8320 beschrieben) und/oder offenkettigen Zuckeranalogen (zum Beispiel in Vandendriessche et al., Tetrahedron 49 (1993) 7223 beschrieben) und/oder Bicyclozuckeranalogen (zum Beispiel in M. Tarkov et al., Helv. Chim. Acta 76 (1993) 481 beschrieben) ausgewählt wird;
- e) der Austausch einer natürlichen Nukleosidbase durch eine modifizierte Nukleosidbase, wobei die modifizierte Nukleosidbase zum Beispiel aus Uracil, Hypoxanthin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, N²-Dimethylguanidin, Pseudouracil, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Dihydrouracil, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 2,4-Diaminopurin, 8-Azapurin, einem substituierten 7-Deazapurin, vorzugsweise 7-Deaza-7-substituiertem und/oder 7-Deaza-8-substituiertem Purin oder anderen Modifikationen natürlicher Nukleosidbasen ausgewählt wird (modifizierte Nukleosidbasen sind z.B. in EP 0 710 667 A2 und EP 0 680 969 A2 beschrieben);
- f) die Anbindung an ein Molekül, das die Eigenschaften des Oligonukleotids beeinflusst, wobei die Anbindung des Oligonukleotids an ein oder mehrere Moleküle, die die Eigenschaften des Oligonukleotids (günstig) beeinflussen (zum Beispiel die Fähigkeit des Oligonukleotids, die Zellmembran zu durchdringen bzw. in eine Zelle einzudringen, die Stabilität gegenüber Nukleasen, die Affinität für eine eg5 kodierende Targetsequenz, die Pharmakokinetik des Oligonukleotids, die Fähigkeit eines Antisense-Oligonukleotids/Ribozyms bzw. eines mit dem Oligonukleotid konjugierten Moleküls, die jeweilige eg5 kodierende Targetsequenz anzugreifen, z.B. die Fähigkeit zur Bindung und/oder zur Quervernetzung, wenn das Oligonukleotid

mit der eg5 kodierenden Targetsequenz hybridisiert), wobei als Beispiele für Moleküle, die an ein Oligonukleotid angebunden werden können, Polylysin, interkalierende Mittel wie Pyren, Acridin, Phenazin oder Phenanthridin, Fluoreszenzmittel wie Fluorescein, Crosslinker wie Psoralen oder Azidoproflavin, lipophile Moleküle wie (C₁₂-C₂₀)-Alkyl, Lipide wie 1,2-Dihexadecyl-rac-glycerin, Steroide wie Cholesterin oder Testosteron, Vitamine wie Vitamin E, Poly- oder Oligoethylenglykol, vorzugsweise über eine Phosphatgruppe (z.B. Triethylenglykolphosphat, Hexaethylenglykolphosphat) an das Oligonukleotid gebunden, (C₁₂-C₁₈)-Alkylphosphatdiester und/oder O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₈)-Alkyl in Frage kommen, diese Moleküle können am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende und/oder innerhalb der Sequenz eingefügt werden, z.B. an einer Nucleosidbase zur Bildung eines Oligonukleotidkonjugats; Verfahren zur Herstellung eines Oligonukleotidkonjugats sind dem Fachmann bekannt und zum Beispiel in Uhlmann, E. & Peyman, A., Chem. Rev. 90 (1990) 543, M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Hrsg., CRC Press, Boca Raton, 1993, Kapitel 17, S. 303ff. und EP-A 0 552 766 beschrieben;

g) die Anbindung an ein 2'5'-gebundenes Oligoadenylat, vorzugsweise über ein geeignetes Linkermolekül, wobei das 2'-5'-gebundene Oligoadenylat zum Beispiel aus 2'5'-gebundenem Triadenylat-, 2'5'-gebundenem Tetraadenylat-, 2'5'-gebundenem Pentaadenylat-, 2'5'-gebundenem Hexaadenylat- oder 2'5'-gebundenem Heptaadenylatmolekülen und deren Derivativen ausgewählt ist, wobei ein 2'5'-gebundenes Oligoadenylat-Derivat zum Beispiel Cordycepin (2'5'-gebundenes 3'-Desoxyadenylat) ist und wobei zum Beispiel Triethylenglykol ein geeigneter Linker ist und wobei das 5'-Ende des 2'5'-gebundenen Oligoadenylats einen Phosphat-, Diphosphat- oder Triphosphatrest tragen muß, in dem eines oder mehrere Sauerstoffatome zum Beispiel durch Schwefelatome ersetzt sein können, wobei die Substitution durch einen Phosphat- oder Thiophosphatrest bevorzugt ist; und

30

h) die Einführung einer 3'-3'- und/oder einer 5'-5'-Inversion am 3'- und/oder am 5'-Ende des Oligonukleotids, wobei diese Art der chemischen Modifikation dem

Fachmann bekannt und zum Beispiel in M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757, EP 0 464 638 und EP 0 593 901 beschrieben ist.

Der Austausch einer Zuckerphosphateinheit aus dem Zuckerphosphatgerüst durch
5 eine andere Einheit, die z.B. eine PNA-Gerüsteinheit oder eine PHONA-
Gerüsteinheit sein kann, ist vorzugsweise der Austausch eines Nukleotids durch z.B.
eine PNA-Einheit oder eine PHONA-Einheit, die bereits natürliche Nucleosidbasen
und/oder modifizierte Nucleosidbasen enthält, z.B. eine der modifizierten
Nucleosidbasen aus der Gruppe Uracil, Hypoxanthin, 5-(Hydroxymethyl)uracil, N²-
10 Dimethylguanosin, Pseudouracil, 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil,
Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil,
5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 2,4-Diaminopurin, 8-Azapurin, einem
substituierten 7-Deazapurin, vorzugsweise 7-Deaza-7-substituiertem und/oder
7-Deaza-8-substituiertem Purin oder anderen Modifikationen einer natürlichen
15 Nucleosidbase (modifizierte Nucleotidbasen sind z.B. beschrieben in EP 0 710 667
A2 und EP 0 680 969 A2).

Auf die Oligonucleotidmodifikationen, die in EP 0 710 667 A2, EP 0 680 969 A2,
EP 0 464 638, EP 0 593 901, WO 95/01363, EP 0 672 677 A2, EP 0 739 898 A2 und
20 EP 0 552 766 beschrieben werden, wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind eine oder mehrere
Phosphodiesterbrücken zwischen den Nucleosiden innerhalb der
Oligonucleotidsequenz modifiziert; vorzugsweise sind eine oder mehrere
25 Phosphodiesterbrücken zwischen den Nucleosiden durch Phosphorothioatbrücken
zwischen den Nucleosiden und/oder (C₆-C₁₂)-Arylphosphonatbrücken zwischen den
Nucleosiden, vorzugsweise durch α -Hydroxybenzylphosphonatbrücken, in denen die
Benzylgruppe vorzugsweise substituiert ist, z.B. durch Nitro, Methyl, Halogen,
ersetzt. In einem Nur-Phosphorothioat-Oligonucleotid sind alle
30 Phosphodiesterbrücken zwischen den Nucleosiden durch Phosphorothioat
modifiziert. Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Oligonucleotid, in dem nicht alle
Phosphodiesterbrücken zwischen den Nucleosiden einheitlich mit Phosphorothioat
(Phosphorothioatbrücken zwischen den Nucleosiden) modifiziert sind. Vorzugsweise

weist wenigstens eine Internukleosidbrücke eine andere Modifikationsart auf, oder sie ist nicht modifiziert. Die Erfindung betrifft insbesondere ein Oligonukleotid, welches zusätzlich wenigstens eine andere Modifikationsart enthält.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung sind eine oder
5 mehrere Nukleoside (β -D-2'-Desoxyribose und/oder Nukleosidbase) innerhalb der Oligonukleotidsequenz modifiziert; vorzugsweise ist die β -D-2'-Desoxyribose gegen 2'-O-(C₁-C₆)-Alkylribose, vorzugsweise durch 2'-O-Methylribose, ausgetauscht und/oder die Nukleosidbase ist gegen 8-Azapurin, 7-Deaza-7-substituiertes Purin und/oder 7-Deaza-8-substituiertes Purin ausgetauscht (Purin: Adenin,
10 Guanin). Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Oligonukleotid, in dem nicht alle Nukleoside einheitlich modifiziert sind. Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Oligonukleotid, das zusätzlich wenigstens eine andere Modifikationsart enthält.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere
15 Zuckerphosphateneinheiten aus dem Zucker-Phosphat-Gerüst durch PNA-Gerüsteinheiten, vorzugsweise durch 2-Aminoethylglycineinheiten, ausgetauscht. Vorzugsweise sind die ausgetauschten Zuckerphosphateneinheiten zumindest zu einem gewissen Grad miteinander verbunden. Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Oligonukleotid, in dem nicht alle Zuckerphosphateneinheiten einheitlich
20 ausgetauscht sind. Die Erfindung betrifft insbesondere chimere Oligonukleotide, z.B. solche, die aus einem oder mehreren PNA-Teilen und einem oder mehreren DNA-Teilen zusammengesetzt sind. Mögliche Beispiele für solche chimere Oligonukleotide sind die folgenden Modifikationsmuster, die nicht dazu dienen, die Erfindung einzuschränken: DNA-PNA, PNA-DNA, DNA-PNA-DNA, PNA-DNA-PNA,
25 DNA-PNA-DNA-PNA, PNA-DNA-PNA-DNA. Ähnliche Muster wären für aus DNA-Teilen und PHONA-Teilen zusammengesetzte chimere Moleküle möglich, z.B. DNA-PHONA, PHONA -DNA, DNA- PHONA -DNA, PHONA -DNA- PHONA, DNA-PHONA -DNA- PHONA, PHONA -DNA- PHONA -DNA. Zusätzlich sind natürlich auch chimere Moleküle aus drei verschiedenen Teilen wie DNA-Teil(en),
30 PHONA-Teil(en) und PNA-Teil(en) möglich. Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Oligonukleotid, das zusätzlich wenigstens eine andere Modifikationsart enthält.

- In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das 3'-Ende und/oder das 5'-Ende des Oligonukleotids mit einem (C₁₂-C₁₈)-Alkylrest, vorzugsweise einem C₁₆-Alkylrest, einem Triethylenglykolrest oder einem Hexaethylenglykolrest verbunden – diese Reste sind vorzugsweise über eine
- 5 Phosphatgruppe an das Oligonukleotid gebunden. Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein Oligonukleotid, in dem nicht beide Enden (das 3'- und das 5'-Ende) (gleichermaßen) modifiziert sind. Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Oligonukleotid, das zusätzlich wenigstens eine andere Modifikationsart enthält.
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind nur bestimmte Positionen innerhalb einer Oligonukleotidsequenz modifiziert (z.B. teilweise modifiziertes Oligonukleotid). Teilweise modifizierte Oligonukleotide werden in einigen Schriften auch als minimal modifizierte Oligonukleotide bezeichnet. Innerhalb der Sequenz kann eine Modifikation in bestimmten Positionen lokalisiert sein (bei bestimmten
- 15 Nukleotiden, bei bestimmten Nukleosiden, bei bestimmten Nukleosidbasen, bei bestimmten Internukleosidbrücken).
- In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird ein teilweise modifiziertes Oligonukleotid hergestellt, indem nur einige der Phosphodiesterbrücken durch
- 20 modifizierte Internukleosidbrücken, z.B. Phosphorothioatbrücken und/oder α -Hydroxybenzylphosphonatbrücken, ersetzt werden. Die Erfindung beinhaltet insbesondere solche Oligonukleotide, die nur zu einem gewissen Grad modifiziert sind.
- 25 Insbesondere betrifft die Erfindung ein Oligonukleotid, bei dem 1 bis 5 terminale Nukleotideinheiten am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende durch die Modifikation von Internukleosidbrücken, die sich am 5'- und/oder am 3'-Ende des entsprechenden Nukleosids befinden, geschützt sind, vorzugsweise durch Austausch der
- 30 Phosphodiesterbrücken zwischen den Nukleosiden durch Phosphorothioatbrücken und/oder α -Hydroxybenzylphosphonatbrücken. Ganz besonders bevorzugt sind die 1 bis 5 terminalen Nukleotideinheiten am 3'-Ende des Oligonukleotids durch modifizierte Internukleosidbrücken, die sich am 5'- und/oder am 3'-Ende der entsprechenden Nukleoside befinden, geschützt. Gegebenenfalls sind die 1 bis 5

terminalen Nukleotideinheiten am 5'-Ende des Oligonukleotids zusätzlich geschützt durch modifizierte Internukleosidbrücken, die sich am 5'- und/oder am 3'-Ende des entsprechenden Nukleosids befinden. Gegebenenfalls kann das Oligonukleotid zusätzliche Modifikationen an anderen Positionen enthalten.

- 5 Darüber hinaus betrifft die Erfindung ein Oligonukleotid, bei dem wenigstens ein internes Pyrimidinnukleosid und/oder eine sich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende dieses Pyrimidinnukleosids (ein Nukleosid mit einer Pyrimidinbase wie Cytosin, Uracil, Thymin) befindliche Internukleosidbrücke modifiziert ist, vorzugsweise durch Austausch der Phosphodiesterbrücke(n) zwischen den Nukleosiden durch
- 10 eine/mehrere Phosphorothioatbrücke(n) und/oder eine/mehrere α -Hydroxybenzylphosphonatbrücke(n).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind 1 bis 5 terminale Nukleotideinheiten am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligonukleotids durch

15 modifizierende Internukleosidbrücken, die sich am 5'- und/oder am 3'-Ende des entsprechenden Nukleosids befinden, geschützt, wobei zusätzlich wenigstens ein internes Pyrimidinnukleosid und/oder eine sich am 5'-Ende dieses Pyrimidinnukleosids und/oder am 3'-Ende dieses Pyrimidinnukleosids befindende Internukleosidbrücke modifiziert ist.

20

Das Prinzip von teilweise modifizierten Oligonukleotiden ist z.B. in A. Peyman, E. Uhlmann, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 377 (1996) 67-70 und in EP 0 653 439 beschrieben. Auf diese Schriften wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen. In diesem Fall sind 1-5 terminale Nukleotideinheiten am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende

25 geschützt, z.B. sind die Phosphodiesterbrücken zwischen den Nukleosiden, die sich am 3'- und/oder am 5'-Ende der entsprechenden Nukleoside befinden, zum Beispiel gegen Phosphorothioatbrücken zwischen Nukleosiden ausgetauscht. Zusätzlich ist vorzugsweise wenigstens eine interne Pyrimidinnukleosidposition (bzw. Nukleotidposition) modifiziert; vorzugsweise ist/sind die 3'- und/oder die

30 5'-Internukleosidbrücke(n) eines Pyrimidinnukleosids modifiziert/ausgetauscht, zum Beispiel durch eine/mehrere Phosphorothioatbrücke(n) zwischen den Nukleosiden. Teilweise modifizierte Oligonukleotide weisen besonders vorteilhafte Eigenschaften auf; zum Beispiel sind sie in besonders hohem Grade stabil gegenüber Nukleasen,

und dabei nur minimal modifiziert. Auch haben sie eine beträchtlich reduzierte Neigung zu non-antisense effects, die häufig mit der Verwendung von Nur-Phosphorothioat-Oligonukleotiden verbunden sind (Stein und Krieg (1994) Antisense Res. Dev. 4, 67). Teilweise modifizierte Oligonukleotide zeigen auch eine höhere Bindungsaffinität als Nur-Phosphorothioate.

Die Erfindung betrifft insbesondere teilweise/minimal modifizierte Oligonukleotide.

- 10 SEQ ID NO. 10: 3'-C*T*T*A A G G C*A G T*A C*C G*C A G*C-5', (K3)
5'-C G A C*G*C*C*A*T G A*C G G A A*T*T*C-3';
- SEQ ID NO. 11: 3'-A*C*C*A C*T C*T A C*G T*C*T G G*T A*A-5', (K4)
5'-A*AT*GGT*C*TG*CAT*CT*CA*C*C*A-3';
- SEQ ID NO. 12: 3'-G*G*C*A G*T A C*C G C*A G*C G T*C G*G-5', (K6)
5'-G*G C*T G C*G A*C G C*C A T*G A*C*G*G-3';
- 15 SEQ ID NO. 13: 3'-C*T*T*A A G G*C A G*T*A-5',
5'-A*T*G A C*G G A A*T*T*C-3';
- SEQ ID NO. 14: 3'-T*A*A G G C*A G*T A*C*C-5',
5'-C*C*A T*G A*C G G A*A*T-3';
- SEQ ID NO. 15: 3'-G*G*C A G*T A C*C*G C*A-5',
20 5'-A*C G*C*C A T*G A C*G*G-3';
- SEQ ID NO. 16: 3'-A*G*T A C*C G*C A G*C*G-5',
5'-G*C*G A C*G C*C A T*G*A-3';
- SEQ ID NO. 17: 3'-C*C*G*C A G*C G T*C G*G-5',
5'-G*G C*T G C*G A C*G*C*C-3';
- 25 SEQ ID NO. 18 3'-G*C*A G C*G T*C G G*T*T-5',
5'-T*T*G G C*T G C*G A*C*G-3',

wobei "*" die Stelle einer Internukleosidbrücken-Modifikation bezeichnet;
" * " ist vorzugsweise eine Phosphorothioat-Internukleosidbrücke.

30

Ein weiteres Beispiel einer besonderen Ausführungsform der Erfindung betrifft ein teilweise modifiziertes Oligonukleotid, bei dem ein Nukleosid modifiziert ist, z.B. eine Modifikation einer Nukleosidbase und/oder eine Modifikation einer β -D-2'-Desoxyriboseeinheit. Vorzugsweise ist eine β -D-2'-Desoxyribose gegen 2'-O-(C₁-C₆)-Alkyribose ausgetauscht, ganz besonders bevorzugt ist der Austausch gegen

35

2'-O-Methylribose (Austausch eines β -D-2'-Desoxyribonukleosids gegen ein 2'-O-Methylribonukleosid).

5 Zusätzlich zu einer Modifikationsart kann das Oligonukleotid erfindungsgemäß auch andere Modifikationsarten aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält das Oligonukleotid daher modifizierte Internukleosidbrücken an bestimmten Positionen und zusätzlich Modifikationen eines Nukleosids an bestimmten Positionen, vorzugsweise
10 Austausch von β -D-2'-Desoxyribose. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Internukleosidmodifikation der Austausch einer Phosphodiesterbrücke gegen eine Phosphorothioatbrücke, und die Modifikation der β -D-2'-Desoxyribose ist der Austausch gegen 2'-O-Methylribose; in diesem Fall ist das Oligonukleotid ein chimeres Oligonukleotid, das aus modifizierten und nicht
15 modifizierten DNA- und RNA-Teilen zusammengesetzt ist - welche die 2'-O-Methylribonukleoside und β -D-2'-Desoxyribonukleoside sowie Phosphodiester- und Phosphorothioatbrücken zwischen Nukleosiden enthalten.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Oligonukleotid,
20 das einen oder mehrere (C_{12} - C_{18})-Alkylreste aufweist, vorzugsweise einen C_{16} -Alkylrest an seinem 3'- und/oder seinem 5'-Ende. Ein (C_{12} - C_{18})-Alkylrest kann z.B. als Phosphodiester gebunden sein, wie in EP 0 552 766 A2 beschrieben ist (auf EP 0 552 766 A2 wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen), oder als 3'-Phosphodiester von $O-CH_2-CH(OH)-O-(C_{12}-C_{18})$ -Alkyl. Bevorzugt ist ein
25 Oligonukleotid, bei dem ein C_{16} -Alkylrest an das 3'- und/oder 5'-Ende gebunden ist.

Die Erfindung betrifft auch ein Oligonukleotid, in dem das 3'- und/oder das 5'-Ende mit einem Oligoethylenglykolrest verbunden ist, vorzugsweise einem Triethylenglykol oder einem Hexaethylenglykol, ganz besonders bevorzugt über einen
30 Phosphodiester (Tri- oder Hexaethylenglykolphosphatester). Natürlich kann ein solches Oligonukleotid auch noch weitere Modifikationen enthalten.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das Oligonukleotid über einen Linker mit einem 2'5'-gebundenen Oligoadenylat-5'-(thio)phosphat verbunden. Bei dem Linker kann es sich z.B. um einen Oligoethylenglykolphosphat-, vorzugsweise einen Triethylenglykolphosphat-, Tetraethylenglykolphosphat- oder Hexaethylenglykolphosphatrest, handeln. Das 2'5'-gebundene Oligoadenylat ist vorzugsweise über sein 2'-Ende als Tetra- oder als Pentaadenylat gebunden, dessen 5'-Hydroxyfunktion durch einen Phosphat- oder Thiophosphatrest substituiert ist. Es ist bekannt, daß 2'5'-Oligoadenylat RNase L induziert, die Target-mRNA zu spalten (Torrence et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1993) 90, 1300). Das 2'5'-Oligoadenylat dient dazu, Ribonuklease L (RNase L) zu aktivieren, die dann die eg5 mRNA abbaut. Anstelle eines 2'5'-gebundenen Adenylats ist es auch möglich, z.B. ein 2'5'-gebundenes 3'-Desoxyadenylat, abgeleitet von dem Nukleosidanalogue Cordycepin, einzuführen. In diesem Fall ist der Oligonukleotidteil, der zur Targetnukleinsäure komplementär ist, vorzugsweise an bestimmten Positionen durch 2'-O-(C₁-C₆)-Alkylribonukleosid (vorzugsweise 2'-O-Methylribonukleosid) oder durch PNA modifiziert.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft den Austausch einer oder mehrerer natürlicher Nukleosidbase(n) durch nichtnatürliche bzw. modifizierte Nukleosidbasen, vorzugsweise durch 8-Azapurine und/oder 7-Deaza-7-substituierte Purine und/oder 7-Deaza-8-substituierte Purine, wie z.B. in EP 0 171 066 und EP 0 680 969 beschrieben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann das Nukleosid 3'3'- und/oder 5'5'-Inversionen am 3'- und/oder 5'-Ende aufweisen, wie zum Beispiel in EP 0 464 638 und EP 0 593 901 beschrieben.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft den Austausch einer oder mehrerer Phosphodiesterbrücken gegen α -Hydroxybenzylphosphonatbrücken, wie in WO 95/01363 beschrieben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält das Oligonukleotid eine Modifikation des Zuckerphosphatgerüsts, vorzugsweise durch PNA-Einheiten.

- 5 Es sind auch andere Modifikationsmuster möglich, z.B. DNA-PNA-DNA, PNA-DNA. Vergleichbare Modifikationsmuster sind auch für PHONA/DNA-Chimeren möglich. Diese Modifikationsmuster können mit jeder anderen Modifikationsart kombiniert werden, und ähnliche Modifikationsmuster sind natürlich auch für andere erfindungsgemäße Oligonukleotide möglich.

10

Die obengenannten konkreten Oligonukleotide - bestimmte Sequenz, bestimmter Modifikationstyp/bestimmte Modifikationstypen an bestimmten Positionen (spezifisches "Modifikationsmuster") stellen nur Beispiele für verschiedene Ausführungsformen der Erfindung dar. Die Erfindung wird durch diese konkreten

- 15 Oligonukleotide nicht eingeschränkt. Andere Kombinationen von Sequenz und Modifikationsmuster sind gleichfalls möglich.

- Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid inhibiert spezifisch die Expression des Targetproteins (d.h. eg5) bzw. der Targetsequenz (einer Nukleinsäure, die eg5
- 20 kodiert, vorzugsweise eg5 mRNA). Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid hemmt vorzugsweise spezifisch die Expression von eg5. Dies hat eine Absenkung der eg5-Proteinkonzentration im Vergleich zu einer unbehandelten Expression zur Folge. Die Spezifität kann zum Beispiel durch die Bestimmung der Wirkung eines erfindungsgemäßen Oligonukleotids auf die eg5-Expression im Vergleich zur
- 25 Wirkung desselben Oligonukleotids auf die beta-Actin-Expression auf der mRNA- und/oder der Proteinebene demonstriert werden. Nach Behandlung mit einem erfindungsgemäßen Oligonukleotid war nur die eg5-mRNA- und/oder die eg5-Proteinkonzentration reduziert, während z.B. beta-Actin-(ein Haushaltsprotein)mRNA- und/oder beta-Actin-Proteinkonzentration unverändert
- 30 blieb.

Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid ist vorzugsweise dazu in der Lage, die Expression von eg5 in Humanzellen effektiv zu inhibieren, und/oder hat die

Fähigkeit, das Wachstum von Tumoren in Wirbeltieren zu inhibieren. Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid reduziert vorzugsweise die eg5-mRNA- und/oder -Proteinkonzentration in Tumoren von behandelten Individuen im Vergleich zu unbehandelten Individuen. Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid verringert
5 vorzugsweise die Größe eines Tumors in einem Wirbeltier, z.B. in Mäusen, im Vergleich zu unbehandelten Mäusen bzw. im Vergleich zu der vor der Behandlung bestimmten Größe des Tumors in demselben Tier.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen
10 Nukleotides. Ein Herstellungsverfahren beinhaltet die chemische Synthese des Oligonukleotids. Die chemische Synthese wird vorzugsweise mittels einer für die Verwendung für die Synthese von Oligonukleotiden bekannten Standardmethode durchgeführt, z.B. der Phosphoramiditmethode nach Caruthers (1983) Tetrahedron
15 Letters 24, 245, der H-Phosphonatmethode (Todd et al. (1957) J. Chem. Soc. 3291) oder der Phosphotriestermethode (Sonveaux (1986) Bioorg. Chem. 14, 274; Gait, M.J. "Oligonucleotide Synthesis, A practical Approach", IRL Press, Oxford, 1984) oder verbesserten oder veränderten Methoden, die sich von diesen
Standardverfahren ableiten. Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid kann zum Beispiel wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt werden. Ein erfindungsgemäßes
20 Oligonukleotid wird vorzugsweise an einer Festphase synthetisiert, indem in geeigneter Weise geschützte Monomere (z.B. Nukleoside) kondensiert werden, um Internukleosidbrücken zwischen diesen Monomeren zu bilden. Die Erfindung betrifft z.B. ein Verfahren zur Herstellung eines Oligonukleotids oder eines Derivates davon, wobei eine Nukleotideinheit mit einer 3'- oder einer 2'-terminalen Phosphor (V)-
25 Gruppe und einer freien 5'-Hydroxyl- oder Mercaptogruppierung mit einer weiteren Nukleotideinheit mit einer Phosphor (III)- oder einer Phosphor (V)-Gruppierung in der 3'-Position, oder deren aktivierten Derivaten, umgesetzt wird, und wobei gegebenenfalls Schutzgruppen verwendet werden, die vorübergehend in das Oligonukleotid eingeführt werden können, um andere Funktionen zu schützen, und
30 die nach der Synthese entfernt werden, und das von der Festphase abgespaltene Oligonukleotid gegebenenfalls in ein physiologisch unbedenkliches Salz umgewandelt werden kann. Zur Synthese eines modifizierten Oligonukleotids werden die Standardmethoden in gewissem Grade variiert. Diese Variationen sind

dem Fachmann bekannt, und sie sind z.B. in Agrawal S. "Protocols for oligonucleotides and analogs" (1993, Human Press Inc., Totowa, New Jersey) beschrieben. Die Herstellung modifizierter Oligonukleotide ist ebenfalls in EP 0 710 667, EP 0 680 969, EP 0 464 638, EP 0 593 901, WO 95/01363, EP 0 672 677, EP 0 739 898 und EP 0 552 766 beschrieben. Auf die in den obengenannten Schriften beschriebenen Methoden zur Herstellung modifizierter Oligonukleotide wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Inhibierung der Expression von eg5 und/oder zur Modulation der Expression einer eg5 kodierenden Nukleinsäure, wobei ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid mit einer eg5 kodierenden Nukleinsäure (z.B. mRNA, cDNA) in Kontakt gebracht wird und das Oligonukleotid mit dieser eg5 kodierenden Nukleinsäure hybridisiert wird.

Daher betrifft die Erfindung auch ein Verfahren, bei dem das Oligonukleotid mit einer eg5 kodierenden Nukleinsäure (z.B. mRNA; cDNA) in Kontakt gebracht wird, zum Beispiel indem das Oligonukleotid mittels bekannter Methoden in eine Zelle eingefügt wird, zum Beispiel durch Inkubation von Zellen mit dem obengenannten Oligonukleotid oder einer Formulierung desselben - solch eine Formulierung kann Aufnahmeverbesserer, wie Lipofectin, Lipofectamin, Cellfectin oder Polykationen (z.B. Polylysin) enthalten.

So wird zum Beispiel ein Oligonukleotid, das zuvor mit Cellfectin z.B. für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, dann für ungefähr 5 Stunden oder weniger mit einer Zelle inkubiert, um das Oligonukleotid in die Zelle einzuschleusen.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des Oligonukleotids, vorzugsweise als Antisense-Oligonukleotid (Bindung des Oligonukleotids an eine eg5 kodierende mRNA) oder als Ribozym (Bindung an eine eg5 kodierende mRNA und Spaltung dieser mRNA). In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung kann das Oligonukleotid verwendet werden, um die Spaltung der eg5 kodierenden mRNA durch RNase H zu induzieren, was zu einer verminderten eg5-Expression führt.

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Oligonukleotids zur Inhibierung der Bildung einer bipolaren mitotischen Spindel und somit zur Inhibierung von Zellproliferation, insbesondere Tumorwachstum.

- 5 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des Oligonukleotids als Arzneimittel, und die Verwendung des Oligonukleotids zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung. Insbesondere kann das Oligonukleotid in einer pharmazeutischen Zubereitung verwendet werden, die zur Prävention und/oder zur Behandlung von Krankheiten, die mit der Expression von eg5 assoziiert sind, oder die durch die
10 Inhibierung von eg5-Expression geheilt werden können, eingesetzt wird.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zubereitung, die ein Oligonukleotid und/oder dessen physiologisch unbedenkliche Salze zusammen mit pharmazeutisch unbedenklichen Trägerstoffen oder Hilfsmitteln enthält.

15

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zubereitung, die wenigstens ein erfindungsgemäßes Nukleotid enthält, welches zur Behandlung von Krankheiten, die durch die Inhibierung von eg5-Expression geheilt werden können, wie Restenosis und Krebs, verwendet werden kann.

20

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, wobei ein oder mehrere erfindungsgemäße Oligonukleotide mit physiologisch unbedenklichen Trägerstoffen und gegebenenfalls zusätzlichen Substanzen, z.B. gegebenenfalls mit geeigneten Additiven und/oder
25 Hilfsstoffen, gemischt werden.

30

Die Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung eines Oligonukleotids oder einer daraus hergestellten pharmazeutischen Zubereitung zur Behandlung von Krebs, z.B. zur Inhibierung von Tumorwachstum und Tumormetastase. Das Oligonukleotid oder eine daraus hergestellte pharmazeutische Zubereitung kann zum Beispiel zur Behandlung von festen Tumoren, wie Brustkrebs, Lungenkrebs, Kopf- und Halskrebs, Hirnkrebs, Bauchkrebs, Dickdarmkrebs, kolorektales Karzinom, Speiseröhrenkrebs, Magen-Darm-Krebs, Gliatumor, Leberkrebs, Zungenkrebs,

Neuroblastom, Osteosarkom, Eierstockkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Prostatakrebs, Retinoblastom, Wilms-Tumor, multiples Myelom verwendet werden, und zur Behandlung von Hautkrebs, wie Melanom, zur Behandlung von Lymphknotentumoren und Blutkrebs. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung
5 eines erfindungsgemäßen Oligonukleotids oder einer daraus hergestellten pharmazeutischen Zubereitung zur Inhibierung der eg5-Expression und/oder zur Inhibierung der Akkumulation von Ascitenflüssigkeit und Pleuraergüssen bei verschiedenen Krebsarten, z.B. Brustkrebs, Lungenkrebs, Kopfkrebs, Halskrebs, Hirnkrebs, Bauchkrebs, Dickdarmkrebs, kolorektalem Karzinom, Speiseröhrenkrebs,
10 Magen-Darm-Krebs, Gliatumor, Leberkrebs, Zungenkrebs, Neuroblastom, Osteosarkom, Eierstockkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Prostatakrebs, Retinoblastom, Wilms-Tumor, multiples Myelom, Hautkrebs, Melanom, Lymphknotenkrebs und Blutkrebs. Aufgrund der hemmenden Wirkung auf die eg5-Expression kann ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid bzw. eine daraus
15 hergestellte pharmazeutische Zusammensetzung die Lebensqualität verbessern.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung eines Oligonukleotids oder einer pharmazeutischen Zubereitung davon, z.B. zur Behandlung von Krebs oder zur
20 Verhinderung von Tumormetastase, in Verbindung mit anderen Arzneimitteln und/oder anderen Therapiemaßnahmen, z.B. mit bekannten Arzneimitteln und/oder bekannten Therapiemaßnahmen, wie zum Beispiel denen, die gegenwärtig zur Behandlung von Krebs und/oder zur Verhinderung von Tumormetastase angewandt werden. Bevozugt ist eine Kombination mit Bestrahlungstherapie und
25 chemotherapeutischen Mitteln wie Cisplatin, Cyclophosphamid, 5-Fluoruracil, Adriamycin, Daunorubicin oder Tamoxifen.

Das Oligonukleotid und/oder sein physiologisch unbedenkliches Salz kann einem Tier, vorzugsweise einem Säugetier und insbesondere einem Menschen allein, in
30 einer Mischung mit einem anderen Oligonukleotid (oder seinem physiologisch unbedenklichen Salz) oder in Form einer pharmazeutischen Zubereitung verabreicht werden, die die topische, perkutane, parenterale oder enterale Verwendung zulässt und die als aktiven Bestandteil eine wirksame Dosis wenigstens eines Oligonukleotids, zusätzlich zu üblichen pharmazeutisch unbedenklichen

Trägerstoffen und Hilfsstoffen, enthält. Solch eine pharmazeutische Zubereitung enthält normalerweise ungefähr 0,1 bis 90 Gew.-% des/der therapeutisch aktiven Oligonukleotids/Oligonukleotide. Die Dosis kann in weiten Bereichen variiert werden und muß jeweils auf die individuellen Umstände angepaßt werden. Zur Behandlung von Schuppenflechte wird ein topischer Gebrauch bevorzugt. Im Fall von Krebs sind Infusionen, orale und rektale Verabreichung oder nasale Verabreichung in einem Aerosol, vorzugsweise im Fall von Lungenkrebs, bevorzugt, während im Fall von diabetischer Retinopathie eine topische, intravitreale und orale Verabreichung bevorzugt ist.

10

Eine pharmazeutische Zubereitung kann in an sich bekannter Weise hergestellt werden (z.B. Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA (1985)), unter Verwendung von pharmazeutisch inerten anorganischen und/oder organischen Trägerstoffen. Lactose, Maisstärke und/oder deren Derivate, Talk, Stearinsäure und/oder deren Salze, usw., können zum Beispiel zur Herstellung von Pillen, Tabletten, Filmtabletten und Hartgelatine kapseln verwendet werden. Beispiele für Trägerstoffe für Weichgelatine kapseln und/oder Zäpfchen sind Fette, Wachse, halb feste und flüssige Polyole, natürliche und/oder gehärtete Öle, usw. Beispiele für geeignete Trägerstoffe zur Herstellung von Lösungen und/oder Sirupen sind Wasser, Saccharose, Invertzucker, Glukose, Polyole, usw. Geeignete Trägerstoffe zur Herstellung von Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Glycerin, Polyole, Pflanzenöle, usw. Geeignete Trägerstoffe für Mikro kapseln, Implantate und/oder Stäbe sind Mischpolymere von Glykolsäure und Milchsäure. Zusätzlich gibt es Liposomformulierungen, die z.B. in N. Weiner (Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523), "Liposome Dermatics" (Springer Verlag 1992) und Hayashi (Gene Therapy 3 (1996) 878) beschrieben sind. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann gleichfalls eine Formulierung umfassen, die die orale Verfügbarkeit des Oligonukleotids erhöht, wie Stoffe zur Verbesserung der Aufnahme über den Darm, z.B. Mannit, Harnstoff, Salze der Gallensäure, wie CDCA (Chenodesoxycholol) (2 %).

30

Auch eine dermale Applikation ist möglich, zum Beispiel unter Verwendung von ionophoretischen Methoden und/oder mit Hilfe von Elektroporation. Darüber hinaus können Lipofectine und andere Trägersysteme, zum Beispiel die in der Gentherapie

verwendeten, eingesetzt werden. Besonders geeignet sind Systeme, die in hocheffizienter Weise die Einschleusung von Oligonukleotiden in eukaryontische Zellen oder in den Kern von eukaryontischen Zellen ermöglichen. Eine pharmazeutische Zubereitung kann auch aus zwei oder mehr verschiedenen

5 Oligonukleotiden und/oder ihren physiologisch unbedenklichen Salzen und darüberhinaus, zusätzlich zu wenigstens einem Oligonukleotid, aus einem oder mehreren verschiedenen therapeutischen Wirkstoffen bestehen.

Zusätzlich zu den Wirk- und Trägerstoffen kann eine pharmazeutische Zubereitung auch Zusatzstoffe wie Füllstoffe, Streckmittel, Sprengmittel, Bindemittel, Gleitmittel,
10 Netzmittel, Stabilisatoren, Emulgiermittel, Konservierungsstoffe, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksstoffe oder Aromen, Verdickungsmittel, Verdünnungsmittel oder Puffersubstanzen enthalten, und zusätzlich Lösungsmittel und/oder lösungsvermittelnde Mittel und/oder Mittel zum Erzielen einer Retardwirkung, und auch Salze zur Änderung des osmotischen Drucks, Beschichtungsmittel und/oder
15 Antioxidantien.

Beispiele:

Beispiel 1: Oligonukleotidsynthese

20

Oligonukleotide (ON s) wurden mit Hilfe eines Applied Biosystems 394 DNA-Synthesizers (Perkin Elmer Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA) und Standardphosphoramiditchemie synthetisiert. Nach der Kopplung wurden durch Schwefelung unter Verwendung des Beaucage-Reagens und anschließender
25 Verkappung mit Acetanhydrid und N-Methylimidazol Phosphorothioatbindungen eingeführt. Nach Abspaltung von der Festphase und abschließender Entschützung durch Behandlung mit konzentriertem Ammoniak wurden die ON s durch Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt. Die 2'-O-Methyl-modifizierten ON s wurden hergestellt, indem die Standardphosphoramidite in dem entsprechenden
30 Zyklus gegen 2'-O-Methylribonukleosid-Phosphoramidite ausgetauscht wurden. Alle ON s wurden durch Elektrospray-Massenspektroskopie mit negativen Ionen (Fisons Bio-Q) analysiert, die in allen Fällen die berechnete Masse bestätigte. Die C16-modifizierten Oligonukleotide wurden unter Verwendung von Hexadecyloxy-

(cyanoethoxy)-N,N-diisopropyl-aminophosphan anstelle eines Standardamidits als Phosphitylierungsreagens im letzten Schritt der Oligonukleotidsynthese oder ausgehend von einer entsprechend derivatisierten Festphase synthetisiert. Der Triethylenglykol-Linker ist im Handel von der Glen Research Corporation erhältlich.

5 Die 2'-Phosphoramidite von Adenosin und Cordycepin wurden von der Chem. Genes Corporation bzw. Chemogen Corporation bezogen. Die Einführung von 5'-Phosphaten oder Thiophosphatresten wurde wie zuvor beschrieben ausgeführt (Uhlmann und Engels (1986) Tetrahedron Lett. 27, 1023). Die PNA-DNA-Chimeren wurden wie in EP 0 672 677 beschrieben hergestellt.

10

Die Oligonukleotide wurden mittels


- a) Analytischer Gelelektrophorese in 20%igem Acrylamid, 8M Harnstoff, 45 μ M Trisboratpuffer, pH 7,0 und/oder
- b) HPLC-Analyse: Waters GenPak FAX-Säule, Gradient CH₃CN (400ml), H₂O (1,6l), NaH₂PO₄ (3,1g), NaCl (11,7g), pH6,8 (0,1M an NaCl) nach CH₃CN (400ml), H₂O (1,6l), NaH₂PO₄ (3,1g), NaCl (17,53g), pH6,8 (1,5M an NaCl) und/oder
- c) Kapillarelektrophorese unter Verwendung einer Beckmann eCAPTM, U100P Gel-Kapillarsäule, 65 cm Länge, 100 mm innerer Durchmesser, wobei sich das Fenster 15 cm von dem einen Ende befindet, Puffer 140 μ M Tris, 360mM Borat, 7M Harnstoff und/oder
- d) Elektrospray-Massenspektrometrie mit negativen Ionen, die in allen Fällen die erwarteten Massenwerte bestätigte, analysiert.

20

25 Die Methoden zur Analyse von Oligonukleotiden gemäß a), b), c) und d) sind dem Fachmann bekannt. Diese Methoden werden zum Beispiel in Schweitzer und Engels "Analysis of oligonucleotides" (in "Antisense – from technology to therapy", ein Labor-Handbuch und Lehrbuch, Schlingensiepen et al. Hrsg., Biol. Science Vol. 6 (1997) S. 78 – 103) beschrieben.

30

Die folgenden Oligonukleotide wurden hergestellt (siehe Beschreibung) und getestet:

- ON1: 3'-C*T*T*A A G G C*A G T*A C*C G*C A G*C (K3) SEQ ID NO. 10
- ON2: 3'-A*C*C*A C*T C*T A C*G T*C*T G G*T A*A (K4) SEQ ID NO. 11
- 5 ON3: 3'-A*A*G*A G*T C*A C*T C*T C*C*T A G G*C (K5) SEQ. ID NO. 19
- ON4: 3'-C*T*T*A A G G C*A G T*A C*C G*C A G*C-FITC-5' (K6) SEQ ID NO. 10
- ON5: 3'-G*G*C A G*T A C*C G*C A G C*G SEQ ID NO. 22
- 10 ON6: 3'-C*T*T*A A G G*C A G*T*A SEQ ID NO. 13
- ON7: 3'-T*A*A G G C*A G*T A*C*C SEQ ID NO. 14
- 15 ON8: 3'-G*G*C A G*T A C*C*G C*A SEQ ID NO. 15
- ON9: 3'-C*A*G*T A C*C G*C A G*C SEQ ID NO. 23
- ON10: 3'-A*G*T A C*C G*C A G*C*G SEQ ID NO. 16
- 20 ON11: 3'-C*C*G*C A G*C G T*C G*G SEQ ID NO. 17
- ON12: 3'-G*C*A G C*G T*C G G*T*T SEQ ID NO. 18
- 25 ON13: 3'-A*A*G*A G*T C*A C*T C*T C*C*T A G G*C-Flu-5' (Vergleich 1)  SEQ ID NO. 19
- ON14: 3'-G*G*C*A G*T A C*C G C*A G*C G T*C G*G SEQ ID NO. 12
- ON15: 3'-C*T*T*A A G G*C A G*T*A-FITC SEQ ID NO. 13

30

wobei

"" eine Phosphorothioat-Internukleosidbrücke,
und FITC einen Fluoreszenzmarker darstellen.

35

ON1 bis ON 12 wurden in einem auf Zellen basierenden Assay auf ihre Wirksamkeit, die Proliferation von REH-Leukämiezellen zu inhibieren, getestet. ON1, ON2, ON64-ON71 sind Antisense-Oligonukleotide, die gegen die translationale Startregion von

eg5-mRNA gerichtet sind. ON4 ist das 5'-Fluorescein-markierte Analog von ON1.
ON3 ist ein Vergleichsoligonukleotid.

Die Ergebnisse des Proliferationsinhibitionsexperiments sind in Abbildung 1 gezeigt.

5

Beispiel 2: Bestimmung der antiproliferativen Wirksamkeit der eg5-Antisense-Oligonukleotide

Die REH-Zellen (humane Prä-B-Leukämiezellen, DSM ACC 22) bzw. die A549-Tumorzellen wurden in OptiMEM (Gibco BRL) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, GIBCO-BRL) bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Die Zelldichte für den Assay war ungefähr 1 x 10⁶/ml. Die Oligonukleotide (0,17mM) wurden zur Komplexbildung mit Cellfectin (0,83 mg/ml; Gibco-BRL) gemischt, um die Aufnahme durch die Zellen zu verbessern. Der Oligonukleotid/Cellfectin-Komplex wurde mit den Zellen in Abwesenheit von Serum in Platten mit 24 Vertiefungen 4 Stunden lang inkubiert. Der Oligonukleotid/Cellfectin-Komplex wurde dann entfernt, und Serum wurde zugegeben, so daß die Endkonzentration 10% betrug. Nach 96stündiger Inkubation bei 37°C unter 5% CO₂ wurde die Zelldichte mit Casy 1 (Fa. Schärfe) gemessen. Hierzu wurden die Zellen in jeder Vertiefung gut gemischt und sofort 1:100 mit Casyton verdünnt. Die Mittelwerte der Zelldichte wurden jeweils aus 3 einzelnen Vertiefungen mit derselben Oligonukleotidkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse der antiproliferativen Wirksamkeit sind in Abbildung 1 gezeigt.

Tabelle 1: Nukleotidsequenz von humanem eg5 (SEQ ID NO. 20)

25

```

1   GAATTCCGTC ATGGCGTCGC AGCCAAATTC GTCTGCGAAG AAGAAAGAGG
51  AGAAGGGGAA GAACATCCAG GTGGTGGTGA GATGCAGACC ATTTAATTTG
30  101  GCAGAGCGGA AAGCTAGCGC CCATTCAATA GTAGAATGTG ATCCTGTACG
    151  AAAAGAAGTT AGTGTACGAA CTGGAGGATT GGCTGACAAG AGCTCAAGGA
    201  AAACATACAC TTTTGATATG GTGTTTGGAG CATCTACTAA ACAGATTGAT
35  251  GTTTACCGAA GTGTTGTTTG TCCAATTCTG GATGAAGTTA TTATGGGCTA
    301  TAATTGCACT ATCTTTGCGT ATGGCCAAAC TGGCACTGGA AAAACTTTTA
40  351  CAATGGAAGG TGAAAGGTCA CCTAATGAAG AGTATACCTG GGAAGAGGAT

```

401 CCCTTGGCTG GTATAATTCC ACGTACCCTT CATCAAATTT TTGAGAAACT
451 TACTGATAAT GGTACTGAAT TTTCAGTCAA AGTGTCTCTG TTGGAGATCT
5 501 ATAATGAAGA GCTTTTTGAT CTTCTTAATC CATCATCTGA TGTTTCTGAG
551 AGACTACAGA TGTTTGATGA TCCCCGTAAC AAGAGAGGAG TGATAATTA
601 AGGTTTAGAA GAAATTACAG TACACAACAA GGATGAAGTC TATCAAATTT
10 651 TAGAAAAGGG GGCAGCAAAA AGGACAACCTG CAGCTACTCT GATGAATGCA
701 TACTCTAGTC GTTCCCCTC AGTTTTCTCT GTTACAATAC ATATGAAAGA
751 AACTACGATT GATGGAGAAG AGCTTGTTAA AATCGGAAAG TTGAACTTGG
15 801 TTGATCTTGC AGGAAGTGAA AACATTGGCC GTTCTGGAGC TGTTGATAAG
851 AGAGCTCGGG AAGCTGGAAA TATAAATCAA TCCCTGTTGA CTTTGGGAAG
20 901 GGTCACTACT GCCCTTGATG AAAGAACACC TCATGTTCCCT TATCGAGAAT
951 CTAAACTAAC TAGAATCCTC CAGGATTCTC TTGGAGGGCG TACAAGAACA
1001 TCTATAATTG CAACAATTC TCCTGCATCT CTCAATCTTG AGGAACTCT
25 1051 GAGTACATTG GAATATGCTC ATAGAGCAAA GAACATATTG AATAAGCCTG
1101 AAGTGAATCA GAAACTCACC AAAAAAGCTC TTATTAAGGA GTATACGGAG
30 1151 GAGATAGAAC GTTTAAAACG AGATCTTGCT GCAGCCCCTG AGAAAAATGG
1201 AGTGTATATT TCTGAAGAAA ATTTTAGAGT CATGAGTGGA AAATTAAGT
1251 TTCAAGAAGA GCAGATTGTA GAATTGATTG AAAAAATTGG TGCTGTTGAG
35 1301 GAGGAGCTGA ATAGGGTTAC AGAGTTGTTT ATGGATAATA AAAATGAACT
1351 TGACCAGTGT AAATCTGACC TGCAAAATAA AACACAAGAA CTTGAAACCA
40 1401 CTCAAAAACA TTTGCAAGAA ACTAAATTAC AACTTGTTAA AGAAGAATAT
1451 ATCACATCAG CTTTGGAAG TACTGAGGAG AAACCTCATG ATGCTGCCAG
1501 CAAGCTGCTT AACACAGTTG AAGAACTAC AAAAGATGTA TCTGGTCTCC
45 1551 ATTCCAAACT GGATCGTAAG AAGGCAGTTG ACCAACACAA TGCAGAAGCT
1601 CAGGATATTT TTGGCAAAAA CCTGAATAGT CTGTTTAATA ATATGGAAGA
50 1651 ATTAATTAAG GATGGCAGCT CAAAGCAAAA GGCCATGCTA GAAGTACATA
1701 AGACCTTATT TGTAATCTG CTGTCTTCCA GTGTCTCTGC ATTAGATACC
1751 ATTACTACAG TAGCACTTGG ATCTCTCACA TCTATTCCAG AAAATGTGTC
55 1801 TACTCATGTT TCTCAGATTT TTAATATGAT ACTAAAAGAA CAATCATTAG
1851 CAGCAGAAAG TAAACTGTA CTACAGGAAT TGATTAATGT ACTCAAGACT
60 1901 GATCTTCTAA GTTCACTGGA AATGATTTTA TCCCCAAGT TGGTGTCTAT

1951 ACTGAAAATC AATAGTCAAC TAAAGCATAT TTTCAAGACT TCATTGACAG
2001 TGGCCGATAA GATAGAAGAT CAAAAAAAAA GGAAGTCAGA TGGCTTTCTC
5 2051 AGTATACTGT GTAACAATCT ACATGAACTA CAAGAAAATA CCATTTGTTC
2101 CTTGGTTGAG TCACAAAAGC AATGTGGAAA CCTAACTGAA GACCTGAAGA
2151 CAATAAAGCA GACCCATTCC CAGGAACTTT GCAAGTTAAT GAATCTTTGG
10 2201 ACAGAGAGAT TCTGTGCTTT GGAGGAAAAG TGTGAAAATA TACAGAAAAC
2251 ACTTAGTAGT GTCCAGGAAA ATATACAGCA GAAATCTAAG GATATAGTCA
2301 ACAAATGAC TTTTCACAGT CAAAAATTTT GTGCTGATTC TGATGGCTTC
15 2351 TCACAGGAAC TCAGAAATTT TAACCAAGAA GGTACAAAAT TGGTTGAAGA
2401 ATCTGTGAAA CACTCTGATA AACTCAATGG CAACCTGGAA AAAATATCTC
20 2451 AAGAGACTGA ACAGAGATGT GAATCTCTGA ACACAAGAAC AGTTTATTTT
2501 TCTGAACAGT GGGTATCTTC CTTAAATGAA AGGGAACAGG AACTTCACAA
2551 CTTATTGGAG GTTGTAAAGCC AATGTTGTGA GGCTTCAAGT TCAGACATCA
25 2601 CTGAGAAATC AGATGGACGT AAGGCAGCTC ATGAGAAACA GCATAACATT
2651 TTTCTTGATC AGATGACTAT TGATGAAGAT AAATTGATAG CACAAAATCT
30 2701 AGAACTTAAT GAAACCATAA AAATTGGTTT GACTAAGCTT AATTGCTTTC
2751 TGGAACAGGA TCTGAAACTG GATATCCCAA CAGGTACGAC ACCACAGAGG
2801 AAAAGTTATT TATACCCATC AACACTGGTA AGAACTGAAC CACGTGAACA
35 2851 TCTCCTTGAT CAGCTGAAAA GGAAACAGCC TGAGCTGTTA ATGATGCTAA
2901 ACTGTTTCAGA AAACAACAAA GAAGAGACAA TTCCGGATGT GGATGTAGAA
40 2951 GAGGCAGTTC TGGGGCAGTA TACTGAAGAA CCTCTAAGTC AAGAGCCATC
3001 TGTAGATGCT GGTGTGGATT GTTCATCAAT TGGCGGGGTT CCATTTTTTC
3051 AGCATAAAAA ATCACATGGA AAAGACAAAG AAAACAGAGG CATTAAACACA
45 3101 CTGGAGAGGT CTAAAGTGGG AGAAACTACA GAGCACTTGG TTACAAAGAG
3151 CAGATTACCT CTGCGAGCCC AGATCAACCT TTAATTCACT TGGGGGTTGG
50 3201 CAATTTTATT TTAAAGAAA AACTTAAAAA TAAAACCTGA AACCCAGAA
3251 CTTGAGCCTT GTGTATAGAT TTAAAGAAA TATATATATC AGCCGGGCGC
3301 GTGGCTCTAG CTGTAATCCC AGCTAACTTT GGAGGCTGAG GCGGGTGGAT
55 3351 TGCTTGAGCC CAGGAGTTTG AGACCAGCCT GGCCAACGTG CGCTAAAACC
3401 TTCGTCTCTG TTAAAAATTA GCCGGGCGTG GTGGGCACAC TCCTGTAATC
60 3451 CCAGCTACTG GGGAGGCTGA GGCACGAGAA TCACTTGAAC CCAGAAGCGG

3501 GGTTCAGTG AGCCAAAGGT ACACCACTAC ACTCCAGCCT GGGCAACAGA
3551 GCAAGACTCG GTCTCAAAAA TAAAATTTAA AAAAGATATA AGGCAGTACT
5 3601 GTAAATTCAG TTGAATTTTG ATATCTACCC ATTTTCTGT CATCCCTATA
3651 GTTCACTTTG TATTAAATTG GGTTTCATTT GGGATTGCA ATGTAAATAC
3701 GTATTTCTAG TTTTCATATA AAGTAGTTCT TTTAGGAATT C

Tabelle 2: SEQ ID NO. 21: *P. falciparum*-Sequenz (Teilsequenz; Genbank, ID Z98551).

5'

5 TTTTTTTTTTTTTTATTCCTTGGATGTTCTTGGTAGTTTAAATTTTTTATTTTTGTAGTTTTCT
 TTCTTTTATACGTTTTAAAGCAGGGGATGCCTTTTTAGGAAATGCCCTATTTTTCAATAGCTT
 TAATTTTTGTAGATTGAAATTTATTATTATTATTATTATTATTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 TTGTTGTTGTTATTATTTGAATAATTATTTGTTATATGAACATTTTGAACATTTATATTTCT
 CTTTCTTTCATATTCTTTTAAACTTGTTACACTCATATTTTCTGTATTTACATCAAATCTTT
 10 TATTATGTTGATTGTTATTTAAATAATTTAATTCTTGATATGTTTCATCTATTGGTTGTATA
 GGATTATCCGTTGTATTCTTATTATATAGCATATATTCATTTAAGGGTAGATTATTGTGATT
 AGTTTTTACATTTAATTTATTTTTATCACCTTTATTATTTATATGAGGTATACTACTAT
 TCGTTGTATGATCATTTAAACTATTGTAACGAGAGTAATTATTTTCATGCGCTACAATTTTA
 TCATCTTGAATAAGAAATTGGAAGTTTTTCATCGATTTGTTCAAATACTTTACTTAAATCTAT
 15 ATCATGTGTTGTTGTAATTTGTTCTATCTTTTCATCAAGGTATTTTTAACTTCCAAGTATA
 AATTTTGTCTTATGATATCATCATTATAAAGATAATAATTATGATGATCACCTTGATCTATT
 TTATTATCATCATTATAAAGATAATAATTATGATGATCACCTTGATCCATTTTATTATCATC
 ATTATAAAGATAATTATTATGATCATGACCTTGATCCATTTTATTATCATCATTATAAAGAT
 AATTATTATGATCATGACCTTGATCCATTTTATTATCATCATTATAAAGATAATTATTATGA
 20 TCATGACCTTGATCCATTTTATTATCATCATAATTATTATTGTCACCATTTTTATTATTGTC
 ATGATCATTTTTTATTATTGTCACCATTTTTATTATTATCATGATTATTTTTATTATTATCAT
 GATTATTTTTATTATTATCATGATTATTTTTATTATTATCATCATTTTTTATTATTATCATAA
 TTCGTGTCGTAAGTCGAATCCCTATTTAGTGATGTGATTTTCATCGGAGTAAACATATCTAT
 GACATTCACAAACGTTTTCCCTTATCCTTTGTACATCATCCTTTATATTTAGATAAAAATTCAT
 25 CATCCATATTTCCATGAGATCATAACTTGATGTACTTGGAATGTCTTGTAAGTAATCTTTT
 TTTTTTAATATATCTATTAATTCTGCTATATACATATTACATTTGTTTAAATTTTGTTCAAA
 TATATTATTA AAAAGTTTTATATTTTCATTAGACTTTAACATATGTATACGACGTCCCCCTT
 TTTGTTCTTGTGATTCTTTATTTTTTATTTTGTAAAATCTTTTCAGATATAACGTTATATAAC
 TTTGTTCTCTATTTTGTTTATATTAGTTTGACTTGTAAGTTATTTATGATTTTATCAAT
 30 ATTTAGATTATTGTTATATAATAAATTATTATAAATATTTAAAGTATCATTTAAACATTTGC
 TGTGTTCCCTTTCTTCAATATAACTTTTTCTTTTTAAATAAGATAATATGTTATATAAAACA
 GTATGATAATTTGTTATCTTCCCTTTAATATCATTATTAATATTATTATATTCTTTTTTCATC
 ATTAATATTGCATTCAGAAAAATGTTGTATAGTATCATCTATCTTTTTTACAGAATTCATAA
 AAACAGATTTATAATTTTTTTTTGACTTATCATATAATCTTTATTTAATAAATCGAACTTG
 35 TTATTCATTTTTTCATAAATATCTTCCACATTTTTATTATAAGTAATTC AATATCTTTCAA
 AATATTTTCTTTAAATCTTGTATATCTTCATTTATCATTTTTTTTATAATTATTAATTATAA
 TATTATCCTCCTTTTTCAAAAACATCATATTTTTTATAAATATATTCAATGTTGTCATTCATA
 ATCTTCTTGCCTTATCCCAATGTATATATTTTTTCATGACATTTTTTTTTCTAGTAACATAAA

TGATTCGTTTAAAAAATATGAAATATATTACATATACTTTTAATATATTGTATTAATGATT
TTGCATTATATAACTTTTTTTCAGATTCGTGATTATCTAAAATTTTGTATAATATCTTCCACT
TGTCTATTTAATAATAAATCTTTTATAAATCTTTATTCTCAGGATAAATTAATGATTCCTC
TATATGGTCAAATGGCATCTCATTATTTTCTTCTTTACCATATTGTTTTTGACATGTTTTTC
5 CTTACCATTTTGTTTTTCACATATTATTCCTTCACCGTTTTGTTTTTCACATATTATCTCG
TCACCGTTTTGTTTTTCACATATTATCTTTTCACCACTTTGTTTTTCACATATTATCTCTTC
ACCGTTTTGTTTTTCACATATTATCTTTTCACCACTTTGTTTTTCACATATTATCTTTTCAC
CACTTTGTTTTTCACATATTATCTTTTCACCACTTTGTTTTTCTTTTTTAATCCGTTTGTA
TTATATACACCAATAATTGCTGGCATTCTGCTTGGCTTCATCACTTATATGTGGTATGTT
10 TATTTTACATTGTGATATTCCTTTTTAATATTTTCGGAGAGAGAAAAGTAATCATGATCAT
ATTTTTGTAAAATATCCATATGGTCCAGTATAAAAATTCAGAGTATCATTATATTTAAAATTA
ATGTTACTATTGAGTTCCTCAAATGGTTAATAATAATCATTGTATGATTTTTTATTTGTAC
TAGATAATTTTTGGTATCATCTAAAATGAATAAGATGGTTTTACATATATCGTTTAAAAGAT
GATTTTCTTGATGAATATTTTTTTTTTATATTTAATAGATTATCATGCATTATATTAGACATA
15 TTTGTTTTAATTTGTTGAAAAGATTTTTTTTTGATTTATAAAAATTTTCTTCTAAAGAATGATA
TTTATTTAATAAGAATTGTGTAATATATTTTTCTTCTATTATTTTTTTAATTAATTTGAT
GAAATGCTTGTATATTTTTATATTTTTGAATAGTATCTTTTAAAAGAAAAATATTTTATTT
TGTAGATCATCTGTATTATCCATTTTATTTAATAAATTTTTTATTTTTTACTTTTTTCAA
TAAAATTTTTTCTTTTTCTAATAATATTTCTTTATTTTTCTTTAGACTATTTTGTATATTAT
20 TATATTCTTCTGTATCAAGATAAACACCTCTCTTTCTCTGCTTAAATTCAGTGCATTTCTT
AACTTTTCGATTTCAATTATTTAAATCCTTTATTTTTAATTGTTTCGTTGTTTTTATATTTAT
CTCGGGTCTATTCTTAATATCTTAGCTCGAAAGACATAATCTAAAGTGCTTAAAGTCTCAT
CAATACATAAAGAGGAGGGTGATATAGTGGCGACAATAAAAAGTCTTCGTTTTCCACCTAAC
GAATCTTGTAATAATCTGGTTAATTTAGAATCTCTGTAAGGAATATAAGATGAATTCTCAAT
25 CAACGAATTAATAACTCTACCTAAGGTTAATAAAGATTGATTTATATTACAACCTTCTTGTT
GTCTAATTTTTAAAGAACCATAAGAGCTTTCAAAGCATTTTCACTACCCGCTAAATCAACT
AAATTTAATTTTCTATTTTTGTTATACTTTCTCCTACATTATTTATATCTTTTATAATTAA
TGTTATAGTAAAATCGAATGACTTCTACTCGATTTTTTATTATAAGCCGTTTCAGCTGTCC
TTCTTTTTTTAATAGCTGAACATATAATATAATATATTTCTTCAAAGAATTAATACTTTTT
30 TCTTCTAACTTATCAACATTTAATCCTTTACTTTTTATTATTACTATCTTCATATATTCGAAG
TTTCATATTTTCATTTGTTGAACTTAATAAATCACATAATTCTTCATTATAATTTCTAGAT
AGCTAATTTTTATATTAAAATCGTACATATTCTTATCATCAAATGTTTGATACATATCATTA
TTCCTATTTTTATCTACACTACATTTTTGTACAACATCACAAGTAATATCTCTACTCTTTTC
GTTAACTAACAAATTGTTAGGTTCTTTATTAATTTTTAAATTATTATAAATATCATTTTTAT
35 CAATATTTATTTGTTACATAATAAATTATTATAAATTATTATTAATAATATTATTATTGTTA
CCATTAGTTTCTTATTTATTACATTTATATGTTTCGTTATCCTTTTCATCAAATATATTCTT
TTTTCTTTAAAATGTGCAATCTTTTCTTCTTTCTTTTATTTAATATATCGAATATTCTTT
TCGTAACCTCGAAATATAAGTCCAGTATCCTCATTCTCACAAAGTTCATAGCAATAGCTGATG

TCGCTATTAATACTTTTCATTCAAATCCACCTTTTTATTATTATCATATTGTTTCAGGTGTTC
 TAGTATTTTCCCCTCCATAGTATAGGTCTTACCCGTCCCAGTCTGTCCATAGCAGAACAGCG
 TACAATTGAATCCTTGCAAAACCTGAAGCGGCGAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATAT
 ATATATATGTACATGTATATTTATATGTATATGTATATATATATGTATAGTTATATGTATTT
 5 TTATTTTTATTTTTATTTTTATTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTTTATTTT
 ATTTTTATTTTTATTTTATATTTATATATGTGTAAAATTAACATGGGGAGCAAAGAATTC
 CCATATATTTTTTTTTTTTTAATCTATTTAATAAAACATTATTATGATATACGCAGAGGTGAT
 ATATACATGGTATTTATTTATTTTTTTTTTATATATTTTTTCAT
 TTGTTTCGTAGGAATATTCTTTTTTTTTCTGCACATATATTTCACTATCCATATAATATCAT
 10 AATACATCATGGAATAATTTATATATATATATATATATATATGTATATTTTTATTTTTACCTCAT
 CTACTATTTGGTAAATATAATTATTGAACAAAGTTTTCTGATCCACATCTTTATCACATGCA
 TAATCAAACCTATATTTTTTTTCGTATATTTCAATTGTTTCTATTAATTGTTAATATAACCTC
 ATTATTATTAATTCGAACTACCTCTTCATTATTTATATCGTTTTTTTTCTTTTTTCATTTAATG
 GTCTACACCTTACGATAACTTTTATATTTACGCAACTTGATTTATCATTATTATAAGAATTT
 15 CTGAGCATTTTACTTTTATTCAAATAAT

Tabelle 3:

Sequenzhomologie: Vergleich der humanen eg5-Sequenz mit der Plasmodium falciparum-eg5-Sequenz

20	1	60
human . SEQ	<u>GAATTC</u> <u>CGTCAT</u> <u>GGCGTC</u> <u>GCAGCC</u> . <u>AAATTC</u> . . . <u>GTCTGCGAAGAAG</u>	
PLASMO . SEQ	TTTTTTTTTTTTTATTCCTTGGATGTTCTTGGTAGTTTAAATTTTTTATTTTTGTAGTTT	
25	61	120
human . SEQ <u>AAAGA</u> <u>GGAGAAGGGGAAGAACATCCAGGTGGTGGTGAGATGCAGACC</u>	
PLASMO . SEQ	TCTTCTTTTATACGTTTTAAAGCAGGGGATGCCTTTTAGGAAATGCCCTATTTTCAATA	
30	121	180
human . SEQ	A . <u>TTTAATTTGGCAGAGCGGAAAGCTAGCGCCCAT</u> . <u>TCAATAGTAGAATGTGATCCCTGTA</u>	
PLASMO . SEQ	GCTTTAATTTTTGTAGATTGAAATTTATTATTATTATTATTATTGT . TGTTGTTGTT	
35	181	240
human . SEQ	<u>CGAAAAGAAGTTAGTGT</u> . <u>ACGAACTGGAGGATTGGCTG</u> . . <u>ACAAGAGCTCAAGGAAAACA</u>	
PLASMO . SEQ	GTTGTTGTTGTTGTTGTTATTATTGAATAATTATTGTTATATGAACATTTTGAACATT	
40	241	300
human . SEQ	<u>TACACTTTTGAT</u> <u>ATGGTGTTTGGAGC</u> <u>ATCTACTAAAC</u> . . <u>AG</u>	
PLASMO . SEQ	TATATTTCTCTTTCTTTTCATATTCTTTTAAACTTGTTACACTCATATTTTCTGTATTTAC	
40	301	360
human . SEQ	<u>ATTGA</u> . . <u>TGTTTACCG</u> <u>AAGTGTGTTTG</u> <u>TCCAATTCGGATGAAGTT</u> . <u>AT</u> .	
PLASMO . SEQ	ATCAAATCTTTTATTATGTTGATTGTTATTAAATAATTTAATTCCTTGATATGTTTCATC	

```

                                361                                420
human.SEQ  TATGGGCTATA...ATTGCAC...TATCTTTGC.GTATGGC.CAAACT.....GG
PLASMO.SEQ TATTGGTTGTATAGGATTATCCGTTGTATTCTTATTATATAGCATATATTCATTTAAGGG

```

```

5
                                421                                480
human.SEQ  CA.....CTG.GAAAACTTTTACAATGGA...AGGTGAAAGGTC.....ACCTA.....
PLASMO.SEQ TAGATTATTGTGATTAGTTTTTACATTTAATTTATTTTTATCACCTTTATTATTTATATT

```

Abbildung 1:

10

Diese Abbildung faßt die Ergebnisse von Beispielen 1 + 2 zusammen:

Gezeigt ist die Wirkung von Oligonukleotiden ON1 bis ON12 (eg5-Antisense) auf die Inhibierung der Proliferation von REH-Zellen (in Prozent).

15 ■ 1. Experiment

◆ 2. Experiment

CF : Cellfectin-Vergleich

Ansprüche:

1. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate, dadurch gekennzeichnet, daß es einem Teil einer eg5 kodierenden Sequenz entspricht.
2. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es 8-100 Nukleotiden einer eg5 kodierenden Sequenz entspricht.
3. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Länge von 8 bis 20 Nukleotiden hat.
4. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es einem Teil einer humanen eg5 und/oder einer Plasmodium falciparum eg5 kodierenden Sequenz entspricht.
5. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der Sequenzen SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 oder SEQ ID NO. 9 hat,
- wobei
- | | |
|--------------|---------------------------|
| SEQ ID NO. 1 | 5'-CGACGCCATGACGGAATTC-3' |
| SEQ ID NO. 2 | 5'-AATGGTCTGCATCTCACCA-3' |
| SEQ ID NO. 3 | 5'-GGCTGCGACGCCATGACGG-3' |
| SEQ ID NO. 4 | 5'-ATGACGGAATTC-3' |
| SEQ ID NO. 5 | 5'-CCATGACGGAAT-3' |
| SEQ ID NO. 6 | 5'-ACGCCATGACGG-3' |
| SEQ ID NO. 7 | 5'-GCGACGCCATGA-3' |
| SEQ ID NO. 8 | 5'-GGCTGCGACGCC-3' und |

SEQ ID NO. 9 5'-TTGGCTGCGACG-3' ist.

6. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das
5 Oligonukleotid eine oder mehrere Modifikationen aufweist, wobei sich jede Modifikation, im Vergleich zu einem aus natürlicher DNA aufgebautem Oligonukleotid mit der gleichen Sequenz, an einer bestimmten Phosphodiester Internukleosidbrücke und/oder an einer bestimmten β -D-2'-Desoxyriboseeinheit und/oder an einer bestimmten natürlichen
10 Nukleosidbasenposition befindet.
7. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß 1 bis 5
15 terminale Nukleotideinheiten am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligonukleotids durch modifizierte Internukleosidbrücken die am 5'- und/oder am 3'-Ende des bzw. der entsprechenden Nukleoside lokalisiert sind, geschützt ist.
8. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder
20 mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein internes Pyrimidinnukleosid und/oder eine am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende dieses Pyrimidinnukleosids lokalisierte Internukleosidbrücke modifiziert ist.
- 25 9. Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß jede Modifikation unabhängig voneinander ausgewählt ist aus
- a) dem Austausch der Phosphodiesterbrücke am 3'- und/oder 5'-Ende eines Nukleosids durch eine modifizierte Internukleosidbrücke,
30 b) dem Austausch der Phosphodiesterbrücke am 3'- und/oder 5'-Ende eines Nukleosids durch eine Dephosphobrücke,
c) der Austausch eines Zuckerphosphatrests aus dem Zuckerphosphatgerüst durch einen anderen Rest,

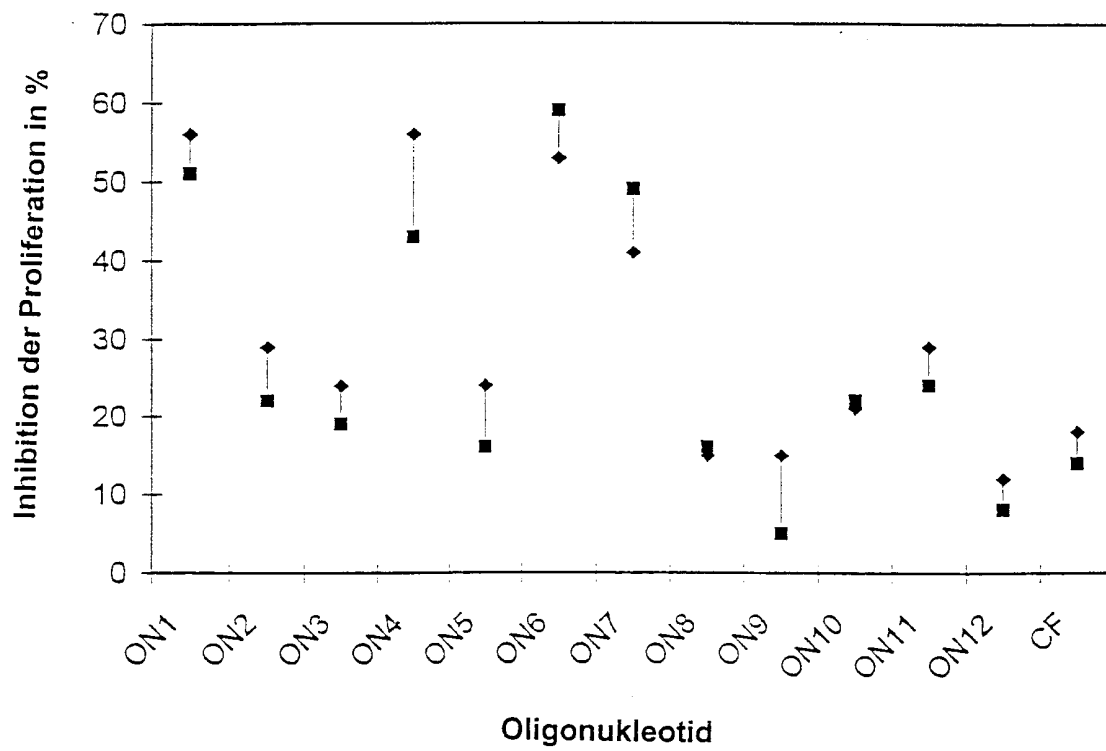
- d) dem Austausch einer β -D-2'-Desoxyriboseeinheit durch eine modifizierte Zuckereinheit,
- e) dem Austausch einer natürlichen Nukleosidbase durch eine modifizierte Nukleosidbase,
- 5 f) der Anbindung an ein Molekül, das die Eigenschaften des Oligonukleotids beeinflusst,
- g) der Anbindung an ein 2'5'-verbundenes Oligoadenylatmolekül oder ein Derivat davon, gegebenenfalls über ein geeignetes Linkermolekül, und
- h) der Einführung einer 3'-3'- und/oder einer 5'-5'-Inversion am 3'- und/oder am
- 10 5'- Ende des Oligonukleotids.
10. Verfahren zur Herstellung eines Antisense-Oligonukleotids oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, wobei in geeigneter Weise geschützte Monomere an einer Festphase kondensiert
- 15 werden.
11. Verwendung eines Antisense-Oligonukleotids oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 zur Inhibition der Expression von eg5.
- 20
12. Verfahren zur Inhibition der Expression von eg5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 mit einer eg5-kodierenden Nukleinsäure in Kontakt gebracht wird und an diese bindet.
- 25
13. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Antisense-Oligonukleotide oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 mit einem physiologisch unbedenklichen Trägerstoff und gegebenenfalls zusätzlichen
- 30 Substanzen gemischt werden.

14. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens ein Antisense-Oligonukleotid oder eines seiner Derivate gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 enthält.

Fig. 1

1/1

Inhibition der Proliferation von REH Zellen
mit eg5 Antisense oligonukleotiden



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Oligonukleotide zur Inhibierung der Expression von
humanem eg5

<130> HMR 1999/L046

<140>

<141>

<150> 19935303.4

<151> 1999-07-28

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<400> 1

cgacgccatg acggaattc

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

19

<400> 2
aatggtctgc atctcacca

19

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)

<400> 3
ggctgcgacg ccatgacgg

19

<210> 4
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)

<400> 4
atgacggaat tc

12

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<400> 5

ccatgacgga at

12

<210> 6

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<400> 6

acgccatgac gg

12

<210> 7

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<400> 7

gcgacgccat ga

12

<210> 8

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<400> 8

ggctgcgacg cc

12

<210> 9

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<400> 9

ttggctgcga cg

12

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<400> 10

cgacgccatg acggaattc

19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<400> 11

aatggtctgc atctcacca

19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<400> 12

ggctgcgacg ccatgacgg

19

<210> 13

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<400> 13

atgacggaat tc

12

<210> 14
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)

<400> 14
ccatgacgga at

12

<210> 15
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)

<400> 15
acgccatgac gg

12

<210> 16
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)

<400> 16

gcgacgccat ga

12

<210> 17
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
 Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)

<400> 17
 ggctgcgacg cc

12

<210> 18
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Antisense
 Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)

<400> 18
 ttggctgcca cg

12

<210> 19
 <211> 3784
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 gaattccgtc atggcgctgc agccaaattc gtctgccaag aagaaagagg agaaggggaa 60
 gaacatccag gtggtggtga gatgcagacc atttaatttg Ggcagagcgg aaagctagcg 120
 cccattcaat agtagaatgt gatcctgtac gaaaagaagt tagtgtacga actggaggat 180
 tggctgacaa gagctcaagg a0aaacatac acttttgata tgggtgttgg agcatctact 240
 aaacagattg atgtttaccg aagtgttgtt tgtccaattc tggatgaagt tattatgggc 300

ta0taattgc actatctttg cgtatggcca aactggcact ggaaaaactt ttacaatgga 360
 aggtgaaagg tcacctaagc aagagtatac ctgggaagag gat0cccttg gctgggataa 420
 ttccacgtac ccttcatcaa atttttgaga aacttactga taatggtact gaattttcag 480
 tcaaagtgtc tctgttggag atct0ataat gaagagcttt ttgatcttct taatccatca 540
 tctgatgttt ctgagagact acagatgttt gatgatcccc gtaacaagag aggagtgata 600
 attaa0aggt ttagaagaaa ttacagtaca caacaaggat gaagtctatc aaatttttaga 660
 aaagggggca gcaaaaagga caactgcagc tactctgatg aatgca0tac tctagtcggt 720
 cccactcagt tttctctgtt acaatacata tgaaagaaac tacgattgat ggagaagagc 780
 ttgttaaaat cggaaagttg aacttgg0tt gatcttgcag gaagtgaaa cattggccgt 840
 tctggagctg ttgataagag agctcgggaa gctggaaata taaatcaatc cctgttgact 900
 ttgggaag0g gtcattactg cccttgtaga aagaacacct catgttcctt atcgagaatc 960
 taaactaact agaatcctcc aggattctct tggaggcgt acaagaaca0 0tctataatt 1020
 gcaacaattt ctccctgcac tctcaatctt gaggaaactc t0gagtacat tggaatatgc 1080
 tcatagagca aagaacatat tgaataagcc tg0aaagtga tcagaaactc accaaaaaag 1140
 ctcttattaa ggagtatacg gaggagatag aacgtttaa acgagatctt gctgcagccc 1200
 gtgagaaaaa tgg0agtgtat ttttctgaa gaaaatttta gaggcatgag tggaaaatta 1260
 actgttcaag aagagcagat tgtagaattg attgaaaaaa ttgggtgctgt tgag0gagga 1320
 gctgaatagg gttacagagt tgtttatgga taataaaaat gaacttgacc agtgtaaatc 1380
 tgacctgcaa aataaaacac aagaacttga aacca0ctca aaaacatttg caagaaacta 1440
 aattacaact tgttaaagaa gaatatatca catcagcttt ggaaagtact gaggagaaac 1500
 ttcattgatgc tgccag0caa gctgcttaac acagttgaag aaactacaaa agatgtatct 1560
 ggtctccatt ccaaactgga tcgtaagaag gcagttgacc aacacaatgc agaagct0ca 1620
 ggatattttt ggcaaaaacc tgaatagtct gtttaataat atggaagaat taattaagga 1680
 tggcagctca aagcaaaagg ccatgctaga agtacata0a gaccttattt ggtaactctgc 1740
 tgtcttccag tgtctctgca ttagatacca ttactacagt agcacttgga tctctcacat 1800
 ctattccaga aaatgtgtc0 tactcatggt tctcagattt ttaatatgat actaaaagaa 1860
 caatcattag cagcagaaag taaaactgta ctacaggaat tgattaatgt actcaagact 1920
 0gatcttcta agttcactgg aatgatctt atccccact gtgggtgtcta tactgaaaat 1980
 caatagtcaa ctaaagcata ttttcaagac ttcattgaca g00tggccga taagatagaa 2040
 gatcaaaaaa aaaggaactc agatggcttt ct0agtata ctgtgtaaca atctacatga 2100
 actacaagaa aataccattt gtct0cttgg ttgagtcaca aaagcaatgt ggaaacctaa 2160
 ctgaagacct gaagacaata aagcagacct attcccagga actttgcaag ttaatgaatc 2220
 tttgg0acag agagattctg tgctttggag gaaaagtgtg aaaatataca gaaaccactt 2280
 agtagtgtcc aggaaaatat acagcagaaa tctaaggata tagtca0aca aaatgacttt 2340
 tcacagtcaa aaattttgtg ctgattctga tggcttctca caggaactca gaaattttaa 2400
 ccaagaaggt acaaaattgg ttgaaga0at ctgtgaaaca ctctgataaa ctcaatggca 2460
 acctgaaaaa aatatctcaa gagactgaac agagatgtga atctctgaac acaagaacag 2520
 tttatttt0t ctgaacagtg ggtatcttcc ttaaatgaaa gggaacagga acttcacaac 2580
 ttattggagg ttgtaagcca atgttgtgag gcttcaagtt cagacatca0 ctgagaaatc 2640
 agatggacgt aaggcagctc atgagaaca gcataacatt tttcttgatc agatgactat 2700
 tgatgaagat aaattgatag cacaaaatct 0agaacttaa tgaaaccata aaaattgggt 2760
 tgactaagct taattgcttt ctggaacagc atctgaaact ggatatccca acaggtacga 2820
 caccacagag g0aaaaagta tttataccca tcaaacctgg taagaactga accacgtgaa 2880
 catctccttg atcagctgaa aaggaaacag cctgagctgt taatgatgct aa0actgttc 2940
 agaaaaaac aaagaagaga caattccgga tgtggatgta gaagaggcag ttctggggca 3000
 gtatactgaa gaacctctaa gtcaagagcc atc00tgtag atgctggtgt ggattgttca 3060
 tcaattggcg gggttccatt tttcc0agca taaaaaatca catggaaaag acaaaagaaa 3120
 cagaggcatt aacaca0ctg gagaggtcta aagtggaaga aactacagag cacttgggta 3180

caaagagcag attacctctg cgagcccaga tcaaccttta attcacttgg gggttgg0ca 3240
 attttatttt taaagaaaaa cttaaaaata aaacctgaaa cccagaact tgagccttgt 3300
 gtatagattt taaaagaata tatatatcag ccggg0gc0g tggctctagc tgtaatocca 3360
 gctaactttg gaggctgagg cgggtggatt gcttgagccc aggagtttga gaccagcctg 3420
 gccaacgtgc gctaaaacc0 ttcgtctctg ttaaaaatta gccggg0cgtg gtgggcacac 3480
 tcctgtaatc ccagctactg gggaggctga ggcacgagaa tcacttgaac ccagaagcgg 3540
 0ggttgcagt gagccaaagg tacaccacta cactccagcc tgggcaacag agcaagactc 3600
 ggtctcaaaa ataaaattta aaaaagatat aaggcagtac t0gtaaattc agttgaattt 3660
 tgatatctac ccatttttct gtcatcccta tagttcactt tgtattaaat tgggtttcat 3720
 ttgggatttg caatgtaaat ac0gtatttc tagttttcat ataaagtagt tcttttagga 3780
 attc 3784

<210> 20

<211> 5340

<212> DNA

<213> Plasmodium falciparum

<400> 20

tttttttttt tttattcctt ggatgttctt ggtagttaa attttttatt tttgtagttt 60
 tcttctttta tacgttttaa agcaggggat gccttttttag gaaatgcctt attttcaata 120
 gctttaattt ttgtagattg aaatttatta ttattattat tattattggt gttggtgttg 180
 ttggtgttgt tgttgttatt atttgaataa ttatttgta tatgaacatt ttgaacattt 240
 atatttctct ttctttcata ttcttttaaa ctggttacac tcatattttc tgtatttaca 300
 tcaaactctt tattatggtg attgttattt aaataattta attccttgata tgtttcatct 360
 attggttgta taggattatc cgttgtattc ttattatata gcatatattc atttaagggg 420
 agattattgt gattagtttt tacatttaat ttatttttat cacctttatt atttatatta 480
 tgaggatac tactattcgt tgtatgatca tttaaactat tgtaacgaga gtaattattt 540
 tcatgcgcta caattttatc atcttgaata agaaattgga agttttcatc gatttgttca 600
 aatactttac ttaaactctat atcatgtggt gttgtaattt gttctatctc tttcatcaag 660
 gtatttttaa ctccaagta taaattttgt cttatgatat catcattata aagataataa 720
 ttatgatgat caccttgatc tattttatta tcatcattat aaagataata attatgatga 780
 tcaccttgat ccattttatt atcatcatta taaagataat tattatgatc atgaccttga 840
 tccattttat tatcatcatt ataaagataa ttattatgat catgaccttg atccatttta 900
 ttatcatcat tataaagata attattatga tcatgacctt gatccatttt attatcatca 960
 taattattat tgcaccatt tttattattg tcatgatcat ttttattatt gtcaccattt 1020
 ttattattat catgattatt tttattatta tcatgattat ttttattatt atcatgatta 1080
 tttttattat tatcatcatt tttattatta tcataattcg tgtcgttaagt cgaatcccta 1140
 tttagtgatg tgattttcat cggagtaaac atatctatga cattcacaaa cgtttccctt 1200
 atcctttgta catcatcctt tatattttaga taaaattcat catccatatt ttccatgaga 1260
 tcataacttg atgtacttgg aatgtcttgt aagtaatctt ttttttttaa tatatctatt 1320
 aattctgcta tatacatatt acattttgttt aaattttggt caaatatatt attaaaaagt 1380
 tttatatttt cattagactt taacatatgt atacgacgtc cccctttttg ttcttgtgat 1440
 tctttatttt tattttgtaa aatcttttca gatataacgt tatataactt tcgtttctct 1500
 attttgttta tattagtttg acttgtaaag ttatttatga ttttatcaat atttagatta 1560
 tttgtatata ataaattatt ataaatattt aaagtatcat ttaaacattt gctgtgttcc 1620
 ttttctcaa tataactttt tctttttaaa taagataata tgttatataa aacagtatga 1680
 taatttgta tcttctttt aatatcatta ttaatattat tatattcctt tcatcatta 1740

atattgcatt cagaaaaatg ttgtatagta tcatctatct tttttacaga attcataaaa 1800
acagatttat aatTTTTTTT tgacttatca tataattcctt tatttaataa atcgaacttg 1860
ttattcattt tttcataaat atcttccaca tttttattta taagtaattc aatatctttc 1920
aaaatatttt ctttaaattc ttgtatatct tcatttatca tttttttata attattaatt 1980
ataatattat cctccttttc aaaaacatca tttttttat aaatatattc aatggtgtca 2040
ttcataatct tcttgcctct atcccaatgt atataatttt catgacattt tttttctagt 2100
aacataaatg attcgtttta aaaaatatga aatatattac atatactttt aatatattgt 2160
attaatgatt ttgcattata taactttttt tcagattcgt gattatctaa attttgtata 2220
atatcttcac cttgtctatt taataataaa tcttttataa attcctttatt ctcaggataa 2280
ttaaagatt cctctatatg gtcaaatggc atctcattat tttcttcttt accatattgt 2340
ttttgacatg tttttccttc accattttgt ttttcacata ttattccttc accgttttgt 2400
ttttcacata ttatctcgtc accgttttgt ttttcacata ttatcttttc accactttgt 2460
ttttcacata ttatctcttc accgttttgt ttttcacata ttatcttttc accactttgt 2520
ttttcacata ttatcttttc accactttgt ttttcacata ttatcttttc accactttgt 2580
ttttcttttt ttaatcgtt tgtattatat acaccaataa ttgctggcat tttctgcttg 2640
gcttcatcac ttatatgtgg tatgtttatt ttacattgtg atatttcctt ttaatatatt 2700
tcggagagag aaaagtaatc atgatcatat ttttgtaaaa tatccatag gtccagtata 2760
aaattcagag tatcattata tttaaaatta atgttactat tgagttcttc aaaatggtta 2820
atataatcat tgtatgattt tttattttgt actagataat ttttggtatc atctaaaatg 2880
aataagatgg ttttaccat atcgtttaaa agatgatttt ctgatgaat attttttttt 2940
atatttaata gattatcatg cattatatta gacatatttg ttttaatttg ttgaaaagat 3000
tttttttgat ttataaaatt ttcttctaaa gaatgatatt tatttaataa gaattgtgta 3060
atatattttt ctctattat ttttttaatt aatatttgat gaaatgcttg tatattttta 3120
tatttttgaa tagtatcttt taaaaagaaa aatattttat ttgtagatc atctgtatta 3180
tccattttat ttaataaatt ttttattttt ttactttttt caaataaaat tttttctttt 3240
tctaataata tttcttttatt tttctttaga ctattttgta tattattata ttcttctgta 3300
tcaagataaa cacctctctt ttctctgctt aaattcagtg catttcttaa cttttcgatt 3360
tcattattta aatcctttat ttttaattgt ttogttgttt ttatatttat ctcggtctta 3420
ttcttaatat tcttagctcg aaagacataa tctaaagtgc ttaaagtctc atcaatacat 3480
aaagaggagg gtgatatagt ggcgacaata aaagtcttcg tttcccacc taacgaatct 3540
tgtaataatc tgggttaattt agaatctctg taaggaatat aagatgaatt ctcaatcaac 3600
gaattaataa ctctacctaa ggtaataaaa gattgattta tattacaact ttcttgttgt 3660
ctaattttta aagaaccata agagcttttc aaagcatttt cactaccgc taaatcaact 3720
aaatttaatt ttctattttt tgttatactt tctctacat tatttatatc ttttataatt 3780
aatgttatag taaaaatcga atgacttcta ctogattttt tattataagc cgtttcagct 3840
gtccttcttt ttttaatagc tgaacatata atataatata tttcttcaaa agaattaata 3900
ctttttcttt ctaacttatc aacatttaat cttttacttt tattattact atcttcatat 3960
attcgaagtt tcatattttc atttgttgaa cttaataaat cacataattc ttcattatat 4020
atctctagat agctaatttt tatattaaaa tcgtacatat tcttatcatc aaatgtttga 4080
tacatatcat tattcctatt tttatctaca ctacattttt gtacaacatc acaagtaata 4140
tctctactct tttcgtaac taacaaattg ttaggttctt tattaatttt taaattatta 4200
taaatatcat ttttatcaat atttattttg ttacataata aattattata attattatta 4260
ataatattat tattgttacc attagtttcc ttatttatta catttatatg ttcggtatcc 4320
ttttcatcaa atataattctt ttttccttta aaatgtcgaa tcttttcttc tttcctttta 4380
tttaatatat cgaatattct tttcgtaact cgaatatata gtccagtatc ctcaattctca 4440
caaagttcat agcaatagct gatgtcgcta ttaactttt cattcaaatc caccttttta 4500
ttattatcat attgtttcag gtgttctagt attttccctt ccatagtata ggtcttacc 4560
gtcccggtct gtccatagca gaacagcgta caattgaatc cttgcaaac ctgaagcggc 4620

gaacaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatatat atatatatgt acatgtatat ttatatgtat 4680
atgtatatat atatgtatag ttatatgtat ttttattttt atttttattt ttatatattat 4740
ttttattttt atatttattt ttattttttat attttatttt atttttatat ttatatattat 4800
atatgtgtaa aattaacatg gggagcaaag aatttcccat atattttttt tttttaatct 4860
atthaataaa acattattat gatatacgca gaggtgatat atacatggta tttatttatt 4920
tttttttata tttttttcat ttgtttcgta ggaatattct tttttttct gcacatatat 4980
ttcactatcc atataatata ataatacatc atggaataat ttatatatat atatatatat 5040
atgtatattt tttttttacc tcatctacta tttggtaaat ataattattg aacaaagttt 5100
tctgatocac atctttatca catgcataat caaaactata ttttttttctg tatatttcat 5160
tgtttctatt aattgttaat ataacctcat tattattaat tcgaactacc tcttcattat 5220
ttatatcgtt tttttctttt tcatttaatg gtctacacct tacgataact tttatattta 5280
cgcaacttga tttatcatta ttataagaat ttctgagcat tttactttta ttcaaataat 5340