



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 18 953 T2 2005.08.04

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 052 996 B1

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A61K 31/70

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 18 953.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/FR99/00229

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 901 702.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/039718

(86) PCT-Anmeldetag: 03.02.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.08.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 22.11.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 28.07.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.08.2005

(30) Unionspriorität:

9801237 03.02.1998 FR

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, GB, GR, IT, NL, PT

(73) Patentinhaber:

Laboratoires Goemar S.A., Saint-Malo, FR

(72) Erfinder:

YVIN, Jean-Claude, F-35400 Saint Malo, FR; CRUZ, Florence, F-35400 Saint Malo, FR; DESCAMPS, Valerie, F-29680 Roscoff, FR; RICHARD, Christophe, F-29400 Plougourvest, FR; THIBAL, Vesna, F-69002 Lyon, FR; ARRIGO, Patrick, F-74930 Pers-Jussy, FR; CLOAREC, Bernard, F-29250 Saint Pol de Leon, FR

(74) Vertreter:

Bosch, Graf von Stosch, Jehle  
Patentanwaltsgesellschaft mbH, 80639 München

(54) Bezeichnung: ZUSAMMENSETZUNG VON OLIGOSACCHARIDEN ZUR REGULIERUNG VON APOPTOSE

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 betrifft ein Medikament zur Behandlung von Fehlregulationen der Apoptose.
- [0002] Mit dem Begriff "Apoptose" wird der programmierte Zelltod oder der zelluläre Selbstmord bezeichnet.
- [0003] Dieser Tod entspricht einer Selbsteliminierung der Zellen nach einem bestimmten Programm.
- [0004] Sie zeigt sich zunächst durch Schwellungen auf der Ebene der Plasmamembran, Schwellungen, die mit einer strukturellen Veränderung der Membran einhergehen, und anschließend durch einen Volumenverlust der Zelle, die sich zusammenziehen und zusammenzufallen scheint.
- [0005] Der Kern kondensiert und die DNA spaltet sich in kleine Stücke (Raff, "Nature", 356, 397, 1992; Bortner et al. "Trends in Cell. Biol" 5, 21, 1995).
- [0006] In vivo wird die apoptotische Zelle von den Makrophagen erkannt, die diese phagozytieren und ohne Beteiligung irgendeines Entzündungsprozesses vernichten.
- [0007] Ebenfalls in vivo wird die Apoptose von lebenden Organismen in hohem Maße zur Kontrolle der Zellpopulationen benutzt, insbesondere der Lymphozyten nach ihrer Aktivierung.
- [0008] Überdies spielt die Apoptose im Verlauf der Entwicklung der Organismen eine wesentliche Rolle bei der Eliminierung von nicht erforderlichen embryonalen Geweben (Eidechsenschwanz, Anlage der Geschlechtsorgane des einen oder des anderen Geschlechts) und bei der Formung des Organismus (Eliminierung der interdigitalen Schwimmhäute zwischen den künftigen Fingern und sonstigem).
- [0009] Bestimmte in lebenden Organismen vorhandene Verbindungen lösen spezifisch ein apoptotisches Phänomen aus. So wird zum Beispiel bei Säugetieren durch die Verbindung des Fas-Liganden mit dem Fas-Membranrezeptor, auch bezeichnet als APO-1 oder CD95, spezifisch eine Apoptose induziert; diese Apoptose wird vom lebenden Organismus zur Kontrolle der Lymphozytenpopulationen, insbesondere der T-Lymphozytenpopulationen, benutzt.
- [0010] Der vorstehend genannte Rezeptor und Ligand stellen ein äußerst interessantes physiologisches System dar, das an der spezifischen Eliminierung von Zellen beteiligt ist, die im Organismus nicht mehr erwünscht sind.
- [0011] Insbesondere ist die Zelleliminierung im Verlauf der Reifung und der Aktivierung der T-Lymphozyten zu nennen. Das Fas-System, das heißt Fas-Ligand/Fas-Rezeptor, spielt bei der Homöostase des Immunsystems eine wesentliche Rolle.
- [0012] Der Fas-Rezeptor ist ein Mitglied einer Familie von Proteinen, die an der Oberfläche der Zellen als Rezeptoren wirken und die auch TNF-Rezeptoren (Tumornekrosefaktor) und NGF-Rezeptoren (Nervenwachstumsfaktor) umfassen.
- [0013] Der Fas-Rezeptor ist in zahlreichen Zellen exprimiert; in Höhe des Golgi-Apparates tritt er gehäuft auf.
- [0014] Der Mechanismus, mit dem das Fas-System den Zelltod auslöst, ist nicht bekannt, er macht jedoch von der Aktivierung der Proteasen Gebrauch, die auch unter der Bezeichnung ICE-like-Proteasen (Englisch für "interleukine-1  $\beta$ -converting enzyme") oder Caspuren bekannt sind.
- [0015] Es kann festgehalten werden, dass der Fas-Ligand von den Zellen sekretiert werden kann, um den eigenen Selbstmord zu induzieren; da sich dieser Ligand aber auch an der Oberfläche von Aktivierungszellen befindet, wird durch diese dadurch der Selbstmord von Zielzellen durch einfachen Kontakt induziert. Nach der Aktivierung des Fas-Rezeptors interagiert dieser mit zahlreichen intrazellulären Proteinen, um das die Apoptose auslösende Signal zu übertragen.
- [0016] In vitro existieren andere Mittel, um eine Apoptose zu induzieren, zum Beispiel durch Inhibition der Aktivität bestimmter Kinasen, insbesondere der Kinase C; in diesem Fall kann Staurosporin eingesetzt werden.
- [0017] Dieses Produkt ist zur Induzierung des Zelltods durch Apoptose sehr wirksam.

[0018] Im Übrigen ist in dem Patent EP 795 560 ein Oligosaccharid-Keratansulfat als Wirkstoff beschrieben, der zur Induzierung einer Apoptose geeignet ist.

[0019] Es ist jedoch anzumerken, dass sich die Transduktion der durch das Staurosporin induzierten Signale von der unterscheidet, bei der der Fas-Rezeptor beteiligt ist.

[0020] Wenn auch die Mittel zur Aktivierung der Apoptose unterschiedlich sind, so ist die durch diese beiden Aktivierungsarten induzierte Exekution des Todesprogramms jedoch gleich, die durch eine Aktivierung der Caspase-Kaskade und einer Störung der Mitochondrien gekennzeichnet ist, wodurch Verbindungen (zum Beispiel Cytochrom c) freigesetzt werden, die die programmierte Zerstörung der Zelle fördern. Dieses Phänomen ist energieabhängig, erfordert jedoch nicht die Synthese neuer Proteine. In einer Zelle steht tatsächlich alles bereit, um die eigene Zerstörung zu gewährleisten.

[0021] In vivo kommt der Regulation des apoptotischen Phänomens eine erhebliche Bedeutung zu.

[0022] Mit dessen Fehlregulation stehen nämlich zahlreiche Erkrankungen in Zusammenhang.

[0023] Es können zum Beispiel zwei Fälle von Fehlregulationen der Apoptose genannt werden, bei denen diese über das Pas-System moduliert wird: Es handelt sich um Autoimmunkrankheiten, bei denen die Apoptose fehlerhaft ist, und um die Zerstörung von HIV-1 infizierten CD4+ T-Lymphozyten, in denen die Aktivität der Apoptose zu hoch ist.

[0024] In anderen Fällen, wie den neuronalen Degenerationen, die zum Beispiel bei der multiplen Sklerose auftreten, wird die Apoptose über noch nicht bekannte Wege aktiviert.

[0025] Es existieren weitere Erkrankungen, bei denen die Apoptose fehlerhaft ist; diesbezüglich kann die Akkumulation von Krebszellen genannt werden, deren Apoptose vom Fas-System abhängen scheint ("Green", Science, vol. 278, 1246, 1997).

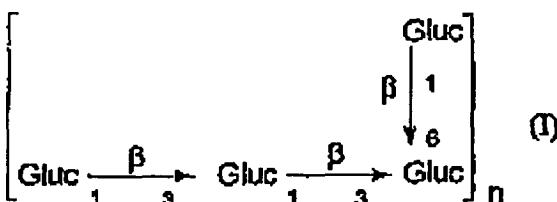
[0026] In Anbetracht der vorstehend getroffenen Feststellungen kam der Anmelderin der Verdienst zu, herauszufinden, dass ab dem Augenblick, in dem ein Medikament verfügbar ist, das sich zur Modulierung der Fehlregulationen der Apoptose sowohl hinsichtlich einer Aktivierung bei Erkrankungen, die Autoimmunkrankheiten und Krebserkrankungen einschließen, als auch hinsichtlich deren Inhibition bei Erkrankungen, die AIDS-Erkrankungen einschließen, eignet, eine Bekämpfung dieser Erkrankungen möglich wäre.

[0027] Und es war ihr nicht weniger großer Verdienst, herauszufinden, dass gewisse oligosaccharidsche und monosaccharidsche Substanzen, die gegebenenfalls auf wenigstens einigen ihrer Einheitsmotive zumindest einen Substituenten der Klasse aufweisen, die die funktionellen Gruppen Sulfat, Methyl und Acetyl umfasst, sich dazu eigneten, Fehlregulationen der Apoptose zu modulieren.

[0028] Gegenstand der Erfindung ist daher ein Medikament, dass dadurch gekennzeichnet ist, dass es als Wirkstoff eine wirksame Menge von mindestens einer oligosaccharidschen Substanz aufweist, die dazu geeignet ist, Fehlregulationen der Apoptose zu modulieren, und gegebenenfalls auf wenigstens einigen ihrer Einheitsmotive zumindest einen Substituenten der Klasse aufweist, die die funktionellen Gruppen Sulfat, Methyl und Acetyl umfasst, wobei die Substanz ausgewählt ist aus der Klasse, umfassend

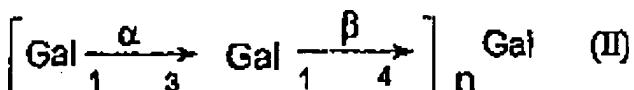
- Oligosaccharide, die auf enzymatischem oder chemischem Weg von Polymeren der Klasse abgeleitet sind, die  $\beta$ -1-3-Glukane umfasst, die gegebenenfalls  $\beta$ -1-6-Verzweigungen aufweisen,
- Oligosaccharide, die auf enzymatischem oder chemischen Weg von Carrageenanen, Agaren und Porphyranen abgeleitet sind.

[0029] Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Medikament als Wirkstoff eine wirksame Menge von mindestens einem Oligosaccharid auf, das dazu geeignet ist, Fehlregulationen der Apoptose zu modulieren, und das der Formel



entspricht, in welcher n eine ganze Zahl von 1 bis 50, vorzugsweise von 5 bis 10, darstellt, und in welcher die Zahl der Verzweigungen von 0 bis 3 pro Wiederholungseinheit variiert.

**[0030]** Gemäß einer anderen vorteilhaften Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Medikament als Wirkstoff eine wirksame Menge von mindestens einem sich wiederholenden Disaccharid (Repetier – Disaccharid) auf, das dazu geeignet ist, Fehlregulationen der Apoptose zu modulieren, und das der Formel



entspricht, in welcher n eine ganze Zahl von 1 bis 50 ist, vorzugsweise von 1 bis 20, wobei mindestens einige der sich wiederholenden Disaccharide der Formel (II) eine oder mehrere Sulfat-Gruppen aufweisen können.

**[0031]** Gemäß einer anderen vorteilhaften Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Medikament als Wirkstoff eine wirksame Menge des Produkts auf, das dazu geeignet ist, die Apoptose wenigstens teilweise zu inhibieren, und das durch Hydrolyse von Natrium-Jota-Carrageenat erhalten wird, wobei dieses Produkt aus einem Gemisch aus Oligo-Jota-Carrageenanen, bezeichnet als I<sub>o</sub>, gebildet wird, dessen Gesamtgehalt an Monosacchariden (bestimmt nach Tillmans und Philippi) 62% beträgt und dessen durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Zablakis und Perez bestimmtes Größenverteilungsprofil lautet:

Jota-Neocarratetraose	(DP 2)	8-12 %
Jota-Neocarrahexasose	(DP 3)	23-27 %
Jota-Neocarraoctaose	(DP 4)	18-22 %
Jota-Neocarradecaose	(DP 5)	13-17 %
Jota-Neocarradodecaose	(DP 6)	8-12 %
Oligo-Jota-Carrageenan	(DP 7)	3-7 %
Oligo-Jota-Carrageenanen, gebildet aus 8 bis 15 sich wiederholenden Disacchariden	(DP 8-15)	13-17 %

**[0032]** Die vorstehend genannten Methoden sind beschrieben in "Botanica marina", 33, 273–276 (1990) hinsichtlich Zablakis E. & Perez J., und in "Biochem. Z.", 215, 30–60 (1930) hinsichtlich Tillmans J. & Philippi K.

**[0033]** Zur Herstellung des Produkts I<sub>o</sub> kann, wie nachstehend beschrieben, verfahren werden.

**[0034]** Das Jota-Carrageenan wird in Gegenwart des teilweise gereinigten Jota-Carrageenase-Enzyms bei einer Temperatur von 45–50°C inkubiert, anschließend werden die Hydrolyse-Produkte über einer Membran von 10.000 Da ultrafiltriert. Man erhält somit das Produkt I<sub>o</sub>.

**[0035]** Das Jota-Carrageenan-Polymer wird insbesondere durch eine im Stamm Escherichia coli überexprimierte, rekombinante Jota-Carrageenase hydrolysiert.

**[0036]** Die Herstellung des Enzyms erfolgt durch Auflösung des Bakterienüberstandes (entspricht 1 Liter Kultur) in 50 ml Pufferlösung Tris 10 mM pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, so dass man schließlich 500 U/ml erhält.

**[0037]** Praktisch betrachtet, werden 100 g Jota-Carrageenan-Substrat in 20 l Wasser aufgelöst, das (bei 80°C) heiß destilliert wird, um eine Konzentration von 5 g/l zu erhalten, anschließend wird der pH-Wert mit Ammoniumcarbonat auf 7,5 eingestellt.

**[0038]** Zur Durchführung der Hydrolyse wird das Enzym zu 50 U/g Polymer hinzugegeben. Die kontinuierliche Ultrafiltration beginnt nach 30 Minuten; es handelt sich um eine tangentiale Ultrafiltration.

**[0039]** Für diese tangentiale Ultrafiltration kann ein Gerät der Marke Pellicon mit einer Filterkassette von 10.000 Da 0,46 m<sup>2</sup> PTGC der Firma Millipore verwendet werden; dieses Gerät wird mit einem Eingangsdruck von 2 bar und einem Ausgangsdruck von 0,5 bar geregelt.

[0040] Der Filtratablauf ist teilweise geschlossen, um die Filtrierdurchflussmenge bei 1 Liter pro Stunde zu halten.

[0041] Die Eigenschaften des Reaktionsraums sind so gewählt, dass eine Versorgung des Enzyms mit Substrat bis zum Aufbrauch der 20-Liter-Lösung und die Aufrechterhaltung eines festen Volumens von 2 Litern möglich ist.

[0042] Man erhält 18 l eines Ultrafiltrats, das durch Rotationsverdampfung bis auf 1 Liter konzentriert wird; anschließend wird das Konzentrat gefriergetrocknet. Die auf diese Weise gewonnene Trockensubstanz enthält das Produkt I<sub>9</sub>.

[0043] Die somit gewonnenen Oligo-Carrageenane der Fraktion I<sub>9</sub> wurden einer zusätzlichen Fraktionierung durch Niederdruck-Chromatographie über einer Biogel-P6-Säule und anschließend über einer Sephadex-G10-Säule unterzogen.

[0044] Man erhält somit die weiter oben bestimmten Fraktionen.

[0045] Gemäß einer anderen vorteilhaften Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Medikament als aktiven Wirkstoff eine wirksame Menge des Produkts auf, das dazu geeignet ist, die Apoptose wenigstens teilweise zu inhibieren, und das aus der Fraktion DP 7 des Produkts I<sub>9</sub> gebildet wird.

[0046] Gemäß einer anderen vorteilhaften Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Medikament als Wirkstoff eine wirksame Menge des Produkts auf, das dazu geeignet ist, die Fehlregulationen der Apoptose zu aktivieren, und das durch wässrig-saure Extraktion aus einer als Laminaria digitata bezeichneten Braunalge gewonnen wird, wobei dieses Produkt durch ein Gemisch aus Oligo-β-1-3-Glucanen, bezeichnet als L<sub>11</sub>, gebildet wird und 1 bis 50, vorzugsweise 20 bis 30 Saccharid-Einheiten aufweist, wobei das besagte Produkt das in [Fig. 1](#) dargestellte NMR-Spektrum zeigt.

[0047] Es ist anzumerken, dass das Produkt L<sub>11</sub> auch durch wässrige Extraktion allgemein aus Braunalgen gewonnen werden kann, von denen Laminaria digitata ein Vertreter ist.

[0048] Die Herstellung des Produkts L<sub>11</sub> kann, wie nachstehend beschrieben, erfolgen.

[0049] Zu 300 g frischen Algen vom Typ Laminaria digitata, die im August in frischer oder trockener Form geerntet wurden, wird nach und nach 1 l 0,3%iger Schwefelsäure zugegeben.

[0050] Der Vorgang erfolgt im Wasserbad bei einer Temperatur von etwa 70°C für die Dauer von 2 Stunden und 30 Minuten unter Rühren.

[0051] Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.

[0052] Das gewonnene Extrakt wird durch Filtration über einem Filter mit einer Porosität von 1,2 µm geklärt.

[0053] Die sich aus dieser Filtration ergebende Flüssigkeit wird einer tangentialen Ultrafiltration über einer Membran mit einer Porosität von 50.000 Dalton unterzogen.

[0054] Die Ultrafiltration wird bei einem gleich bleibenden Druck von 1 bar durchgeführt.

[0055] Man erhält auf diese Weise ein Ultrafiltrat, dessen pH-Wert auf 5,5 gebracht wird und das ein Volumen von etwa 0,8 Liter aufweist. Dieses Ultrafiltrat wird einer Dialyse über einer Membran aus Celluloseester mit einer Porosität von 500 Dalton unterzogen.

[0056] Man erhält ein Dialysat, das durch Verdampfung bei einer Temperatur von 80°C mit Hilfe einer Vorrichtung vom Typ ROTOVAPOR auf ein Volumen von 100 ml konzentriert und anschließend gefriergetrocknet wird.

[0057] Man erhält 7 g eines cremefarbenen Pulvers, das das Produkt L<sub>11</sub> darstellt.

[0058] Eine Analyse durch Ionenchromatographie in Verbindung mit Amperometrie, unter Verwendung eines von der Firma DIONEX vertriebenen Ionenaustauscher-Harzes, zeigt, dass die Oligo-β-1-3-Glukane, aus denen dieses Pulver gebildet ist, tatsächlich 1 bis 50, vorzugsweise 20 bis 30 Saccharid-Einheiten haben.

[0059] Mit den folgenden Chromatographie-Bedingungen (Verfahren bezeichnet als HPLC, d. h. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie):

Säule	Carbopac PA1
Fluss	1 ml/min
Detektion	amperometrisch – Goldelektrode
Injektion	50 µl
Elutionsgradient	Natriumkarbonat 50 mM / Natriumacetat 500 mM – entmineralisiertes Wasser
Analysezeit	15 Minuten
Retentionszeit	= 9 – 10 Minuten

erhält man die Kurve, die in [Fig. 16](#) dargestellt ist und die das Produkt L<sub>11</sub> kennzeichnet.

[0060] Die Untersuchung des <sup>13</sup>C NMR-Spektrums des Produkts L<sub>11</sub>, das auf der Grundlage einer Lösung von 80 mg/ml in D<sub>2</sub>O ausgeführt wird und in [Fig. 1](#) dargestellt ist, zeigt ein Gerüst des β-D-(1→3)-Glukans, dessen Resonanzen der verschiedenen Kohlenstoffe im Vergleich zu den Werten aus der Literatur [vgl. Williams et al., 1992 "Development of a water-soluble, sulfated (1→3)-β-D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*", Carbohydr. Res. 235: 247: 25] identifiziert werden konnten (diese sind nachstehend in Tabelle I zusammengefasst).

TABELLE I

Chemische Verschiebungen (ppm) des NMR-Spektrums des <sup>13</sup> C-Isotops der Probe L <sub>11</sub>		
Kohlenstoffgerüst β-D-(1→3)-Glukan	C1	102,76
	C2	73,41
	C3	84,94
	C4	68,45
	C5	75,89
	C6	61,06
Rest D-Mannitol	C6	63,42

[0061] Die vorstehend bezeichneten erfindungsgemäßen Medikamente umfassen Adjuvantien herkömmlicher Formulierungen, die der für diese gewählten Verabreichungsart und Dosierung entsprechen.

[0062] Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Fehlregulationen der Apoptose, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es in einer galenischen Zusammensetzung mindestens einen der vorstehend identifizierten Wirkstoffe aufweisen muss.

[0063] Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform ist diese galenische Zusammensetzung für eine intravenöse Verabreichung geeignet.

[0064] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Fehlregulationen der Apoptose, von saccharidischen Substanzen der Klasse, umfassend Oligosaccharide, die auf enzymatischem oder chemischem Weg von Polymeren der Klasse abgeleitet sind, die β-1-3-Glukane umfasst, die gegebenenfalls β-1-6-Verzweigungen aufweisen, und Oligosaccharide, die auf enzymatischem oder chemischem Weg von sulfatierten Galaktanen, insbesondere Carrageenanen, Agaren und Porphyranen abgeleitet sind.

[0065] Insbesondere betrifft sie die Verwendung von Oligosacchariden der Formel (I) und denen der Formel

(II) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Fehlregulationen der Apoptose.

**[0066]** Vor allem aber auch betrifft sie die Verwendung der als I<sub>9</sub> und L<sub>11</sub> bezeichneten Produkte und der Fraktionen DP 2 und DP 7 des Produkts I<sub>9</sub> zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Fehlregulationen der Apoptose.

**[0067]** Die Erfindung wird durch die nachstehende zusätzliche Beschreibung und die Beispiele verdeutlicht, die keineswegs einschränkend sind, sondern vorteilhaften Ausführungsformen entsprechen.

**[0068]** Bei den nachstehend beschriebenen Versuchen wurde mit Zellkulturen gearbeitet, in denen ein apoptotischer Prozess durch Einsatz des Fas-Systems oder von Staurosporin ausgelöst wurde; anschließend wurden die Modulationswirkungen untersucht, die mit den Produkten erzielt werden konnten, die den Wirkstoff der erfindungsgemäßen Medikamente bilden.

**[0069]** Im Rahmen dieser Versuche wurden zum einen die Wirkstoffmengen bestimmt, die zur Erzielung der gewünschten Wirkung bei der Modulation der Apoptose geeignet sind, und zum anderen wurde der bzw. wurden die Zeitpunkte bestimmt, zu dem bzw. denen die Verabreichung des Wirkstoffs oder des diesen enthaltenen Medikaments zu erfolgen hat, um die gewünschte Modulationswirkung zu erzielen.

#### BEISPIEL 1

**[0070]** Es wurde eine Kultur von genetisch modifizierten murinen Fibroblasten verwendet, um den Humanrezeptor Fas konstitutiv zu exprimieren; der getestete Wirkstoff war das als I<sub>9</sub> bezeichnete Produkt.

**[0071]** Bei einem vorangehenden Versuch zeigte sich, dass die murinen Fibroblasten durch Apoptose zerstört werden, wenn sie entweder mit dem Fas-Liganden oder einem agonistischen Antikörper, der den Fas-Rezeptor erkennt und nachstehend mit FasAb bezeichnet ist, zusammengebracht werden.

**[0072]** Bei einem anderen vorangehenden Versuch wurde festgestellt, dass das Produkt I<sub>9</sub> das Zellwachstum nicht beeinträchtigt, dass es gegenüber den murinen Fibroblasten in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch ist, und dass es somit einem Zellkulturmedium problemlos hinzugegeben werden kann.

**[0073]** Bei dem für die Kultur der murinen Fibroblasten verwendeten Kulturmedium handelt es sich um das von der Firma Life Technologies unter dem Namen "Dulbecco's Modified Eagle Medium" vertriebene Medium; dieses Kulturmedium ist beschrieben in "Virology" 8, 396 (1959) von Dulbecco et al.

**[0074]** Diesem Kulturmedium wurden 5 Vol.-% eines aus Kälberföten gewonnenen Serums hinzugegeben.

**[0075]** Dieses Medium wurde anschließend mit murinen Fibroblasten in Anwesenheit einer ausreichenden Menge Antibiotika beimpft, um Kontaminationsmöglichkeiten auszuschließen; die Konzentration der Fibroblasten im Kulturmedium lag bei 10<sup>5</sup> Zellen pro ml Kulturmedium.

**[0076]** Die Kultur erfolgte im Inneren eines Brutschanks, in dem die Temperatur bei 37°C gehalten wurde, wobei die im Brutschrank herrschende Atmosphäre 5% CO<sub>2</sub> enthielt.

**[0077]** Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde dem Kulturmedium entweder der Fas-Ligand oder der FasAb direkt hinzugegeben.

**[0078]** Die zugegebene FasAb-Menge betrug 50 µg pro ml Kulturmedium.

**[0079]** Unter diesen Bedingungen werden etwa 70% der Zellen der Kultur nach einer Inkubation von etwa 24 Stunden durch Apoptose zerstört.

**[0080]** Diese Zerstörung wird durch Färbung der überlebenden Zellen mit Kristallviolett sichtbar gemacht.

**[0081]** Anschließend wurde eine gewisse Anzahl von en durchgeführt, die dazu bestimmt waren, die Wirkung des Wirkstoffes aufzuzeigen.

**[0082]** Bei diesen Versuchen wurde zum einen die Konzentration verändert, in der der Wirkstoff dem Kulturmedium zugegeben wurde, und zum anderen wurde der Zeitpunkt verändert, in dem der Wirkstoff diesem Me-

dium zugegeben wurde, um die optimalen Konzentrationen des Wirkstoffs sowie den bzw. die günstigsten Zeitpunkte der Zugabe des Wirkstoffs in Bezug auf die Hinzufügung von FasAb zu ermitteln.

[0083] Die Wirkstoffkonzentrationen variierten von 0,001 bis 2 mg pro ml.

[0084] Untersucht wurde nacheinander die Wirkung, die erzielt wurde, wenn der Wirkstoff zunächst vor, dann gleichzeitig mit und schließlich nach dem FasAb zugegeben wurde.

[0085] In einem ersten Versuch wurde der Wirkstoff 24 Stunden vor dem FasAb hinzugegeben.

[0086] Im Rahmen dieses Versuchs wurde festgestellt, welche Wirkung erzielt wurde, wenn nacheinander 0, dann 5, dann 10, dann 50, dann 100 und schließlich 500 ng FasAb pro ml Kultur und in jedem Fall nacheinander Wirkstoffkonzentrationen von 0,25, dann 0,5 und schließlich 1 mg pro ml Nährkultur verwendet wurden, wobei selbstverständlich auch die Wirkung verzeichnet wurde, die in Abwesenheit des Wirkstoffs, das heißt bei einer Konzentration von 0%, erzielt wurde.

[0087] Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde eine Überlebensanalyse durchgeführt.

[0088] Das Ergebnis dieser Analyse ist in dem Histogramm in [Fig. 2](#) dargestellt.

[0089] Auf der Abszisse dieses Histogramms ist die in ng/ml ausgedrückte Konzentration von FasAb im Kulturmedium und auf der Ordinate die in Prozent wiedergegebene Überlebensrate aufgeführt.

[0090] Für jede FasAb-Konzentration ist die Überlebensrate für jede der vier Wirkstoffkonzentrationen, also 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml, durch vier zur Ordinate parallele Rechtecke dargestellt, wobei die Standardabweichung jedes Mal durch ein Segment über dem jeweiligen Rechteck parallel zur Ordinate gekennzeichnet ist.

[0091] Das 0 mg/ml Wirkstoff entsprechende Rechteck ist jedes Mal ganz links, rechts davon das 0,25 mg/ml Wirkstoff entsprechende, rechts von dem vorangehenden das 0,5 mg/ml entsprechende und so weiter angeordnet.

[0092] Die vier Rechtecke sind jedes Mal durch Kreuzschraffuren, Punktierungen oder spezielle Schraffuren gekennzeichnet.

[0093] Die Untersuchung der auf diese Weise in dem Histogramm in [Fig. 2](#) zusammengefassten Ergebnisse zeigt, dass in Abwesenheit des Wirkstoffs die Überlebensrate mit Zunahme der FasAb-Konzentration abnimmt, und dass diese Überlebensrate durch die Zugabe des Wirkstoffs deutlich verbessert wird.

[0094] In einem zweiten Assay wurde dem Kulturmedium der FasAB und der Wirkstoff gleichzeitig hinzugegeben.

[0095] Bei diesem zweiten Assay wurde festgestellt, welche Wirkung erzielt wurde, wenn nacheinander die gleichen FasAb- und Wirkstoffkonzentrationen wie bei dem ersten Assay verwendet wurden.

[0096] Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde eine Überlebensanalyse durchgeführt.

[0097] Die erzielten Ergebnisse sind in dem Histogramm in [Fig. 3](#) zusammengefasst, das nach den gleichen Prinzipien wie den in [Fig. 2](#) dargelegten aufgebaut ist.

[0098] Die Untersuchung dieser Ergebnisse zeigt, dass sich die Überlebensrate analog zu der im ersten Assay festgestellten entwickelt.

[0099] In einer dritten Assayreihe wurde der Wirkstoff nach FasAb zugegeben, und zwar nacheinander zunächst 1 Stunde nach FasAb,  
dann 3 Stunden nach FasAb und  
schließlich 6 Stunden nach FasAb,  
wobei die FasAb-Konzentration stets von 0 bis 500 ng pro ml Kulturmedium variierte.

[0100] Bei der Zugabe des Wirkstoffs 1 Stunde nach dem FasAb

- sind in dem Histogramm in [Fig. 4](#) die Ergebnisse aufgeführt, die für I<sub>9</sub>-Konzentrationen von 0 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml und schließlich 0,05 mg/ml festgestellt wurden;
- sind in dem Histogramm in [Fig. 5](#) die Ergebnisse aufgeführt, die für I<sub>9</sub>-Konzentrationen von 0 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml und schließlich 0,5 mg/ml festgestellt wurden; und
- sind in dem Histogramm in [Fig. 6](#) die Ergebnisse aufgeführt, die für I<sub>9</sub>-Konzentrationen von 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und schließlich 1 mg/ml festgestellt wurden.

[0101] Die Histogramme der [Fig. 4](#) bis [Fig. 6](#) sind nach den selben Prinzipien wie den in [Fig. 2](#) dargelegten aufgebaut.

[0102] Im Falle der Zugabe des Wirkstoffs 3 Stunden nach der Zugabe von FasAb sind in dem Histogramm in [Fig. 7](#) die Ergebnisse aufgeführt, die für I<sub>9</sub>-Konzentrationen von 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml festgestellt wurden.

[0103] Im Falle der Zugabe des Wirkstoffs 6 Stunden nach Zugabe des FasAb sind in dem Histogramm in [Fig. 8](#) die Ergebnisse aufgeführt, die für I<sub>9</sub>-Konzentrationen von 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml festgestellt wurden.

[0104] Die Histogramme der [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) sind nach den selben Prinzipien wie den in [Fig. 2](#) dargelegten aufgebaut.

[0105] Die Untersuchung aller in den Histogrammen der [Fig. 4](#) bis [Fig. 8](#) aufgeführten Ergebnisse zeigt, dass die Überlebensrate stets zunimmt, wenn die Zugabe des Wirkstoffes nach der Zugabe von FasAb erfolgt. Nimmt die Zeit, die zwischen den aufeinanderfolgenden Zugaben von FasAb und des Wirkstoffs liegt, zu, dann nimmt diese Wirkung jedoch eher immer ab. Sie reagiert im Übrigen auf die Wirkstoffkonzentration, wenn diese unter 0,25 mg/ml liegt. Für Konzentrationen über 0,25 mg/ml sind keine merklichen Verbesserungen zu erzielen.

[0106] Bei dem eben beschriebenen wird die Apoptose durch das FasAb-System induziert.

[0107] Es wurde ein weiteres Assay durchgeführt, indem die Apoptose durch den Kinase-Inhibitor Staurosporin induziert wird.

[0108] Es wird nochmals darauf hingewiesen, dass das Staurosporin bei Dosierungen von 0,5 bis 5 µM im Fall der meisten Zellen einen apoptotischen Tod induziert.

[0109] Bei diesem Versuch erfolgte die Zugabe von Staurosporin und I<sub>9</sub> gleichzeitig.

[0110] Es wurden zwei I<sub>9</sub>-Dosierungen verwendet, nämlich 0,2 mg/ml und 0,5 mg/ml.

[0111] Das Staurosporin wurde in einer Menge von 0,5 µM, dann von 1 µM und schließlich von 1,5 µM eingesetzt.

[0112] Die Überlebensrate der behandelten Zellen wurde in jedem Fall nach einer Inkubation von 18 Stunden ermittelt.

[0113] Die erzielten Ergebnisse sind in dem in [Fig. 9](#) dargestellten Histogramm aufgeführt, das die in % ausgedrückte Überlebensrate in Abhängigkeit von der Staurosporin-Konzentration und für die vorstehend genannten I<sub>9</sub>-Dosierungen zeigt.

[0114] Ein Kontroll-Versuch wurde für eine Staurosporin-Konzentration von 0 µM durchgeführt.

[0115] Die Untersuchung der in dem Histogramm aufgeführten Ergebnisse zeigt, dass die durch das Staurosporin induzierte Apoptose durch den Einsatz von I<sub>9</sub> abgeschwächt wird.

[0116] Aus den beiden beschriebenen Assays ergibt sich, dass durch das erfindungsgemäße Medikament eine signifikante Abschwächung der Apoptose erzielt werden kann, wenn diese durch verschiedene Agenzien induziert wird.

## BEISPIEL 2

[0117] Bei diesem Beispiel handelte es sich bei der untersuchten Zellkultur um eine Kultur aus immortalisierten Humanzellen, die aus T-Lymphozyten (Typ Jurkat) gebildet sind.

[0118] Bei dem verwendeten Kulturmedium handelt es sich um das von der Firma Life Technologies unter dem Namen "RPMI 1640 Medium" verwendete Medium; dieses Kulturmedium ist von Moore et al. in der Publikation "A. M. A." 199, 519 (1967) beschrieben.

[0119] Diesem Kulturmedium werden 10 Vol.-% eines Kälberfötenserums und Antibiotika zum Ausschluss möglicher Kontaminationen hinzugegeben.

[0120] Dieses Kulturmedium wird mit einer Menge von  $10^6$  T-Lymphozyten pro ml Medium beimpft.

[0121] Die Inkubationstemperatur beträgt 37°C und die im Brutschrank herrschende Atmosphäre enthält 5% CO<sub>2</sub>.

[0122] Nach einer Inkubation von 24 Stunden werden der FasAb und der Wirkstoff gleichzeitig hinzugegeben.

[0123] Die beigefügte Menge von FasAb (hergestellt von der Firma Upstate Biotechnology und von der Firma Euromedex unter der Katalognummer 05-201 vertrieben) beträgt 50 ng pro ml Kulturmedium.

[0124] Der Wirkstoff wird nacheinander durch das Produkt I<sub>9</sub> und das Produkt L<sub>11</sub> gebildet.

[0125] Die verwendeten Mengen betragen in jedem Fall 0,5 mg/ml.

[0126] Die Überlebensanalyse wird 18 Stunden nach Beginn des Versuchs durchgeführt.

[0127] Diese Überlebensanalyse besteht darin, ein Kulturvolumen mit  $10^4$  Zellen ein Gerät durchlaufen zu lassen, in der Art durchflusszytometrisch arbeitender Geräte, in diesem Fall ein Gerät, das von der Firma Beckton Dickinson unter dem Namen "FAC Scan cytometer" vertrieben wird.

[0128] Dieses Gerät verwendet eine Sonde, mit der nachwiesen werden kann, ob sich an der Oberfläche der Zellen Phosphatidylserin befindet; das Vorhandensein dieses Produktes zeigt, dass die betreffenden Zellen apoptotisch sind.

[0129] Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den [Fig. 10](#) bis [Fig. 13](#) aufgeführt, in denen jeweils drei Polygone, A, B und C, dargestellt sind, deren Konturen so definiert sind, dass sie für unterschiedliche Zellpopulationen repräsentativ sind. Polygon A umschließt eine Gesamt-Einheit aus lebenden Zellen, Polygon B eine Gesamtheit aus apoptotischen Zellen und Polygon C eine Gesamtheit aus toten Zellen.

[0130] In der nachfolgenden Tabelle II ist der Prozentsatz der lebenden Zellen, der apoptotischen Zellen und der toten Zellen für jede der [Fig. 10](#) bis [Fig. 13](#) aufgeführt, die nachstehend erläutert werden.

TABELLE II

		Lebende Zellen Polygon A	Apoptotische Zellen Polygon B	Tote Zellen Polygon C
Kontrolle	(Fig. 10)	97 %	1 %	1 %
FasAb	(Fig. 11)	77 %	21 %	1 %
FasAb / I <sub>9</sub>	(Fig. 12)	90 %	2 %	6 %
FasAb / L <sub>11</sub>	(Fig. 13)	74 %	13 %	9 %

[0131] [Fig. 10](#) zeigt die Überlebensanalyse, die an einer Probe eines Kulturmediums durchgeführt wurde, dem weder FasAb noch ein Wirkstoff zugegeben wurde; es handelt sich hierbei um eine Kontrolle. In diesem Fall ist zu erkennen, dass es im Wesentlichen nur lebende Zellen gibt, die sich im Polygon A befinden (vgl. Zeile 1, Tabelle II).

[0132] [Fig. 11](#) zeigt die Überlebensanalyse, die an einer Probe eines Kulturmediums durchgeführt wurde, dem nur der FasAb zugegeben wurde. In diesem Fall ist zu erkennen, dass das Polygon B 21% apoptotische Zellen enthält (vgl. Zeile 2, Tabelle II).

[0133] [Fig. 12](#) zeigt eine Überlebensanalyse, die an einer Probe eines Kulturmediums durchgeführt wurde, dem gleichzeitig der FasAb und der Wirkstoff I<sub>9</sub> (0,5 mg/ml) zugegeben wurde. In diesem Fall ist zu erkennen, dass das Polygon B praktisch keine apoptotischen Zellen (2%) enthält, während das Polygon A viele lebende Zellen und das Polygon C eine gewisse Konzentration (6%) toter Zellen enthält (vgl. Zeile 3, Tabelle II).

[0134] [Fig. 13](#) zeigt eine Überlebensanalyse, die an einer Probe eines Kulturmediums durchgeführt wurde, dem gleichzeitig der FasAb und der Wirkstoff L<sub>11</sub> (0,5 mg/ml) zugegeben wurden. In diesem Fall ist zu erkennen, dass das Polygon B eine große Menge (13%) apoptotischer Zellen enthält und das Polygon C eine nicht unbedeutende Menge (9%) toter Zellen (vgl. Zeile 4, Tabelle II).

[0135] Aus den Schlüssen, die bei eingehender Betrachtung der [Fig. 10](#) bis [Fig. 13](#) und aus der Analyse des Prozentsatzes der in den einzelnen Polygonen vorhandenen Zellen gezogen werden können, ergibt sich folglich, dass der Wirkstoff I<sub>9</sub> im Rahmen dieses s die FasAb-Apoptose hemmt (die Zahl der apoptotischen Zellen sinkt von 21% auf 2%). Allerdings ist eine leichte Zunahme der Anzahl toter Zellen festzustellen (Zunahme von 1% auf 6%). Berücksichtigt man die Anzahl lebender Zellen, ist ein Schutz in Höhe von 13% festzustellen (Zunahme von 77% auf 90%).

[0136] Was den Wirkstoff L<sub>11</sub> anbelangt, so ist im Vergleich zu der durch den FasAb alleine hervorgerufenen Wirkung eine Zunahme der Anzahl toter Zellen (Zunahme von 1% auf 9%) zu beobachten. Durch den Wirkstoff L<sub>11</sub> wird demnach eine Zunahme des Zelltods bewirkt, obgleich er auf die Anzahl lebender Zellen keine große Auswirkung hat.

[0137] Zur Optimierung der Wirkung des L<sub>11</sub> wurden die nachfolgenden Assays durchgeführt.

[0138] Bei Verwendung der gleichen Kultur wie vorstehend beschrieben, wurden verabreicht:

- in einem ersten Assay 50 ng/ml FasAb alleine (Herkunft: Euromedex, wie weiter oben bezeichnet),
- in einem Assay Versuch die gleiche Menge FasAb gleichzeitig mit 0,5 mg/ml des Produkts L<sub>11</sub> und
- in einem dritten Assay 0,5 mg/ml des Produkts L<sub>11</sub> und anschließend, 24 Stunden später, 50 ng/ml des gleichen FasAb.

[0139] Im Vergleich zu dem bei einer Kontrolle-Kultur ohne Zugabe von FasAb und L<sub>11</sub> festgestellten Ergebnis wurden nach einer Inkubation von 18 Stunden die folgenden Ergebnisse erzielt, wobei als herangezogene Größe die Anzahl lebender Zellen diente:

- bei Zugabe von FasAb alleine nimmt die Anzahl lebender Zellen um 3,6% ab,
- bei gleichzeitiger Zugabe von FasAb und L<sub>11</sub> nimmt die Anzahl lebender Zellen um 6,4% ab, und
- bei der zeitversetzten Zugabe von FasAb und L<sub>11</sub> nimmt die Anzahl lebender Zellen um 13,7% ab.

[0140] Hieraus folgt, dass L<sub>11</sub> wesentlich wirksamer ist, wenn es vor dem FasAb verabreicht wird.

[0141] Es wird darauf hingewiesen, dass analoge Ergebnisse erzielt wurden, wenn der vorstehend bezeichnete FasAb durch einen FasAb anderer Herkunft ersetzt wurde, der von der Firma Alexis Corporation (San Diego, USA) hergestellt und von der Firma Coger SA (Paris) vertrieben wird.

[0142] Die Untersuchung der Ergebnisse der vorstehend beschriebenen Assays zeigt, dass die Apoptose durch ein Medikament auf der Grundlage des Produkts L<sub>11</sub> verstärkt werden kann; sein Einsatz bei der Behandlung von Autoimmun- oder Krebserkrankungen kann daher in Betracht gezogen werden.

[0143] Bei weiteren Assays konnten die Wirkungen überprüft werden, die durch die Verabreichung des Produkts I<sub>9</sub> zum einen bei Lymphozytenkulturen, bei denen eine Fas-Apoptose geringer Intensität induziert wurde, und zum anderen bei Lymphozytenkulturen, bei denen eine Fas-Apoptose hoher Intensität induziert wurde, hervorgerufen wurden.

[0144] Die Fas-Apoptose geringer Intensität kann durch Verwendung eines FasAb der Firma Euromedex induziert werden; eine derartige Apoptose kann in der Größenordnung von 3 bis 10% liegen.

[0145] Die Fas-Apoptose hoher Intensität kann durch Verwendung eines FasAb der Firma Alexis Corporation

induziert werden; eine derartige Apoptose kann in der Größenordnung von 20 bis 50% liegen.

**[0146]** Die unter Verwendung einer Dosis von 0,2 mg/ml des Produkts I<sub>9</sub> durchgeföhrten Assays sind in [Fig. 14](#) dargestellt, die die festgestellten Wirkungen zeigt, das heißt entweder die Stimulation oder die Inhibition der Apoptose (ausgedrückt in %) in Abhängigkeit von der Intensität (in %) der durch den FasAb alleine induzierten Apoptose (Konzentrationen von 50 bis 200 ng/ml).

**[0147]** [Fig. 14](#) zeigt, dass

- im Falle von Apoptosen mit einer geringen Intensität in der Größenordnung von 3 bis 10%, dargestellt auf der Abszisse mit den Punkten a, b, e, d, e, f, g, h, i, die Verabreichung von I<sub>9</sub> im Vergleich zu der durch den FasAb alleine induzierten Apoptose eine Verstärkung der Apoptose um 20 bis 40% bewirkt, und
- im Falle von Apoptosen mit einer hohen Intensität in der Größenordnung von 20 bis 50%, dargestellt auf der Abszisse mit den Punkten l, m, n, p, q, die Verabreichung von I<sub>9</sub> in der gleichen Menge im Vergleich zu der durch den FasAb alleine induzierten Apoptose eine Inhibition der Apoptose um 5 bis 20% bewirkt.

**[0148]** Da es möglich ist, bei einer gegebenen Person die induzierte Apoptose in Bezug auf die Lymphozyten zu bestimmen, wird es somit möglich, diese je nach festgestellter Intensität der Apoptose hinsichtlich ihrer Verstärkung oder hinsichtlich ihrer Inhibition zu modulieren, indem dieser Person ein Medikament auf der Basis von I<sub>9</sub> verabreicht wird.

**[0149]** Dieses Medikament kann es somit ermöglichen, die Apoptose hinsichtlich ihrer Verstärkung zu regulieren, wenn die Person an einer Krankheit in der Art einer Krebs- oder Autoimmunerkrankung leidet, die einer geringen Apoptose entspricht, oder aber die Apoptose hinsichtlich ihrer Inhibition zu regulieren, wenn die Person an einer Krankheit in der Art eines Immundefekts bzw. einer Immunschwäche leidet, die einer starken Apoptose entspricht.

**[0150]** Da dies so ist, wird darauf hingewiesen, dass es sich bei den T-Lymphozyten vom Typ Jurkat, die in den Kulturen vorhanden waren, die bei den vorstehend beschriebenen Versuchen verwendet wurden, um Zellen handelt, deren Tumorsuppressor-Gen p53 oder Protein p53 (Bing An et al., 1998, "Cell Death and Differentiation" 5, 1062–1075) mutiert und daher inaktiv ist.

**[0151]** Die Wirkungen, die mit den erfindungsgemäß verwendeten Produkten, insbesondere mit I<sub>9</sub> und L<sub>11</sub>, festgestellt wurden, sind somit wahrscheinlich p53-unabhängig; das heißt, die Produkte I<sub>9</sub> und L<sub>11</sub> sind imstande, die Stimulation oder die Inhibition der Apoptose allein durch ihre Anwesenheit und unabhängig von der Anwesenheit oder der Abwesenheit des aktiven p53-Gens zu verstärken.

**[0152]** Bei den meisten menschlichen Krebserkrankungen (vgl. Hollstein et al., 1994, "Nucl. Acid Res.", 22, 3551) ist das Protein p53 jedoch mutiert, also inaktiv; hieraus folgt, dass der Einsatz eines Medikaments auf der Grundlage eines der erfindungsgemäßen Produkte, und insbesondere der Produkte I<sub>9</sub> und L<sub>11</sub>, Funktionsstörungen des Proteins p53 zu beheben und Erkrankungen in der Art von Krebs- und Autoimmunkrankheiten zu behandeln erlaubt.

**[0153]** Die Erfindung erlaubt es folglich, die besagten Erkrankungen auf eine grundlegend andere Weise und wesentlich einfacher zu behandeln als bei der Gentherapie, die insbesondere darauf beruht, ein normales p53-Gen in das Genom der mutierten Zellen der erkrankten Person einzubringen.

**[0154]** Es ist bekannt, dass die meisten Krebszellen ihre Empfindlichkeit gegenüber der FasAb-Apoptose verloren haben und dass die meisten der gegenwärtig verwendeten krebshemmenden Agenzien dadurch wirken, dass das p53-Gen aktiviert wird, das seinerseits positiv auf das FasAb-System wirkt. Oder aber diese Systeme funktionieren nicht mehr, wenn p53 mutiert ist (Müller et al., 1998, J. Exp. Med. 188, 2033–2043).

**[0155]** Den jüngsten Beobachtungen zufolge ist das FasAb-System ausschlaggebend für die Zerstörung der Krebszellen, entweder durch das Immunsystem oder durch die Wirkung krebshemmender Arzneimittel. Hieraus folgt, dass dem Umstand, dass die erfindungsgemäß verwendeten Produkte, insbesondere I<sub>9</sub> und L<sub>11</sub>, die Apoptose dieser Krebszellen unabhängig von p53 modulieren, eine beträchtliche Bedeutung zukommt und dadurch die Entwicklung einer neuen Generation von insbesondere krebshemmenden Medikamenten in Betracht gezogen werden kann.

## BEISPIEL 3

[0156] Wie vorstehend aufgezeigt, setzt sich das Produkt I<sub>9</sub> aus einem Gemisch aus Oligo-Jota-Carrageenani zusammen.

[0157] Es wurde die durch unterschiedliche Komponenten dieses Gemisches, insbesondere der Fraktionen DP 2, DP 3, DP 4, DP 5 und DP 7, induzierte Wirkung getestet.

[0158] Getestet wurde auch das den Grundstoff des I<sub>9</sub> bildende Polymer, sowie das als KIK bezeichnete Produkt (Hexasaccharid vom Typ Kappa-Jota-Kappa).

[0159] Bei diesen Assays wurde wie in Beispiel 1 angegeben verfahren, indem gleichzeitig zum einen 0,2 mg/ml von jeder der I<sub>9</sub>-Fraktionen und zum anderen 100 ng/ml von FasAb der Firma Euromedex eingebracht wurden.

[0160] Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die nachstehend zusammengefassten Feststellungen getroffen.

[0161] Die Fraktionen DP 2, DP 3, DP 4 und DP 5 sind inaktiv und stimulieren die Apoptose nicht, die durch eine geringe Dosis (100 ng/ml) FasAb der Firma Euromedex induziert wird, die selbst nach einer Inkubation von 18 Stunden 6% des Zelltodes auslöst.

[0162] Eine sehr starke stimulierende Wirkung wird dagegen bei der Fraktion DP 7 (50%) und durch das Produkt I<sub>9</sub> (70%) erzielt, was zeigt, dass eine der aktiven Komponenten des I<sub>9</sub>-Gemisches durch die Fraktion DP 7 gebildet sein kann; das Produkt KIK hat im Übrigen keinerlei Aktivität.

[0163] Es wurde schließlich auch festgestellt, dass das Polymer, das den Grundstoff für die Herstellung des I<sub>9</sub> vor Spaltung durch das Jotase-Enzym bildet, seinerseits aktiv ist und eine Fas-Apoptose mit geringer Intensität stimuliert. Das Jotase-Enzym, das in einer Menge von 50 Einheiten (50 U) verwendet wurde, hat hingegen keinerlei Aktivität, wenn es mit den Zellen inkubiert wird.

[0164] Hieraus ergibt sich, dass der Wirkstoff I<sub>9</sub>, der keine inhärente apoptotische Aktivität hat, im Falle einer FasAb-Apoptose mit geringer Intensität eine sehr hohe Stimulation induziert.

## BEISPIEL 4

[0165] Es wurde ein zusätzliches Assay durchgeführt, durch den die in [Fig. 14](#) dargestellten Ergebnisse bestätigt werden.

[0166] Im Fall der durch Fas induzierten apoptotischen Phänomene handelt es sich bei der ersten Caspase der aktivierten Caspasen-Kaskade um die Caspase 8.

[0167] Nach Lyse der Jurkat-Zellen, die mit oder ohne FasAb allein und die mit dem FasAb gleichzeitig mit I<sub>9</sub> behandelt wurden, wurde eine Messung der Aktivität dieser Caspase 8 vorgenommen, die ein proteolytisches Enzym ist.

[0168] Hierzu wurde gemessen

- die Aktivität der Caspase 8 in einer ersten Fraktion einer Kultur von Jurkat-Zellen in Abwesenheit des FasAb und des I<sub>9</sub>; der Prozentsatz der lebenden Zellen in der Kultur liegt bei 93%;
- die Aktivität der Caspase 8 in einer zweiten Fraktion der gleichen Kultur 18 Stunden nach der Inkubation mit 500 ng/ml FasAb der Firma Euromedex (der, wie vorstehend angegeben, eine schwache Apoptose in der Größenordnung von 13% induziert); der Prozentsatz der lebenden Zellen in der Kultur liegt bei 80%;
- die Aktivität der Caspase 8 in einer dritten Fraktion der gleichen Kultur 18 Stunden nach der Inkubation mit 500 ng/ml FasAb der Firma Euromedex und 0,2 mg/ml I<sub>9</sub>; der Prozentsatz der lebenden Zellen in der Kultur liegt bei 50%;
- die Aktivität der Caspase 8 in einer vierten Fraktion der gleichen Kultur 18 Stunden nach der Inkubation mit 25 ng/ml FasAb der Firma Alexis (der, wie vorstehend angegeben, eine starke Apoptose in der Größenordnung von 40% induziert); der Prozentsatz der lebenden Zellen in der Kultur liegt bei 53%;
- die Aktivität der Caspase 8 in einer fünften Fraktion der gleichen Kultur 18 Stunden nach der Inkubation mit 25 ng/ml FasAb der Firma Alexis und 0,2 mg/ml I<sub>9</sub>; der Prozentsatz der lebenden Zellen in der Kultur

liegt bei 59%.

[0169] Die Messung der Caspase-Aktivität erfolgte jedes Mal mit Hilfe des von der Firma Ozyme unter dem Markennamen "Apo Alert Flice Fluor" Nr. K2028-2 vertriebenen Kits.

[0170] Die Ergebnisse dieser Messungen sind in dem Histogramm in [Fig. 15](#) zusammengefasst.

[0171] Die Untersuchung dieses Histogramms zeigt, dass

- die Caspase-8-Aktivität durch den Euromedex-FasAb alleine schwach stimuliert wird (Faktor annähernd 1,37), wobei die gleichzeitige Verabreichung von I<sub>9</sub> eine starke Stimulation bewirkt (Faktor annähernd 3,93);
- die Caspase-8-Aktivität durch den Alexis-FasAb alleine stark stimuliert wird (Faktor annähernd 4,96), wobei diese starke Stimulation verringert wird (Faktor annähernd 4,05), wenn I<sub>9</sub> gleichzeitig mit dem Alexis-FasAb zugegeben wird.

[0172] Es besteht folglich ein klarer Zusammenhang zwischen der Apoptose und der Caspase-8-Aktivität.

[0173] Das Produkt I<sub>9</sub> stellt somit ein Produkt dar, das die Aktivität der Caspase 8 zu modulieren vermag.

[0174] Die Tatsache, dass nachgewiesen wurde, dass dieses Enzym biochemical für die durch Fas induzierte Apoptose äußerst wichtig ist (Juo et al., Curr. Biol. 8, 1001–1008, 1998), erlaubt es, neue Medikamente auf der Basis von Oligosacchariden in Betracht zu ziehen, die es erlauben, auf Enzyme vom Typ Caspase abzuzielen.

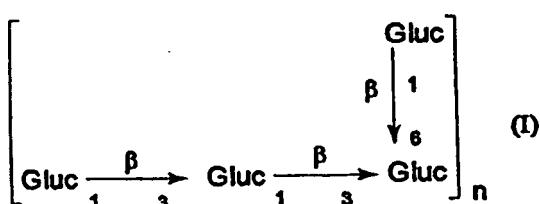
[0175] Diese Produkte stellen somit eine Alternative zu einer Therapie dar, die auf Peptiden basiert, die Träger der durch die Caspase 8 erkannten Sequenz sind ("Selbstmord-Substrate" der Caspase 8).

#### Patentansprüche

1. Medikament, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine wirksame Menge von mindestens einer oligosaccharidischen Substanz, die dazu geeignet ist, Unregelmäßigkeiten der Apoptose zu modulieren, aufweist und gegebenenfalls, auf mindestens einigen ihrer Einheitsmotive, mindestens einen Substituenten der Klasse, umfassend die Gruppen Sulfat, Methyl und Acetyl, aufweist, wobei die Substanz ausgewählt ist aus der Klasse, umfassend

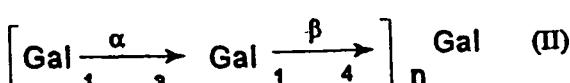
- Oligosaccharide, auf enzymatischem oder chemischem Weg abgeleitet von Polymeren der Klasse, umfassend  $\beta$  1-3 Glukane, gegebenenfalls enthaltend  $\beta$  1-6 Verzweigungen, und
- Oligosaccharide, auf enzymatischem oder chemischem Weg abgeleitet von Carrageenanen, Agaren und Porphyranen.

2. Medikament, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine wirksame Menge von mindestens einem Oligosaccharid aufweist, das dazu geeignet ist, Unregelmäßigkeiten der Apoptose zu modulieren und der Formel



entspricht, in welcher n eine ganze Zahl von 1 bis 50 darstellt, vorzugsweise von 5 bis 10, und in welcher die Zahl der Abzweigungen von 0 bis 3 pro Repetitereinheit variiert.

3. Medikament, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine wirksame Menge von mindestens einem Repetier-Disaccharid aufweist, das dazu geeignet ist, Unregelmäßigkeiten der Apoptose zu modulieren, und der Formel



entspricht, in welcher n eine ganze Zahl von 1 bis 50 darstellt, vorzugsweise von 1 bis 20, wobei mindestens einige der Repetier-Disaccharide der Formel (II) eine oder mehrere Sulfatgruppe(n) aufweisen können.

4. Medikament, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine wirksame Menge des Produkts aufweist, das dazu geeignet ist, die Apoptose mindestens teilweise zu inhibieren, und das erhalten wird durch Hydrolyse von Natrium-Jota-Carrageenat („iota-carraghénate de sodium“), wobei das Produkt durch ein Gemisch aus Oligo-Jota-Carrageenanen, bezeichnet als I<sub>9</sub>, gebildet wird, deren Gesamtgehalt an Monosacchariden (bestimmt nach Tillmans und Philippi) 62% beträgt, und deren Größenverteilungsprofil, bestimmt mittels Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Zablakis und Perez, ist:

Jota-Neocarratetraose (DP 2)	8–12%
Jota-Neocarrahexaose (DP 3)	23–27%
Jota-Neocaraoctaose (DP 4)	18–22%
Jota-Neocarradecaose (DP 5)	13–17%
Jota-Neocarradodecaose (DP 6)	8–12%
Oligo-Jota-Carrageenan (DP 7)	3–7%
Oligo-Jota-Carrageenanen, gebildet aus 8 bis 15 Re-petier-Disacchariden (DP 8–15)	13–17%.

5. Medikament, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine wirksame Menge des Produkts aufweist, das dazu geeignet ist, Unregelmäßigkeiten der Apoptose bzw. die Apoptose zu aktivieren, und das erhalten wird durch wässriger-sauere Extraktion aus Braunalgen, insbesondere aus einer Braunalge, die als *Laminaria digitata* bezeichnet wird, wobei das Produkt durch ein Gemisch aus Oligo  $\beta$  1-3 Glukanen, bezeichnet als L<sub>11</sub>, gebildet wird und von 1 bis 50, vorzugsweise von 20 bis 30 Saccharideinheiten aufweist, wobei das besagte Produkt das NMR-Spektrum präsentiert, das in der [Fig. 1](#) gezeigt ist.

6. Medikament, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff eine wirksame Menge des Produkts aufweist, das dazu geeignet ist, Unregelmäßigkeiten der Apoptose zu aktivieren, und aus der Fraktion DP 7 des Produkts I<sub>9</sub> nach Anspruch 4 gebildet wird.

7. Verfahren zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Unregelmäßigkeiten der Apoptose, dadurch gekennzeichnet, dass es in einer galenischen Zusammensetzung mindestens einen der Wirkstoffe der Medikamente nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6 aufweisen muss.

8. Verwendung zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Unregelmäßigkeiten der Apoptose von mindestens einer der oligosaccharidischen Substanzen, die gegebenenfalls auf mindestens einigen ihrer Einheitsmotive, mindestens einen Substituenten der Klasse, umfassend die Gruppen Sulfat, Methyl und Acetyl, aufweisen, wobei diese Substanzen geeignet sind, Unregelmäßigkeiten der Apoptose zu modulieren, und wobei sie ausgewählt sind aus der Klasse, umfassend

- Oligosaccharide, auf enzymatischem oder chemischem Weg abgeleitet von Polymeren der Klasse, umfassend  $\beta$  1-3 Glukane, gegebenenfalls aufweisend  $\beta$  1-6 Verzweigungen, und
- Oligosaccharide, auf enzymatischem oder chemischem Weg abgeleitet von Carrageenanen, Agaren und von Porphyranen.

9. Verwendung, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Unregelmäßigkeiten der Apoptose, von Oligosacchariden der Formel (I) und denen der Formel (II).

10. Verwendung von Produkten, bezeichnet als I<sub>9</sub> und L<sub>11</sub>, und des Produkts, das die Fraktion DP 7 des Produkts I<sub>9</sub> nach Anspruch 4 bildet, zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Unregelmäßigkeiten der Apoptose.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

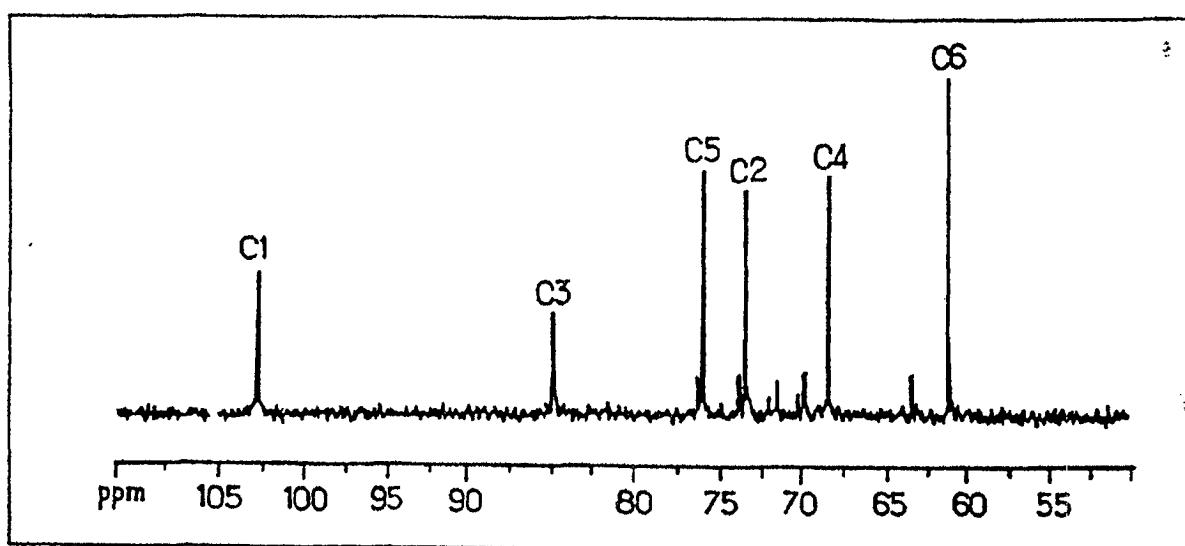
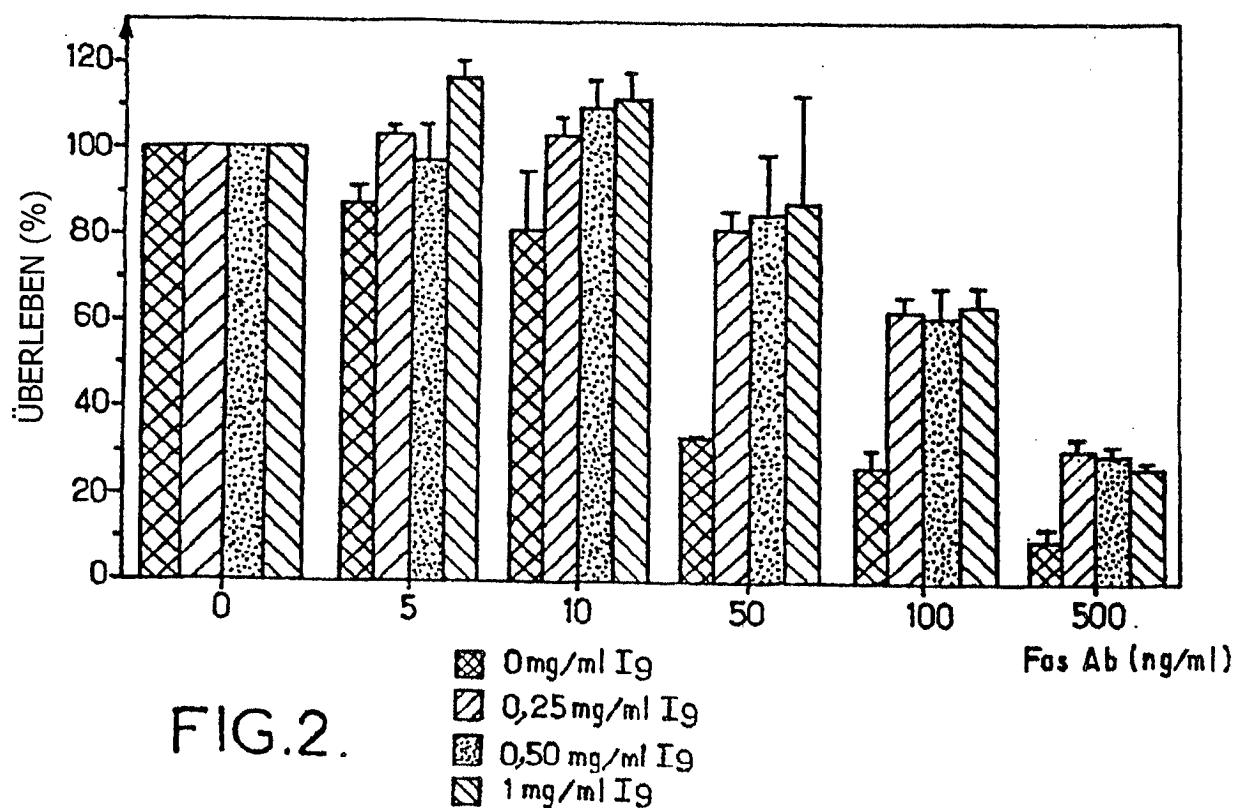


FIG.1.



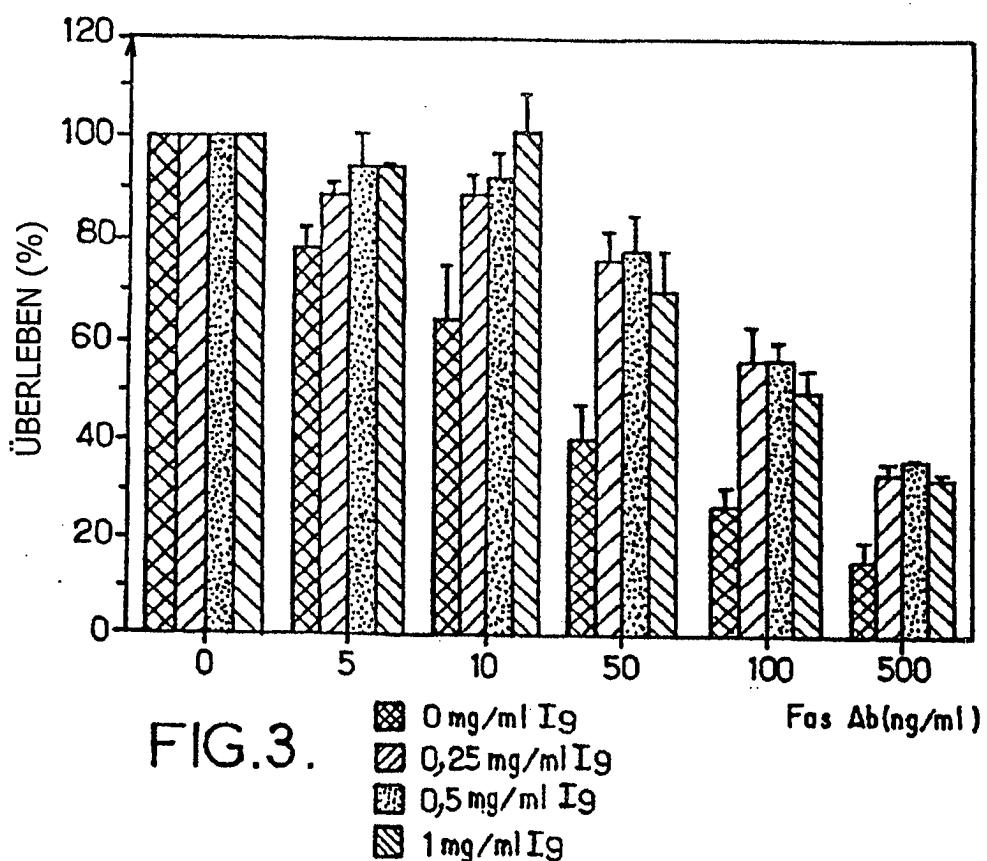


FIG.3.

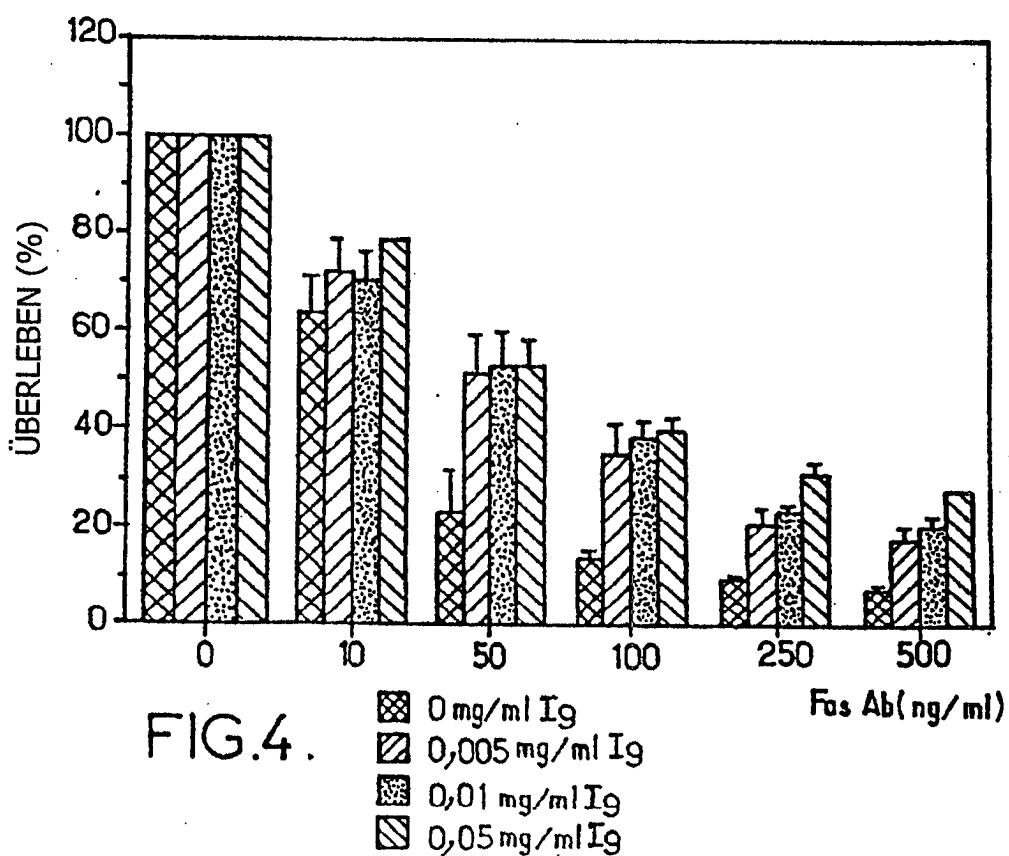


FIG.4.

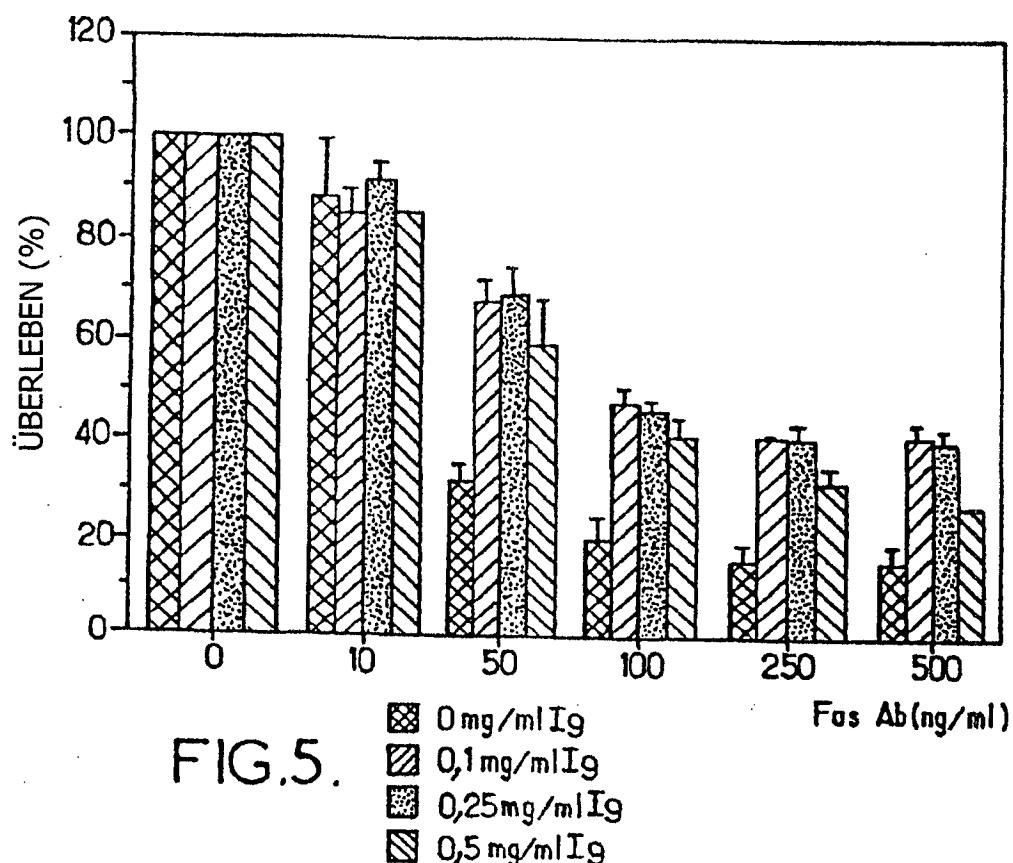


FIG.5.

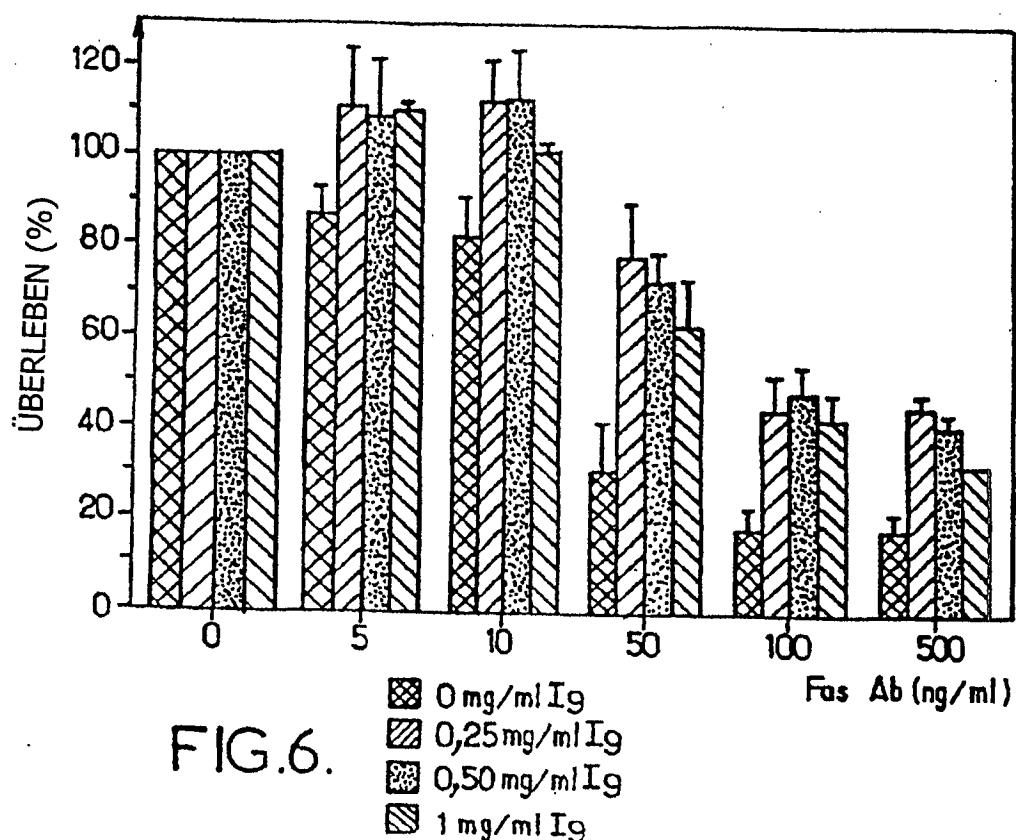


FIG.6.

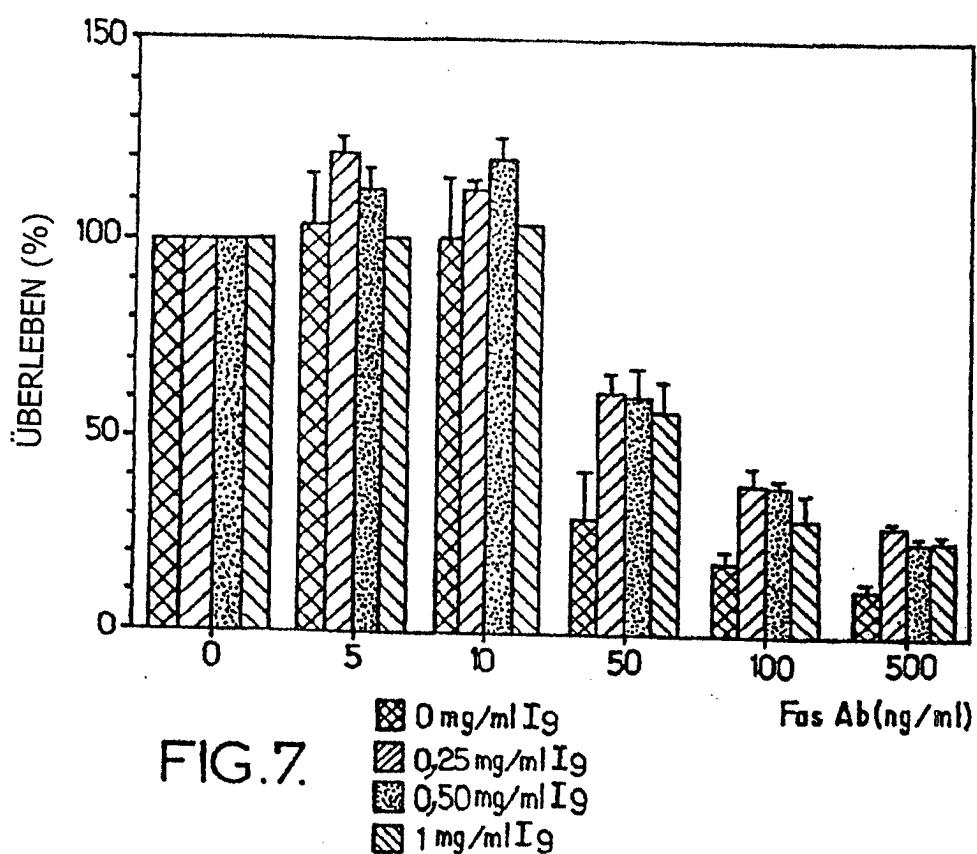


FIG. 7.

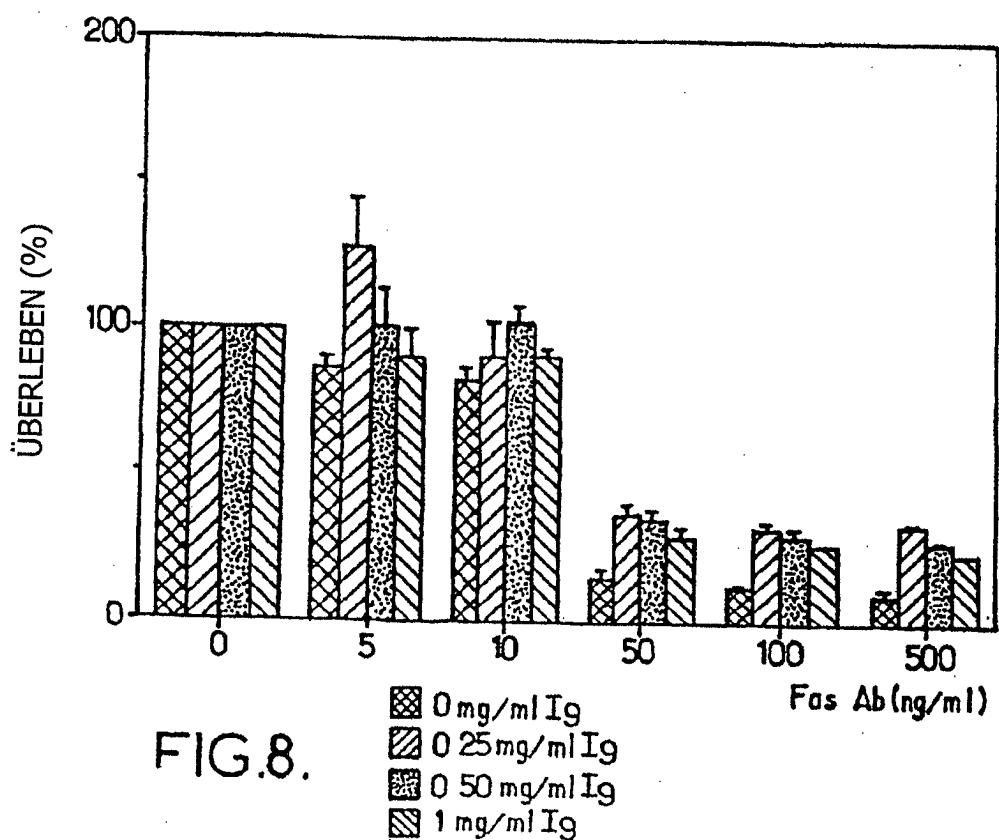


FIG. 8.

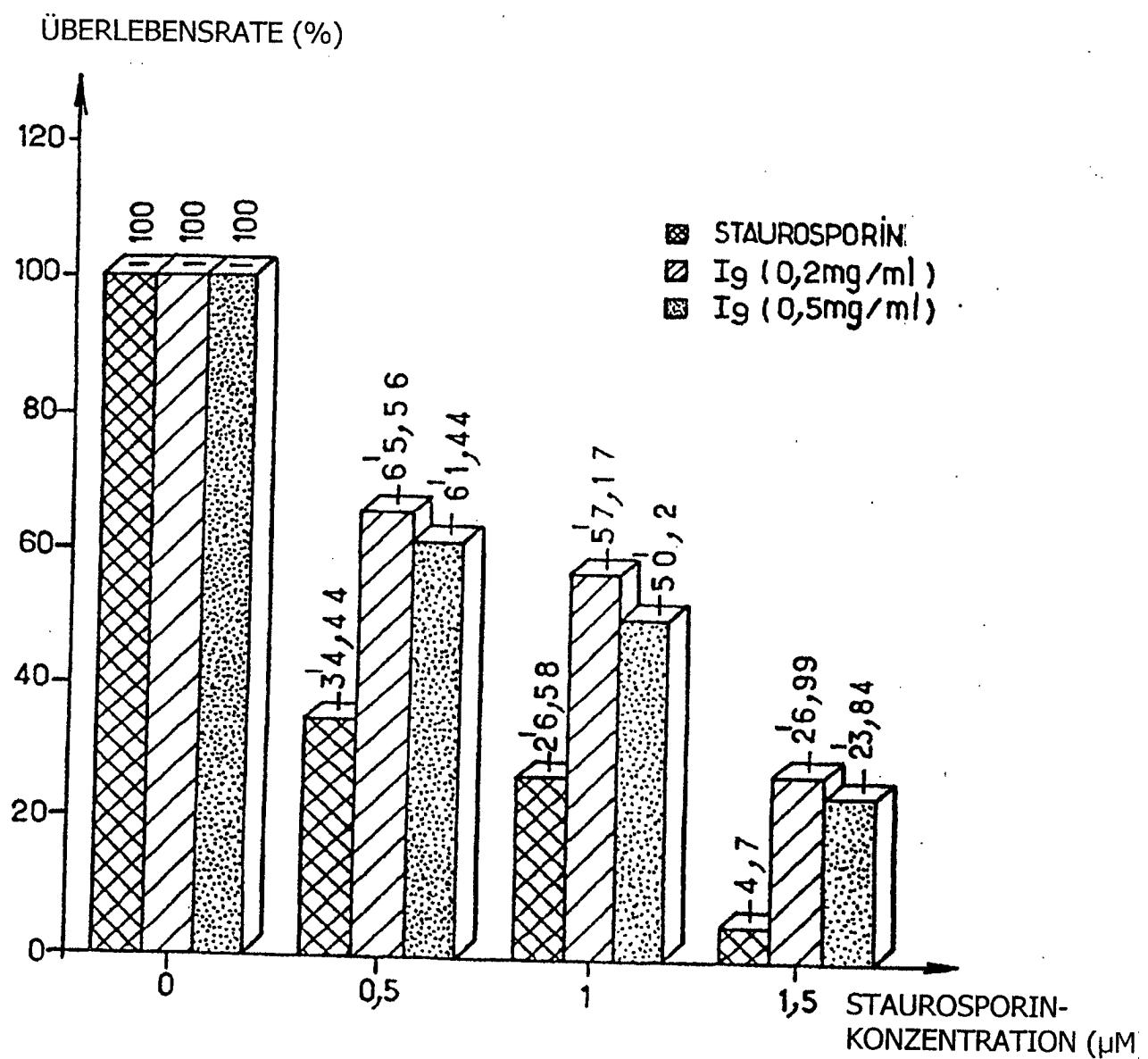


FIG.9

FIG.10.

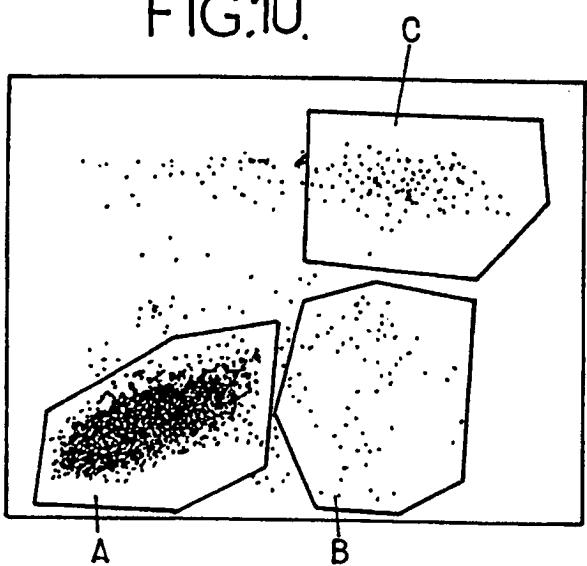


FIG.11.

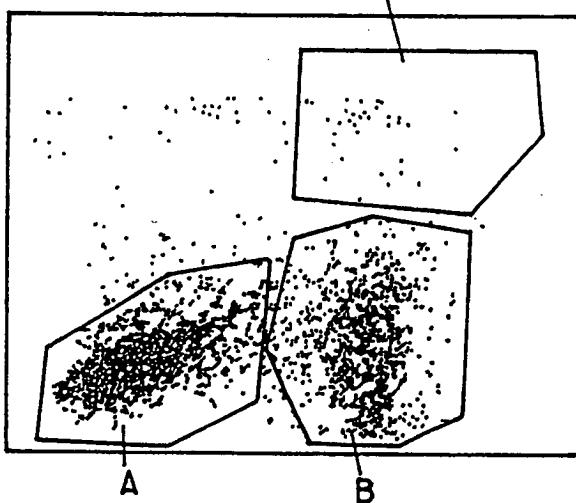


FIG.12.

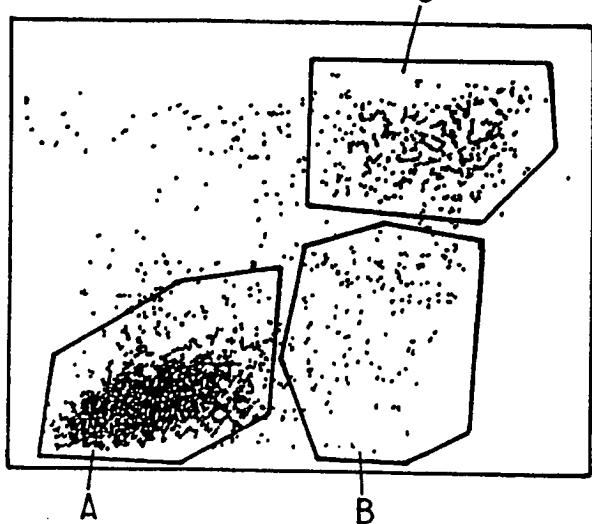
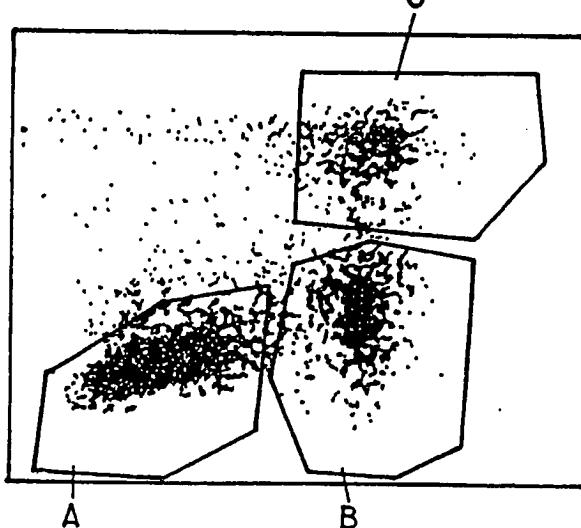


FIG.13.



STIMULATION (%) FÜR  $I_9 + \text{Fas Ab}$

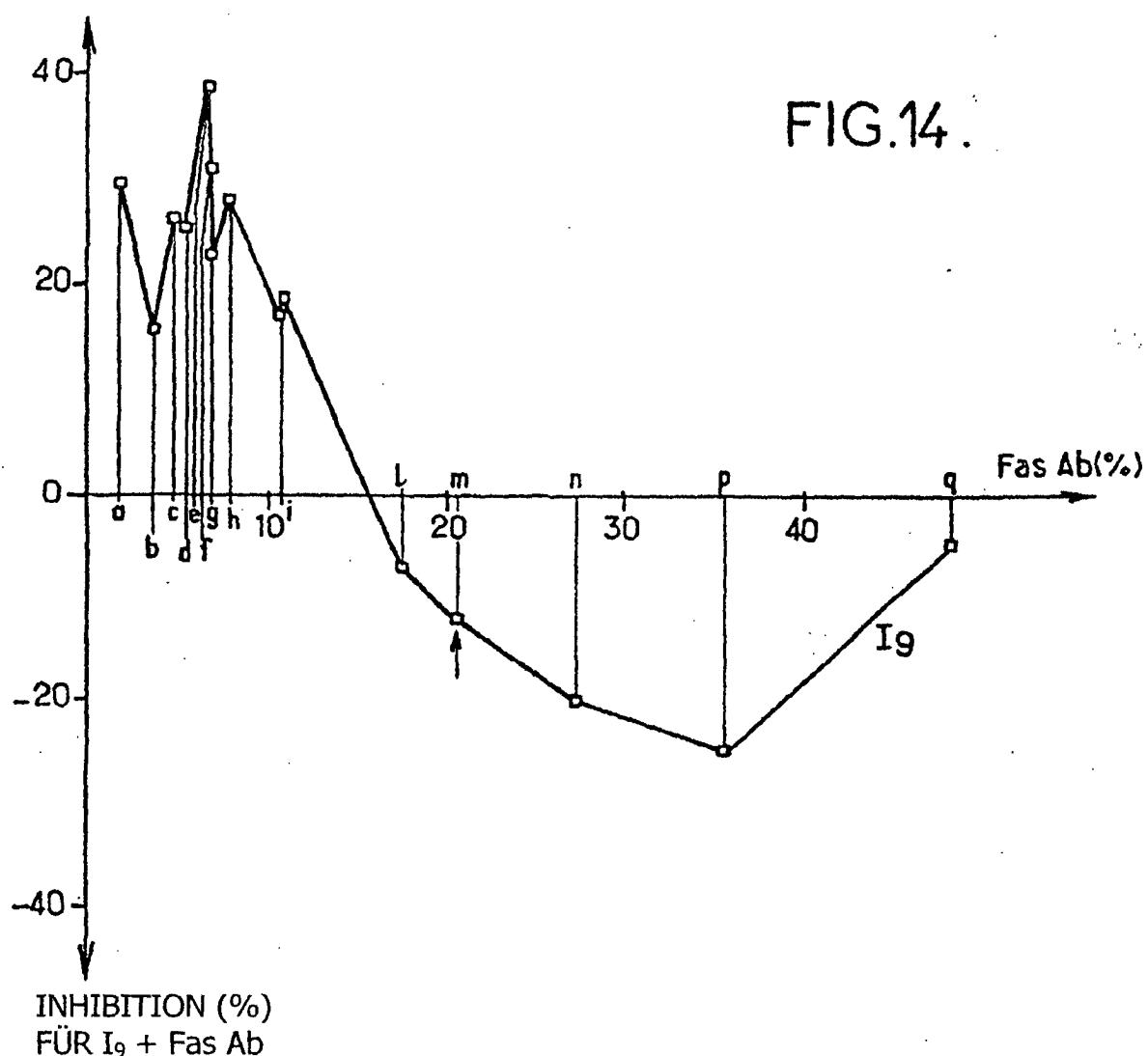
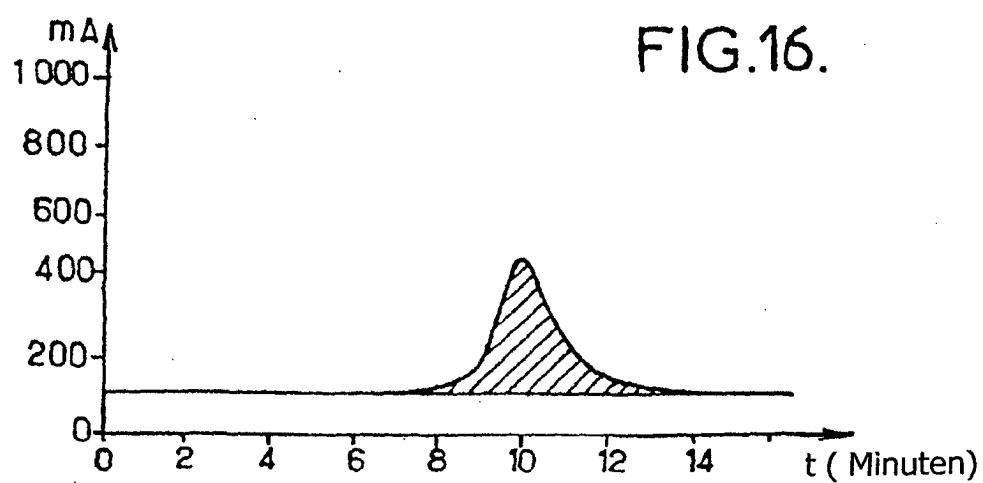


FIG.14.

INHIBITION (%)  
FÜR  $I_9 + \text{Fas Ab}$

FIG.16.



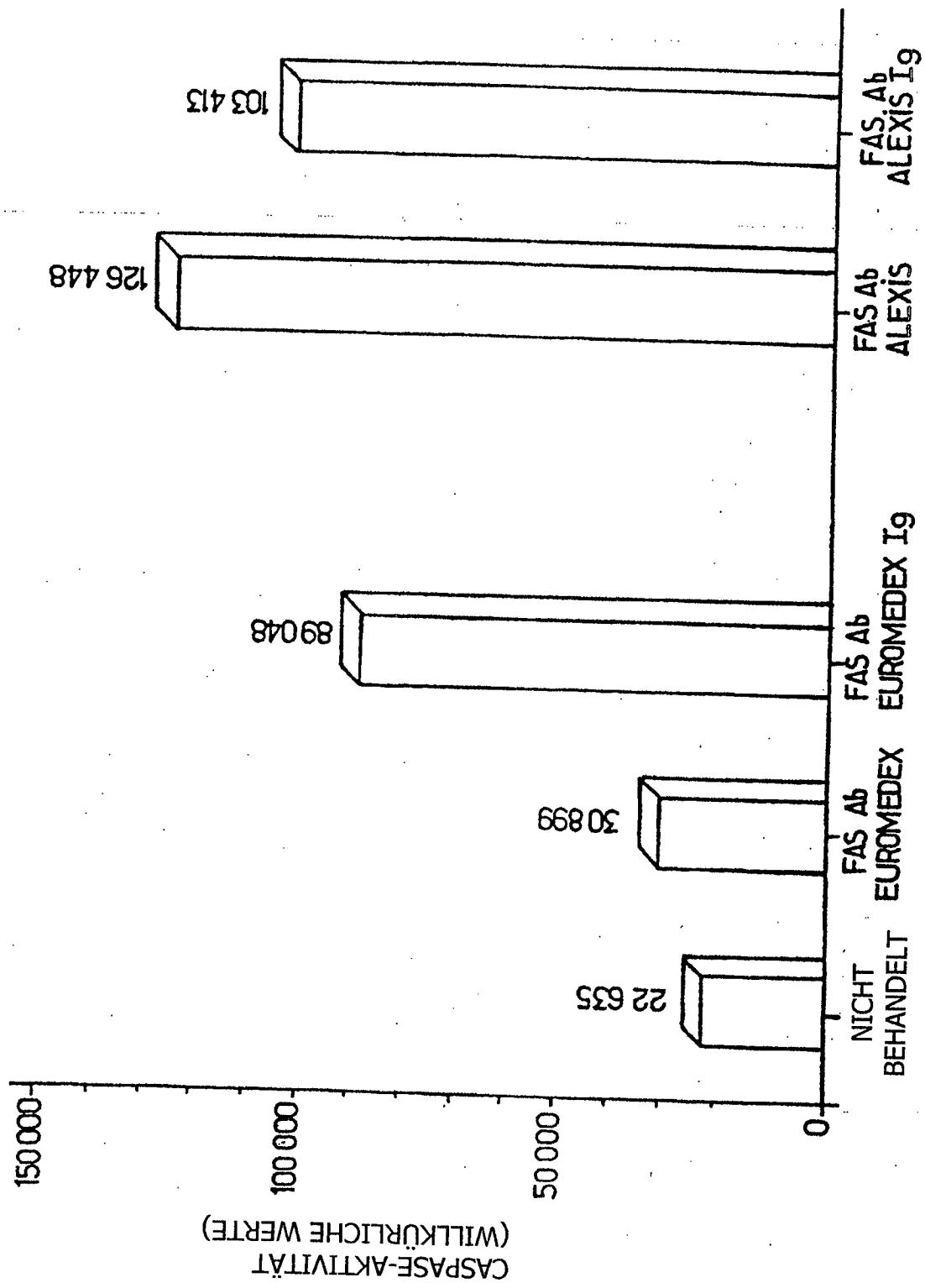


FIG. 15.