



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 31 029 T2** 2006.11.23

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 053 313 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 31 029.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA99/00092**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 903 559.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/040186**

(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: **26.04.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/11 (2006.01)**

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

18034 03.02.1998 US

(73) Patentinhaber:

Methylgene, Inc., Saint-Laurent, Quebec, CA

(74) Vertreter:

Patentanwälte Dr. Solf & Zapf, 81543 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MacLEOD, A., Robert, Westmount, Quebec H3Z
2E8, CA**

(54) Bezeichnung: **OPTIMIERTE ANTISENSE OLIGONUKLEOTIDE KOMPLEMENTÄR ZU DNA-METHYLTRANSFERASE SEQUENZEN**

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 eingelegt, 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

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Genexpressionsmodulation. Insbesondere betrifft die Erfindung eine Genexpressionsmodulation einer das Gen codierenden DNS-Methyltransferase, und die Genexpressionsmodulation, die durch die Enzym-DNS-Methyltransferase reguliert wird.

Zusammenfassung des Standes der Technik

[0002] Die Genexpressionsmodulation ist ein zunehmend an Bedeutung gewinnender Ansatz geworden, verschiedene Zellprozesse sowie die ihnen zugrunde liegenden biochemischen Abläufe zu verstehen. Dieses Verständnis bereichert die Wissenschaft und trägt dazu bei, neue Entdeckungen zu machen, wie Abweichungen in derartigen Abläufen zu ernsthaften Krankheitszuständen führen können. Letztendlich können diese Entdeckungen zur Entwicklung wirksamer therapeutischer Behandlungen für diese Erkrankungen führen.

[0003] Eine Art von besonders interessantem Zellprozess ist, wie die Zelle die Expression ihrer Gene reguliert. Eine abweichende Genexpression scheint verantwortlich zu sein für eine große Vielfalt von erbten genetischen Störungen, und sie hat außerdem in zahlreichen Krebsarten und anderen Krankheiten Implikation gefunden. Eine Regulierung der Genexpression stellt einen komplexen Prozess dar und zahlreiche Aspekte dieses Prozesses werden nach wie vor nicht verstanden. Eines der Mysterien dieses Prozesses besteht in der Tatsache, dass, während die genetische Information in sämtlichen Geweben dieselbe ist, die einen Mehrzellenorganismus bilden, die Expression von Funktionen, die durch das Genom codiert ist, in unterschiedlichen Geweben stark variiert.

[0004] In einigen Fällen ist es bekannt, dass gewebespezifische Transkriptionsfaktoren in diesem Phänomen eine Rolle spielen (Siehe Maniatis et al., *Science* 236: 1237 – 1245 (1987); Ingarham et al., *Annual Review of Physiology* 52: 772 – 791 (1990)). Es existieren jedoch mehrere wichtige Fälle, die durch die Wirkung von Transkriptionsfaktoren alleine nicht so ohne weiteres erklärbar sind. Beispielsweise lehrt Midgeon, *Trends Genet.* 10: 230 – 235 (1994), dass eine X-Inaktivierung die Inaktivierung eines Allels eines Gens mit sich bringt, das auf dem interaktiven X-Chromosom vorhanden ist, während das Allel alleine auf dem aktiven X-Chromosom weiterhin ausgedrückt bleibt. Peterson und Sapienza, *Annu. Rev. Genet.* 27: 7 – 31 (1993), beschreiben außerdem einen "elterlichen Stempel" ("Parental Imprinting"), demnach ein Allel eines Gens, das von einem Elternteil ererbt ist, aktiv ist, während das andere Allel, das von dem anderen Elternteil ererbt ist, inaktiv ist. In beiden dieser Fälle existieren beide Allele in einer Umgebung, die dieselben Transkriptionsfaktoren enthält, wobei jedoch ein Allel ausgedrückt ist, während das andere still ist. Es müssen deshalb andere Faktoren als Transkriptionsfaktoren in diese Phänomene einbezogen sein.

[0005] Forscher haben außerdem untersucht, welcher Typ von "epigenetischer Information" in diese zusätzliche Steuerung des Expressionsmuster des Genoms einbezogen ist. Holliday, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 326: 329 – 338 (1990) diskutiert die mögliche Rolle für eine DNS-Methylierung in einem derartigen epigenetischen Erbe. DNS enthält einen Satz von Modifikationen, der in der genetischen Sequenz nicht codiert ist, sondern der DNS unter Verwendung einer unterschiedlichen enzymatischen Maschinerie kovalent letztlich zugefügt ist. Diese Modifikationen nehmen die Form einer Methylierung in der 5-Position von Zytosinbasen in CpG-Dinukleotiden ein. Zahlreiche Untersuchungen sind vorgeschlagen worden, demnach diese Methylierung sehr wohl bei der Regulierung der Genexpression einbezogen sein kann, während ihre präzise Rolle schwer bestimmbar geblieben ist. Beispielsweise werfen Lock et al., *Cell* 48: 39 – 46 (1987) Fragen auf, ob das Timing der Hypermethylierung und X-Inaktivierung konsistent ist mit einer verursachenden Rolle für Methylierung. In ähnlicher Weise offenbaren Bartolomei et al., *EMBO J.* 12: 3669 – 3677 (1993), Timing-/Ursachenfragen für die Rolle der Methylierung beim elterlichen Aufdrücken.

[0006] Einige dieser Nachteile existierender Studien bezüglich der Rolle der DNS-Methylierung in der Genexpression beruhen in den Werkzeugen, die aktuell zum Durchführen der Untersuchungen zur Verfügung stehen. Zahlreiche Untersuchungen haben 5-azaC verwendet, um DNS-Methylierung zu unterbinden. 5-azaC ist jedoch ein Nukleosidanalogue, das mehrfache Auswirkungen auf Zellmechanismen anderer Art als DNS-Methylierung aufweist, wodurch es schwierig ist, Daten zu interpretieren, die aus diesen Untersuchungen erhalten werden. In ähnlicher Weise bildet 5-azadC einen Mechanismus auf Grundlage eines Hemmstoffs bei der Integration in DNS; dieses kann jedoch ein Einfangen von DNS-Methyltransferase- (nachfolgend als DNS-MeTase bezeichnet)

net) Molekülen auf der DNS hervorrufen, woraus Intoxizitäten resultieren können, die eine Dateninterpretation schwierig machen.

[0007] Vor kurzem haben Szyf et al., J. Biol. Chem. 267: 12831 – 12836 (1995), einen Ansatz offenbart, der vielversprechend ist unter Verwendung der Expression von Antisense-RNS komplementär zu dem DNS-MeTase-Gen zur Untersuchung der Auswirkung von Methylation auf Krebszellen. Szyf und von Hofe, US-Patent Nr. 5578716, und Ramchandani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 684 – 689 (1997), offenbarten die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden komplementär zu dem DNS-MeTase-Gen zum Hemmen von Tumorerzeugung. Diese Entwicklungen haben wirksame neue Werkzeuge zum Sondieren der Rolle der Methylation in zahlreichen Zellprozessen bereitgestellt. Außerdem haben sie vielversprechende neue Ansätze zur Entwicklung therapeutischer Verbindungen mit sich gebracht, die geeignet sind, DNS-Methylation zu modulieren. Die Verheißung dieser Ansätze unterstreicht die Wichtigkeit der Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden komplementär zu DNS-Methyltransferase-Sequenzen, die optimale Aktivität zum Hemmen der DNS-Methyltransferasegenexpression aufweisen. Es besteht deshalb ein Bedarf an derartigen optimierten Antisense-Oligonukleotiden.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt Antisense-Oligonukleotide komplementär zu DNS-Methyltransferase-Sequenzen bereit, die optimale Aktivität zum Hemmen der DNS-Methyltransferasegenexpression besitzen. In bestimmten Ausführungsformen sind die optimierten Antisense-Oligonukleotide dadurch gekennzeichnet, dass sie Nukleinsäuresequenzen besitzen, die eine überraschend hohe Wirksamkeit aufweisen. In einigen dieser Ausführungsformen sind die optimierten Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung außerdem dadurch gekennzeichnet, dass sie unterschiedliche chemische Modifikationen aufweisen, die ihre Wirksamkeit zusätzlich erhöhen. Schließlich stellt die Erfindung Verfahren zum Verwenden dieser Antisense-Oligonukleotide als analytische und diagnostische Werkzeuge bereit, wie etwa Potentioren von transgenetischen Anlagen und Tierstudien und für Gentherapieansätze sowie für potenzielle therapeutische Mittel.

[0009] In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung neuartige optimierte Antisense-Oligonukleotide bereit, die die Genexpression von DNS-MeTase bei Pegeln geringerer Konzentration von Oligonukleotid hemmen als bislang bekannte Oligonukleotide. Diese Antisense-Oligonukleotide sind komplementär zu Nukleinsäuresequenzen von RNS oder doppelsträngiger DNS, die DNS-MeTase codiert. Bevorzugt enthalten diese Antisense-Oligonukleotide eine oder mehrere modifizierte Internukleosidverknüpfungen und sie können optional entweder Desoxyribonukleoside, Ribonukleoside oder 2'-O-substituierte Ribonukleoside oder eine beliebige Kombination hieraus enthalten. Besonders bevorzugte Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung enthalten schimäre Oligonukleotide und hybride Oligonukleotide.

[0010] In einem zweiten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Untersuchen der Rolle von DNS-MeTase im Zellwachstum bereit, einschließlich dem Wachstum von Tumorzellen. In dem Verfahren in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung wird der interessierende Zelltyp in Kontakt gebracht mit einem Antisense-Oligonukleotid in Übereinstimmung mit der Erfindung, was zu einem Hemmen der Explosion von DNS-MeTase in der Zelle führt. Die Antisense-Oligonukleotide können an unterschiedlichen Punkten in dem Zellzyklus verabreicht werden oder im Zusammenhang mit Förderstoffen oder Hemmstoffen für das Zellwachstum zum Ermitteln der Rolle von DNS-MeTase beim Wachstum des interessierenden Zelltyps.

[0011] In einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zum Hemmen des Tumorwachstums bereit, aufweisend das Verabreichen an ein Säugetier, einschließlich eines Menschen, von Antisense-Oligonukleotiden in Übereinstimmung mit der Erfindung. In dem Verfahren in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung wird eine therapeutisch wirksame Menge an Antisense-Oligonukleotid in Übereinstimmung mit der Erfindung für eine therapeutisch wirksame Zeitdauer einem Säugetier verabreicht, einschließlich einem Menschen, das bzw. der in seinem Körper Tumorzellen zeigt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0012] [Fig. 1](#) zeigt die optimale Ziel-DNS-MeTasenukleotidsequenz für bestimmte bevorzugte Oligonukleotide komplementär zu DNS-MeTase-RNS, die in den Sequenzlisten angeführt sind als SEQ ID Nr. 1, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6 und SEQ ID Nr. 7.

[0013] [Fig. 2](#) zeigt die Nukleotidsequenz von bestimmten bevorzugten Oligonukleotiden komplementär zu DNS-MeTase-RNS, die in den Sequenzlisten aufgeführt sind als SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9, SEQ ID Nr. 10,

SEQ ID Nr. 11, SEQ ID Nr. 12, SEQ ID Nr. 13, SEQ ID Nr. 14, SEQ ID Nr. 15, SEQ ID Nr. 16, SEQ ID Nr. 17, SEQ ID Nr. 18, SEQ ID Nr. 19 und SEQ ID Nr. 20.

[0014] Fig. 3 zeigt IC_{50} -Werte für verschiedene bevorzugte Antisense-Oligonukleotide komplementär zu DNS-MeTase-mRNS, gemessen durch Reduktion von DNS-MeTase-mRNS-Pegeln in menschlichen A549-Lungenkrebszellen in vitro.

[0015] Fig. 4 zeigt die Pegel von DNS-MeTase-mRNS in menschlichen MDS-231-Brustkarzinomzellen, die behandelt sind mit den optimierten Antisense-Oligonukleotiden gemäß der Erfindung (-|) im Vergleich zu bislang bekannten Oligonukleotiden (-|-).

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0016] Die Erfindung betrifft die Modulation von Genexpression. Insbesondere betrifft die Erfindung die Modulation von Genexpression der Gen-codierenden DNS-Methyltransferase (DNS-MeTase), und die Modulation der Genexpression, die durch die Enzym-DNS-MeTase reguliert wird. Die Patente und Veröffentlichungen, die in dieser Anmeldung identifiziert sind, sind dem Fachmann auf diesem Gebiet der Technik geläufig und werden deshalb insgesamt unter Bezugnahme in diese Anmeldung integriert.

[0017] Die Erfindung stellt Antisense-Oligonukleotide komplementär zu optimalen Ziel-DNS-MeTase-Sequenzen bereit, die optimale Aktivität zum Hemmen der DNS-Methyltransferase-Genexpression haben. In bestimmten Ausführungsformen sind die optimierten Antisense-Oligonukleotide dadurch gekennzeichnet, dass sie Nukleinsäuresequenzen aufweisen, die überraschend hohe Wirksamkeit bereitstellen. In einigen dieser Ausführungsformen sind die optimierten Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung außerdem dadurch gekennzeichnet, dass sie bestimmte chemische Modifikationen aufweisen, die ihre Wirksamkeit zusätzlich verbessern. Schließlich stellt die Erfindung Verfahren zur Verwendung dieser Antisense-Oligonukleotide als analytische und diagnostische Werkzeuge bereit, als Potenziatoren für Transgenanlagen und Tierstudien und für Gentherapieansätze, und als potentielle therapeutische Mittel.

[0018] Gemäß einem ersten Aspekt stellt die Erfindung optimale Ziel-DNS-MeTase-Nukleotid-Sequenzen bereit, die als bevorzugte Ziele für die Hybridisierung von optimierten Antisense-Oligonukleotiden bevorzugt verwendet werden. Eine zwischenmolekulare Basenpaarung spielt eine wichtige Rolle beim Sequestrieren von Sequenzen unter Verhinderung der zwischenmolekularen Paarung, die für Antisense-Aktivität essentiell ist. Es wird davon ausgegangen, dass eine Duplexbildung zwischen Antisense-Oligonukleotiden und Zielsequenzen beschränkt ist auf diejenigen Bereiche, die eine zugängliche Teilstruktur bereitstellen, die als Ort für die Nukleation geeignet ist und deshalb ungepaarte Basen aufweist. Die Duplexbildung schreitet ausgehend vom Nukleationsort durch einen "Zippering"-Prozess fort und stoppt, wenn dieser Prozess eine Energiebarriere erreicht. Diese Barrieren können beispielsweise die Enden von Stielen oder scharfen Kehren in der gefalteten RNS umfassen. Die Suszeptibilität einer Zielsequenz in Bezug auf eine Antisense-Interaktion variiert deshalb stark von einem Teil der Sequenz zu einem anderen und steht direkt in Beziehung zu einem speziellen Sequenzpotenzial zum Einbau bzw. Zusammenbau in ein Heteroduplex.

[0019] Ohne eine Bindung an eine bestimmte Theorie anzustreben, geht der Erfinder davon aus, dass diese Bemühungen zur Identifizierung von DNS-MeTase-Sequenzen führen, die für eine Duplexbildung offen sind.

[0020] Beispiele optimaler Ziel-DNS-MeTase-Nukleotid-Sequenzen, die als bevorzugtes Ziel für die Hybridisierung von optimierten Antisense-Oligonukleotiden verwendet werden, sind unten gezeigt. Zusätzliche optimale Ziel-DNS-MeTase-Nukleotid-Sequenzen besitzen Sequenzen, die zumindest ein Nukleotid enthalten, das mit den nachfolgend gezeigten Zielsequenzen überlappt.

5' AUCCGAGGAGGGCUACCUGG 3' [SEQ ID Nr. 1]

5' GGAGAACGGUGCUCAUGCUU 3' [SEQ ID Nr. 2]

5' GUGGCCUUGGCUGACAUGAA 3' [SEQ ID Nr. 3]

5' AAGCUGUUGUGUGAGGUUCG 3' [SEQ ID Nr. 4]

5' UUGUGUGAGGUUCGCUUAUC 3' [SEQ ID Nr. 5]

5' CAUGGUGUUUGUGGCCUUGG 3' [SEQ ID Nr. 6]

5' UAGAGUGGGAAUGGCAGAUG 3' [SEQ ID Nr. 7]

[0021] Der erste Aspekte der Erfindung stellt außerdem neuartige optimierte Antisense-Oligonukleotide bereit, die die Genexpression von DNS-MeTase hemmen. Diese Antisense-Oligonukleotide sind komplementär zu optimalen Ziel-Nukleinsäuresequenzen von RNS oder doppelsträngiger DNS zur Codierung von DNS-MeTase, bevorzugt menschlicher DNS-MeTase, und sie sind dadurch gekennzeichnet, dass ihr Fähigkeit zum Hemmen der DNS-Methyltransferasegenexpression mit einem IC_{50} von weniger als 100 nM, bevorzugt 90 nM oder weniger, besonders bevorzugt 80 nM oder weniger, noch stärker bevorzugt 70 nM oder weniger und noch stärker bevorzugt 60 nM oder weniger und besonders bevorzugt 50 nM oder weniger beträgt. Bevorzugt wird dieser Hemmvorgang gemessen durch Ermitteln der Pegel von DNS-Methyltransferase-mRNS in menschlichen A549-Lungenkrebszellen in vitro. Für die Zwecke der Erfindung bedeutet "komplementär" eine ausreichende Komplementarität in Bezug auf die Fähigkeit, unter physiologischen Bedingungen in eine optimale Ziel-DNS-MeTase-Nukleotid-Sequenz zu hybridisieren, bei der es sich um einen Genbereich handeln kann, ein Gen oder ein RNS-Transkript hiervon. Diese Hybridisierung ist üblicherweise das Ergebnis einer basenspezifischen Wasserstoffverbindung zwischen komplementären Strängen, bevorzugt zur Bildung von Watson-Chrick- oder Googsteen-Basenpaaren, obwohl andere Modi der Wasserstoffbindung ebenso wie Basenstapel ebenfalls zur Hybridisierung führen können. Die Antisense-Oligonukleotide gemäß der Erfindung können eine oder mehrere modifizierte Basen aufweisen, die für Hybridisierung geeignet sind. Der Begriff "modifizierte Base" bedeutet vorliegende eine andere Base als die fünf traditionellen Stickstoffbasen: Adenin, Thymin, Guanin, Uridin und Zytosin. Diese modifizierten Basen sind geeignet für eine Hybridisierung mit einer komplementären traditionellen Base oder mit einer modifizierten Base. Beispielsweise ein Antisense-Oligonukleotid in Übereinstimmung mit der Erfindung kann Inosin, 5-Bromozytosin oder 5-Fluorozytosin oder ein solches enthalten, das geeignet ist für eine Hybridisierung an eine Guaninbase in der Ziel-DNS-MeTase-Sequenz. Modifizierte Basen in Übereinstimmung mit der Erfindung umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, 4-Acetylzytidin, 5-(Carboxyhydroxylmethyl)Uridin, 2'-O-Methylzytidin, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-Thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluridin, Dihydrouridin, 2'-O-Methylpseudouridin, Beta,D-Galactosylqueosin, 2'-O-Methylguanosin, Inosin, N6-Isopentenyladenosin, 1-Methyladenosin, 1-Methylpseudouridin, 1-Methylguanosin, 1-Methylinosin, 1,2-Dimethylguanosin, 2-Methyladenosin, 2-Methylguanosin, 3-Methylzytidin, 5-Methylzytidin, N6-Methyladenosin, 7-Methylguanosin, 5-Methylaminomethyluridin, 5-Methoxyaminomethyl-2-Thiouridin, Beta,D-Mannosylqueosin, 5-Methoxycarbonylmethyluridin, 5-Methoxyuridin, 2-Methylthio-N6-Isopentenyladenosin, N6-((9-Beta-D-Ribofuranosyl-2-Methylthiopurin-6-yl)Carbamoyl)Threonin, N-((9-Beta-D-Ribofuranosylpurine-6-yl)N-Methyl-Carbamoyl)Threonin, Uridin-5-Oxyessigsäuremethylester, Uridin-5-Oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouridin, Keosin, 2-Thiocytidin, 5-Methyl-2-Thiouridin, 2-Thiouridin, 4-Thiouridin, 5-Methyluridin, N-((9-Beta-D-Ribofuranosylpurin-6-yl)Carbamoyl)Threonin, 2'-O-Methyl-5-Methyluridin, 2'-O-Methyluridin, Wybutosin und 3-(3-Amino-3-Carboxypropyl)Uridin, (acp3)u. In der Praxis kann diese Komplementarität ermittelt werden aus der Beobachtung einer spezifischen DNS-MeTase-Genexpressionshemmung, wie vorstehend erläutert. Bevorzugt enthalten diese Antisense-Oligonukleotide eine oder mehrere modifizierte Internukleosidverknüpfungen und sie können optional entweder Desoxyribonukleoside, Ribonukleoside oder 2'-O-substituierte Ribonukleoside oder eine beliebige Kombination hieraus enthalten. Besonders bevorzugt umfassen Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Er-

findung schimäre Oligonukleotide und hybride Oligonukleotide.

[0022] Für die Zwecke der Erfindung umfasst der Begriff "Oligonukleotid" Polymere aus zwei oder mehr Desoxyribonukleosiden, Ribonukleosiden bzw. 2'-O-substituierte Ribonukleosidreste oder eine Kombination hieraus. Bevorzugt besitzen diese Oligonukleotide von etwa 8 bis etwa 50 Nukleosidreste, bevorzugt von etwa 21 bis etwa 50 Nukleosidreste, stärker bevorzugt von etwa 21 bis etwa 25 Nukleosidreste, und besonders bevorzugt von etwa 13 bis etwa 19 Nukleosidreste. Die Nukleosidreste können miteinander durch eine beliebige Anzahl bekannter Internukleosidverknüpfungen verbunden sein. Diese Internukleosidverknüpfungen erfassen ohne Beschränkung Phosphorothioat, Phosphorodithioat, Alkylphosphonat, Alkylphosphonothioat, Phosphotriester, Phosphoramidat, Siloxan, Karbonat, Carboxymethylester, Acetamidat, Carbamat, Thioether, gebrücktes Phosphoramidat, gebrücktes Methylenphosphonat, gebrücktes Phosphorothioat und Schwefelinternukleotidverknüpfungen. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen kann es sich bei diesen Internukleosidverknüpfungen um Phosphodiester, Phosphotriester, Phosphorothioat oder Phosphoramidatverknüpfungen oder eine Kombination hieraus handeln. Der Begriff Oligonukleotid umfasst außerdem solche Polymere, die chemisch modifizierte Basen oder Zucker aufweisen und/oder zusätzliche Substituenten aufweisen, einschließlich, ohne Beschränkung, lipophile Gruppen, interkalierende Mittel, Diamine und Adamantan. Für die Zwecke der Erfindung bedeutet der Begriff "2'-O-substituiert" eine Substitution der 2'-Position des Pentoseanteils durch eine niedrige -O-Alkylgruppe, enthaltend 1-6 gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoffatome, oder mit einer -O-Aryl- oder Allyl-Gruppe, aufweisend 2-6 Kohlenstoffatome, wobei diese Alkyl-, Aryl- oder Allyl-Gruppe unsubstituiert oder substituiert sein kann, beispielsweise mit Halo-, Hydroxy-, Trifluoromethyl-, Cyano-, Nitro-, Acyl-, Acyloxy-, Alkoxy-, Carboxal-, Carbalkoxy- oder Amino-Gruppen; oder diese 2'-Substitution kann in Gestalt einer Hydroxy-Gruppe (zur Erzeugung eines Ribonukleosids), einer Amino- oder Halo-Gruppe, nicht jedoch mit einer 2'-H-Gruppe vorliegen.

[0023] Optimierte Antisense-Oligonukleotide komplementär zu RNS oder doppelsträngiger DNS, die DNS-MeTase codiert, in Übereinstimmung mit der Erfindung sind nachfolgend gezeigt. Zusätzliche bevorzugte Oligonukleotide weisen Nukleotidsequenzen auf von etwa 13 bis etwa 19 Nukleotiden der nachfolgend gezeigten Nukleotidsequenzen.

5' CCAGGTAGCCCTCCTCGGAT 3' [SEQ ID Nr. 8]

5' AAGCATGAGCACCGTTCTCC 3' [SEQ ID Nr. 9]

5' TTCATGTCAGCCAAGGCCAC 3' [SEQ ID Nr. 10]

5' CCAAGGCCACAAACACCATG 3' [SEQ ID Nr. 13]

5' UUCATGTCAGCCAAGGCCAC 3' [SEQ ID Nr. 17]

[0024] Besonders bevorzugte Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung umfassen schimäre Oligonukleotide und hybride Oligonukleotide.

[0025] Für die Zwecke der Erfindung bezieht sich ein "schimäres Oligonukleotid" auf ein Oligonukleotid mit mehr als einem Typ einer Internukleosidverknüpfung. Eine bevorzugte Ausführungsform eines derartigen schimären Oligonukleotids ist ein schimäres Oligonukleotid, aufweisend einen Phosphorothioat-, Phosphodiester- oder Phosphorodithioat-Bereich, bevorzugt aufweisend von etwa 2 bis etwa 12 Nukleotide, und einen Alkylphosphonat- oder Alkylphosphonothioat-Bereich. Bevorzugt enthalten diese schimären Oligonukleotide zumindest drei aufeinander folgende Internukleosidverknüpfungen, die ausgewählt sind aus Phosphodiester- und Phosphorothioat-Verknüpfungen oder Kombinationen hieraus.

[0026] Für die Zwecke der Erfindung bezieht sich ein "hybrides Oligonukleotid" auf ein Oligonukleotid, das mehr als einen Nukleosidtyp aufweist. Eine bevorzugte Ausführungsform eines derartigen hybriden Oligonukleotids umfasst einen Ribonukleotid- oder einen 2'-O-substituierten Ribonukleotid-Bereich, bevorzugt aufweisend von etwa 2 bis etwa 12 2'-O-substituierte Nukleotide, und einen Desoxyribonukleotid-Bereich. Bevorzugt enthält ein derartiges hybrides Oligonukleotid zumindest drei aufeinander folgende Desoxyribonukleoside und es enthält außerdem Ribonukleosid, 2'-O-substituierte Ribonukleoside oder Kombinationen hieraus. In einer

bevorzugten Ausführungsform ist der Desoxyribonukleotid-Bereich auf jeder Seite flankiert durch einen 2'-O-substituierten Bereich. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den 2'-O-substituierten Bereichen um 2'-O-Methyl-Bereiche, besonders bevorzugt aufweisend vier 2'-O-Methyl-Nukleoside. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen ist das gesamte Skelett des Oligonukleotids ein Phosphorothioat-Skelett. Die Überlegenheit von hybriden Oligonukleotiden in Übereinstimmung mit der Erfindung ist nachfolgend in dieser Beschreibung nachgewiesen.

[0027] Die exakte Nukleotidsequenz und chemische Struktur eines Antisense-Oligonukleotids in Übereinstimmung mit der Erfindung kann variiert werden, solange das Oligonukleotid seine Fähigkeit beibehält, DNS-MeTase-Expression auf hohem Niveau an Wirksamkeit zu hemmen, wie vorstehend erläutert. Dies lässt sich problemlos ermittelt durch Testen, ob das bestimmte Antisense-Oligonukleotid in einem DNS-MeTase-mRNS-Assay, einem DNS-MeTase-Enzym-Assay, einem weichen Agar-Wachstums-Assay oder einem in vivo Tumorzellwachstums-Assay aktiv ist, die sämtliche im Einzelnen in dieser Beschreibung erläutert sind.

[0028] Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung können problemlos synthetisiert werden auf einem geeigneten festen Träger unter Verwendung an sich bekannter chemischer Ansätze, umfassend H-Phosphonatchemie, Phosphoramiditchemie oder eine Kombination aus H-Phosphonatchemie, Phosphoramiditchemie (d. h., H-Phosphonatchemie für einige Zyklen und Phosphoramiditchemie für andere Zyklen). Geeignete feste Träger umfassen beliebige der festen Standardträger, die für die feste Phase der Oligonukleotidsynthese verwendet werden, wie etwa Glas mit kontrollierter Pore (CPG). (Siehe beispielsweise Pon, *Methods in Molec. Biol.* 20: 465 (1993).

[0029] Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung sind für unterschiedliche Zwecke nützlich. Beispielsweise können sie als "Sonden" der physiologischen Funktion von DNS-MeTase verwendet werden, indem sie dazu eingesetzt werden, die Aktivität von DNS-Methyltransferase in einer experimentellen Zellenkultur oder einem tierischen System zu hemmen und den Hemmeffekt dieser DNS-MeTase-Aktivität zu evaluieren. Bewirkt wird dies durch Zumessen eines Antisense-Oligonukleotids in Übereinstimmung mit der Erfindung einer Zelle oder einem Tier und Beobachten von beliebigen phänotypischen Effekten. In diesem Gebrauch sind Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung bevorzugt gegenüber traditionellen "Gen-Knockout"-Ansätzen, weil sie problemloser einsetzbar sind und verwendet werden können, DNS-MeTase-Aktivität in ausgewählten Stufen der Entwicklung oder Differenzierung zu hemmen. Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung können deshalb als Sonden dienen, die Rolle von DNS-Methylierung in verschiedenen Entwicklungsstufen zu testen.

[0030] Schließlich sind erfindungsgemäße Antisense-Oligonukleotide nützlich in therapeutischen Ansätzen in Bezug auf benigne und maligne Tumore und andere menschliche Erkrankungen, die die Unterdrückung von Genexpression vorsehen. Die Antitumornützlichkeit von Antisense-Oligonukleotiden in Übereinstimmung mit der Erfindung ist in dieser Beschreibung an anderer Stelle erläutert. Außerdem können Antisense-Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden, um silenzierte Gene zu aktivieren, um eine fehlende Genfunktion bereitzustellen und dadurch Krankheitssymptome zurückzudrängen. Beispielsweise werden die Krankheiten Beta-Thalassemia und Sichelzellenanämie hervorgerufen durch aberrante Expression des adulten Betaglobins. Die meisten Individuen, die an diesen Krankheiten leiden, weisen normale Kopien des fetalen Gens für Betaglobin auf. Das fetale Gen ist jedoch hypermethyliert und silent. Die Aktivierung des fetalen Globins kann die benötigte Globinfunktion bereitstellen, wodurch die Krankheitssymptome verbessert werden.

[0031] Für den therapeutischen Einsatz können erfindungsgemäße Antisense-Oligonukleotide optional mit beliebigen, an sich bekannten pharmazeutisch verträglichen Trägern oder Verdünnungen formuliert werden. Die Formulierung kann außerdem einen oder mehrere DNS-MeTase-Hemmstoffe und/oder ein oder mehrere zusätzliche Anti-DNS-MeTase-Antisense-Oligonukleotide umfassen oder ein beliebiges anders pharmakologisch aktives Mittel.

[0032] In einem zweiten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Untersuchen der Rolle von DNS-MeTase im Zellwachstum bereit, einschließlich dem Wachstum von Tumorzellen. In dem Verfahren in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung wird der interessierende Zelltyp mit einem erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotid in Kontakt gebracht, was zum Hemmen der Expression der DNS-MeTase in der Zelle führt. Die Antisense-Oligonukleotide können an unterschiedlichen Punkten in dem Zellzyklus verabreicht werden oder in Verbindung mit Förderstoffen oder Hemmstoffen des Zellwachstums, um die Rolle von DNS-MeTase beim Wachstum des interessierenden Zelltyps zu ermitteln.

[0033] In einem dritten Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zum Hemmen von Tumorwachstum bereit, aufweisend das Verabreichen von erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotiden an ein Säugetier, einschließlich eines Menschen. In dem Verfahren in Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung wird eine therapeutisch wirksame Menge eines Antisense-Oligonukleotids in Übereinstimmung mit der Erfindung für eine therapeutisch wirksame Zeitdauer einem Säugetier verabreicht, einschließlich einem Menschen, das bzw. der in seinem Körper Tumorzellen aufweist.

[0034] Vorliegend wird der Begriff "Tumorwachstum" verwendet, um sich auf das Wachstum einer Tumorzelle Bezug zu nehmen. Bei einer "Tumorzelle" handelt es sich um eine neoplastische Zelle. Die Tumorzelle kann benign sein, d. h. eine solche, die keine Metastasen bildet und benachbartes normales Gewebe nicht zerstört und die in dieses nicht eindringt, oder malign, d. h. eine solche, die in umgebendes Gewebe eindringt, in der Lage ist, Metastasen zu erzeugen oder nach einer versuchten Entfernung rekurriert oder wahrscheinlich den Tod des Gastes hervorruft.

[0035] Die Begriffe "therapeutisch wirksame Menge" und "therapeutisch wirksame Zeitdauer" werden vorliegend verwendet, um bekannte Behandlungen mit Dosierungen für eine Zeitdauer zu bezeichnen, die wirksam ist, Tumorzellenwachstum zu verringern. Bevorzugt sollte diese Verabreichung parenteral, oral, sublingual, transdermal, topical, intranasal oder intrarektal erfolgen. Wenn eine systemische Verabreichung vorliegt, wird die therapeutische Zusammensetzung bevorzugt mit einer ausreichenden Dosierung verabreicht, um einen Blutpegel von Antisense-Oligonukleotid von etwa 0,01 μM bis etwa 10 μM zu erzielen. Für eine lokalisierte Verabreichung können viel geringere Konzentrationen als diese wirksam sein und viel höhere Konzentrationen können toleriert werden. Bevorzugt liegt die gesamte Dosierung des DNS-MeTase-Hemmstoffs im Bereich von etwa 0,1 mg Oligonukleotid pro Patient pro Tag bis etwa 200 mg Oligonukleotid pro kg Körpergewicht pro Tag.

[0036] In Übereinstimmung mit einer weiteren Ausführungsform können eine oder mehrere Oligonukleotide einem Tier verabreicht werden. Dieser Aspekt der Erfindung stellt Verfahren zum Hemmen des Tumorwachstums bereit, aufweisend das Verabreichen von mehr als einem erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotid an ein Tier oder einen Menschen, entweder sequenziell oder gleichzeitig in einer therapeutisch wirksamen Menge und für eine therapeutisch wirksame Zeitdauer.

[0037] Die nachfolgenden Beispiele dienen dazu, bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung zu erläutern und sind als nicht beschränkend anzusehen.

Beispiel 1

Hemmung der DNS-MeTase-Expression, gemessen in Kernextrakten, zubereitet aus menschlichen Zellen und Mauszellen

[0038] Kernextrakte werden zubereitet aus der 1×10^8 -Mid-Log-Phase von menschlichen H446-Zellen oder Maus-Y1-Zellen, die unter Standardzellkulturbedingungen wachsen gelassen wurden. Zellen wurden mit einem Medium behandelt, dem 1 mg/ml eines Antisense-Oligonukleotids zugesetzt war komplementär zu einer Sequenz des DNS-MeTase-RNS-Transkripts oder eines Randomer- (negativ Kontrollen-) Oligonukleotids. Die Zellen wurden geerntet und zweimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, woraufhin das Zellpellet in einem in 0,5 ml Puffer A resuspendiert wurde (10 mM Tris pH 8,0, 1,5 mM MgCl_2 , 5 mM KCl_2 , 0,5 mM Dtt, 0,5 mM PMSF und 0,5% Nonidet P40), um den Kern von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen. Die Kerne wurden pelletiert durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Mikrozentrifuge mit 2000 UpM für 15 Minuten bei 4°C. Der Kern wurde einmal in Puffer A gewaschen und repelletiert, daraufhin resuspendiert in 0,5 ml Puffer B (20 mM Tris pH 8,0, 0,25% Glycerol, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM PMSF, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT und 0,4 mM NaCl). Die resuspendierten Kerne wurden auf Eis für 15 Minuten inkubiert und daraufhin mit 15000 UpM in Drehung versetzt, um Kernschmutz zu pelletieren. Das Kernextrakt in dem Überstand wurde von dem Pellet getrennt und verwendet für Assays für die DNS-MeTase-Aktivität. Für jedes Assay, das dreifach ausgeführt wurde, wurden 3 μg Kernextrakt in einem Reaktionsgemisch verwendet, das 0,1 μg eines synthetischen 33-Basenpaars hemimethylierten DNS-Molekülsubstrats enthielt mit 0,5 μCi S-[Methyl- ^3H] Adenosyl-L-Methionin (78,9 Ci/mmol) als Methyl donor in einem Puffer, der 20 mM Tris-HCL (pH 7,4), 10 mM EDTA, 25% Glycerol, 0,2 mM PMSF und 20 mM 2-Mercaptoethanol enthielt. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um die anfängliche Rate der DNS-MeTase zu messen. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zusetzen von 10% TCA, um die DNS zu fällen, woraufhin die Proben bei 4°C für 1 Stunde inkubiert wurden und die TCA-Prezipitate wurden durch GFC-Filter (Fischer, Hampton, NH) gewaschen. Kontrollen wurden DNS-inkubiert in einem Reaktionsgemisch bei Abwesenheit von Kernextrakt und Kernextrakt wurde inkubiert in das Reaktionsgemisch in Abwesenheit von DNS. Die Filter wurden in Scintillationsbehälter gelegt, enthaltend 5 ml

Scintillationscocktail und trizierte Methylgruppen, eingebaut in die DNS, wurden in einem Scintillationszähler in Übereinstimmung mit Standardverfahren gemessen. Um Unterdrückung von DNS-MeTase-Expression zu messen, wurde die spezifische Aktivität des Kernextrakts aus Oligonukleotid behandelten Zellen mit der spezifischen Aktivität des Extrakts von unbehandelten Zellen verglichen. Die Behandlung der Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden gemäß der Erfindung resultiert in einer Verringerung der DNS-MeTase-Aktivität in dem Kernextrakt.

Beispiel 2

Hemmung der DNS-MeTase-Expression, gemessen durch mRNA in A549-Zellen

[0039] In einer Kultur wachsende A549-Zellen wurden mit DNS-Methyltransferase-Antisense-Oligonukleotiden in Anwesenheit von 6,25 µg/ml Lipofektion (GIBCO BRL) in einem Optimem-Serum-freien Medium (GIBCO) für 4 Stunden behandelt. Zellen wurden daraufhin einmal mit PBS gewaschen, woraufhin die Zellen in DMEM-Medium (GIBCO) rückgeführt wurden, das 10% fetales Kalbserum enthielt. 24 Stunden nach Zusetzen des Oligonukleotids wurde die gesamte Zell-RNS aus A549-Zellen isoliert, auf einem denaturierten Agarosegel einwirken gelassen, übertragen auf eine Nylonmembran (Northern Blot). Membranen wurden daraufhin hybridisiert mit einer speziellen radioaktiv markierten DNS-Methyltransferase-Sonde, gewaschen und genutzt, um einen Röntgenstrahlfilm zu belichten. Der Pegel der DNS-Methyltransferaseexpression in der Kontrolle und in den behandelten Zellen wurde ermittelt durch Quantifizierung des DNS-Methyltransferasesignals. Membranen wurden daraufhin gestriipt und rehybridisiert mit einer Sonde, die spezifisch ist für G3PDH (Glyceraldehyd 3-Phosphat, Dehydrogenase) als nicht-Antisense-Ziel-Gen zur Kontrolle auf nicht spezifische Effekte und zum Belasten der gesamten RNS. DNS-Methyltransferasepegel wurden ermittelt durch Teilen des Signals, das gewonnen wurde für die DNS-Methyltransferase, durch dasjenige, das erhalten wurde für G3PDH.

Beispiel 3

Analyse der Zell-DNS-Methylation in Zellen, die mit Antisense-Oligonukleotiden behandelt worden waren

[0040] Kernextrakte werden zubereitet aus Randomer-Oligonukleotid-behandelten Zellen und aus Antisense-Oligonukleotid-behandelten Zellen (1 µM Oligonukleotid), wie im Beispiel 1 erläutert. Das DNS-Pellet wird resuspendiert in einem 0,5 ml DNA-Extraktionspuffer (0,15 M NaCl, 1% SDS, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA), 100 µg Proteinase K wurde zugesetzt und die Suspension wurde bei 50°C für 16 Stunden inkubiert. Die DNS wurde in Phenol-Chloroform extrahiert durch Zusetzen von 0,25 ml Phenol und 0,25 ml Chloroform. Die Suspension wird gemischt und die organischen und wässrigen Phasen werden durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 10 Minuten bei 15000 UpM getrennt. Ein ml absoluter Ethanol wurde der wässrigen Phase zugesetzt und die DNS wurde gefällt durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 15 Minuten bei 15000 UpM. Das DNS-Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen und durch Zentrifugation re-pelletiert. Die DNS wird resuspendiert in 100 µl 20 mM TRis-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA.

[0041] Zwei µg DNS wurden inkubiert bei 37°C für 15 Minuten mit einer zehntel Einheit DNase, 2,5 µl ³²P-dGTP 3000 Ci/mmol, Amersham (Cleveland, OH) und dann 2 Einheiten Kornberg DNS-Polymerase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) zugesetzt und das Reaktionsgemisch wurde inkubiert für zusätzliche 25 Minuten bei 30°C. Fünfzig µl H₂O wurden daraufhin zugesetzt und nicht inkorporierte Radioaktivität wird entfernt durch Schleudern in einer Mikroschleuder S-300 HR-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ). Markierte DNS (20 µl) wurde digestiert mit 80 µg Mikrokokkennuklease (Pharmacia, Piscataway, NJ) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 10 Stunden bei 37°C. Gleiche Mengen Radioaktivität wurden auf TLC-Phosphorzelluloseplatten geladen (Merck, Darmstadt, Deutschland) und die 3'-Mononukleotide wurden getrennt durch Chromatographie in einer Richtung in 66:33:1-Isobutansäure-/H₂O/NH₄OH. Die Chromogramme wurden auf XAR-Film (Eastmann Kodak, Rochester, NY) belichtet und die Autoradiogramme wurden durch Laserdichtemessung abgetastet (Scanalytics, CSPI, Billerica, MA). Flecke entsprechend Cytosin und 5-Methylcytosin wurden quantifiziert und der Prozentsatz an nicht methylierten CG-Dinukleotiden wurden ermittelt. Es wurde erwartet, dass die Ergebnisse eine Gesamtreduktion in Prozent der nicht methylierten CG-Dinukleotide in Antisense-Oligonukleotid-behandelten Zellen zeigen, relativ zu Randomer-behandelten Zellen.

[0042] Um die Demethylierung spezifischer Gene festzustellen, wurde eine Prozedur ausgeführt, die allgemein beschrieben ist in J. Biol. Chem. 270: 12690 – 12696 (1995). Kurz gesagt, wurde die Genom-DNS (10 µg) extrahiert und einer Digestion durch 25 Einheiten HindIII unterworfen, gefolgt durch eine Digestion durch entweder 25 Einheiten MspI (CG-methylationsunempfindlich) oder 25 Einheiten HpaII (CG-methylationsempfindlich) für 8 Stunden bei 37°C. Die digestierte DNS wurde auf einem 1,5%-igen Agarosegel getrennt und

Southern Blotting unterworfen sowie einer Hybridisierung mit spezifischen Sonden. Von den Ergebnissen wurde erwartet, dass sie zeigen, dass Gene, die ordinär stark methyliert in den Testzellen waren, untermethyliert werden, während die Methylniveaus für Gene, die nicht originär schwer in den Testzellen methyliert waren, nicht signifikant betroffen waren.

Beispiel 4

Hemmung von In Vitro Tumorwachstum durch Antisense-Oligonukleotide

[0043] Y1- oder H446-Zellen wurden auf einer 6-Well-Platte mit einer Dichte von 80000 Zellen/Well plattiert. Antisense-Oligonukleotid-Phosphorothioat komplementär zu einem DNS-MeTase nicht codierten Bereich (etwa 0,5 bis 20 μM) wurden den Zellen zugesetzt. Die Zellen wurden in ähnlicher Weise täglich für 7 Tage behandelt. Daraufhin werden die Zellen geerntet und 3000 lebende Zellen werden auf weiches Agar plattiert, wie beispielsweise erläutert in Freedman and Shin, Cell 3: 355 – 359 (1974). Zwei Wochen nach dem Plattieren wurde die Anzahl von Kolonien, die sich in dem weichen Agar gebildet hatten, durch visuelle Untersuchung markiert. Im Fall aktiver Antisense-Oligonukleotide wurde eine Dosis-abhängige Verringerung der Anzahl der Kolonien beobachtet.

Beispiel 5

Hemmung von Tumorwachstum In Vivo

[0044] Zehn bis zwölf Wochen alte weibliche nackte BRLB/c-Mäuse (Taconic Labs, Great Barrington, NY) wurden subkutan in den Flankenbereich einer Injektion unterzogen mit 2×10^6 vorkonditionierten menschlichen A549-Lungenkarzinomzellen bzw. menschlichen Colo205-Colonkrebszellen. Die Vorkonditionierung dieser Zelle erfolgte mit einem Minimum von drei aufeinander folgenden Tumortransplantationen in dieselbe Art der nackten Mäuse. Daraufhin wurden Tumorfragmente von ungefähr 25 mgs entnommen und subkutan in den Mäusen implantiert, in den linken Flankenbereich unter der Foren-Narkose (Abbott Labs., Geneva, Schweiz). Wenn die Tumore ein mittleres Volumen von 100 mm^3 erreichten, wurden die Mäuse intravenös behandelt durch tägliche Bolusinfusion in die Schwanzvene mit Oligonukleotidsalzpräparationen, enthaltend 2 mg/kg Oligonukleotid in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung. Die optimale finale Konzentration des Oligonukleotids wurde festgelegt durch Dosisreaktionsexperimente in Übereinstimmung mit Standardprotokollen. Das Tumolvolumen wurde berechnet in Übereinstimmung mit Standardmethoden nach jedem zweiten Tag nach der Infusion (beispielsweise Meyer et al. Int. J. Cancer 43: 851 – 856 (1989)). Die Behandlung mit den erfindungsgemäßen Oligonukleotiden verursachte eine signifikante Verringerung des Tumorgewichts und des Tumolvolumens relativ zu Kontrollen, die mit einer randomisierten oder einer reversen Antisense-Sequenz (Daten nicht gezeigt) behandelt worden waren. Außerdem wurde die Aktivität des DNS-MeTase-Enzyms gemessen und als relativ zu den Randomer behandelten Kontrollen als signifikant verringert ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Oligonukleotide in Übereinstimmung mit der Erfindung geeignet sind, MeTase-enzymatische Aktivität und Tumorwachstum zu hemmen.

Patentansprüche

1. Antisense-Oligonukleotid komplementär zu Nukleinsäuresequenzen von RNA oder doppelsträngiger DNS, das DNS-MeTase codiert und DNS-Methyltransferasegenexpression unterdrückt, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 9, SEQ ID Nr. 10, SEQ ID Nr. 13 und SEQ ID Nr. 17.

2. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Oligonukleotid um ein schimäres Oligonukleotid handelt, das einen Phosphorothioat-, Phosphodiester- oder Phosphorodithioatbereich und einen Alkylphosphonat- oder Alkylphosphorothioatbereich umfasst.

3. Oligonukleotid nach Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid einen Ribonukleotid- oder einen 2'-O-substituierten Ribonukleotidbereich und einen Desoxyribonukleotidbereich umfasst.

4. Verwendung eines Antisense-Oligonukleotids nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zum Hemmen von Tumorwachstum.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei mehr als ein Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 1 verwen-

det wird.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

5' AUCCGAGGAGGGCUACCUGG 3' [SEQ ID NO 1]
5' GGAGAACGGUGCUC AUGCUU 3' [SEQ ID NO 2]
5' GUGGCCUUGGCUGACAUGAA 3' [SEQ ID NO 3]
5' AAGCUGUUGUGUGAGGUUCG 3' [SEQ ID NO 4]
5' UUGUGUGAGGUUCGCUUAUC 3' [SEQ ID NO 5]
5' CAUGGUGUUUGUGGCCUUGG 3' [SEQ ID NO 6]
5' UAGAGUGGGAAUGGCAGAUG 3' [SEQ ID NO 7]

FIG. 1

5' CCAGGTAGCCCTCCTCGGAT 3' [SEQ ID NO 8]
5' AAGCATGAGCACCGTTCCTCC 3' [SEQ ID NO 9]
5' TTCATGTCAGCCAAGGCCAC 3' [SEQ ID NO 10]
5' CGAACCTCACACAACAGCTT 3' [SEQ ID NO 11]
5' GATAAGCGAACCTCACACAA 3' [SEQ ID NO 12]
5' CCAAGGCCACAAACACCATG 3' [SEQ ID NO 13]
5' CCAGGTAGCCCTCCTCGGAU 3' [SEQ ID NO 15]
5' AAGCATGAGCACCGTTCUCC 3' [SEQ ID NO 16]
5' UUCATGTCAGCCAAGGCCAC 3' [SEQ ID NO 17]
5' CGAACCTCACACAACAGCUU 3' [SEQ ID NO 18]
3' GAUAAGCGAACCTCACACAA 3' [SEQ ID NO 19]
5' CCAAGGCCACAAACACCAUG 3' [SEQ ID NO 20]

FIG. 2

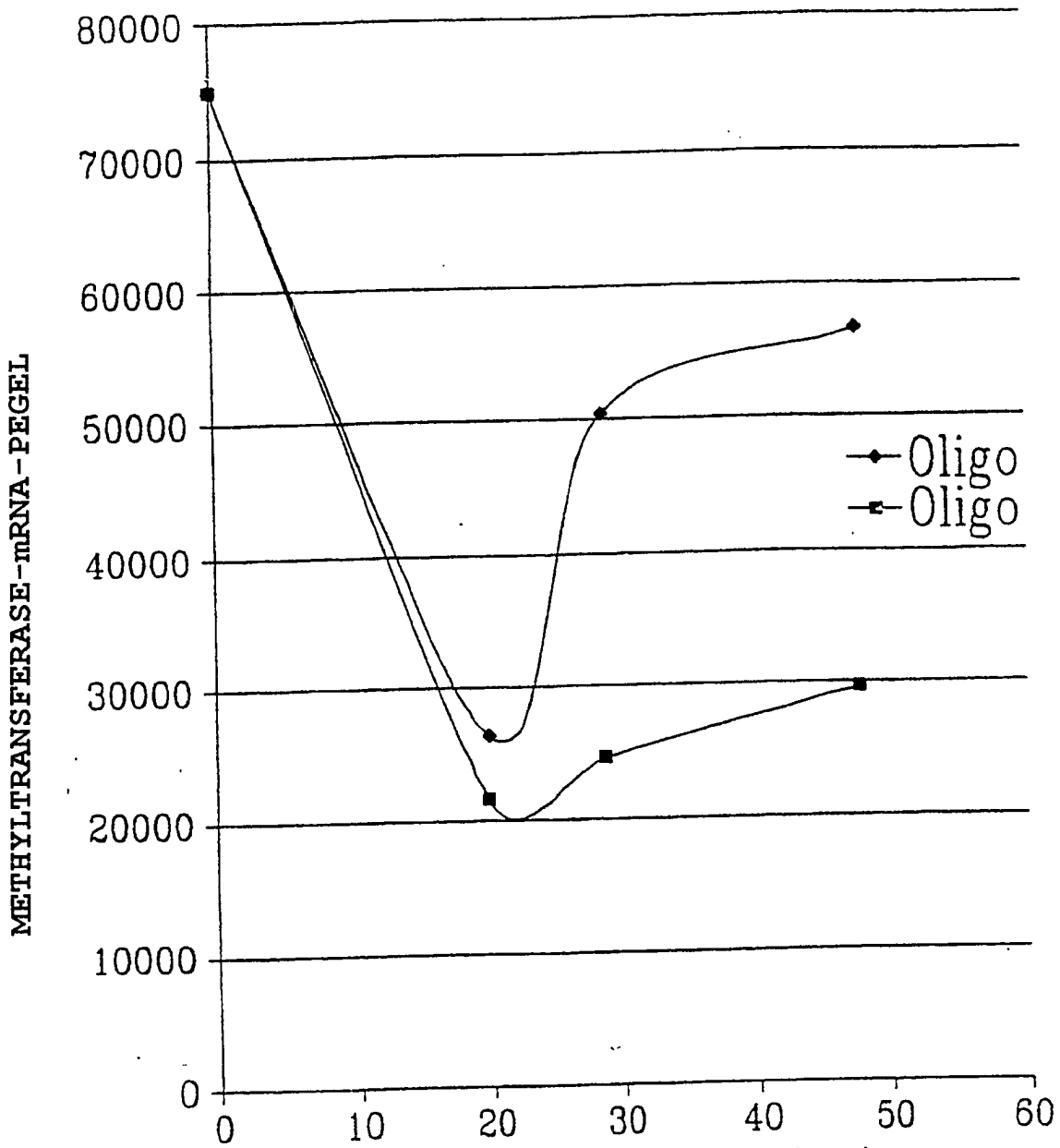
SEQUENZ	SEQ ID NO	IC ₅₀ (nM) ¹	SEQ ID NO	IC ₅₀ (nM) ²
5' CCAGGTAGCCCTCCTCGGAT 3'	[8]	90	[15]	70
5' AAGCATGAGCACCGTTCTCC 3'	[9]	66	[16]	43
5' TCATGTCAGCCAAGGCCAC 3'	[10]	67	[17]	60
5' CGAACCTCACACAACAGCTT 3'	[11]	96	[18]	75
5' GATAAGCGAACCTCACACAA 3'	[12]	90	[19]	81
5' CCAAGGCCACAAACACCATG 3'	[13]	66	[20]	60
5' CATCTGCCATTCCCCTCTA 3'	[14] ³	133	[21]	114
ZERSTÜCKELTE SEQUENZ	--	>>250	--	>>250

¹ OLIGODESOXYNUKLEOSID-PHOSPHOROTHIOAT

² HYBRIDES OLIGONUKLEOSID-PHOSPHORTHIOAT MIT VIER 2-O-METHYL-RIBONUKLEOTIDEN AN JEDEM ENDE UND DESOXYRIBONUKLEOSIDEN IN DER MITTE; WOBEI JEDES THYMIDIN INNERHALB VON VIER NUKLEOTIDEN VON ENTWEDER DEM 5' ODER DEM 3' ENDE DES ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDS

³ EIN KONTROLL-OLIGONUKLEOTID GEMÄSS DEM STAND DER TECHNIK, WELCHES DEN TRANSLATIONSINITIATIONSORT ÜBERSPANNT

FIG. 3



ZEIT VOR DER TRANSFEKTION (STD.)
EINZIGE BEHANDLUNG ZUM ZEITPUNKT 0 MIT
100 nM OLIGOMER