



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 197 T2** 2006.02.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 733 640 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 197.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP95/02348**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 938 023.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/016074**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.11.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **30.05.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.09.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **11.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.02.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07H 21/04** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**28306594**      **17.11.1994**      **JP**

(73) Patentinhaber:

**Taiho Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio/Tokyo, JP**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,**  
**80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**MATSUO, Ken-ichi, Hanno-shi, Saitama 357, JP;**  
**SUGIMOTO, Yoshikazu, Hanno-shi, Saitama 357,**  
**JP; SUZUKI, Kenji, Hanno-shi, Saitama 357, JP;**  
**ISHIDA, Keisuke, Hanno-shi, Saitama 357, JP;**  
**YAMADA, Yuji, Tokorozawa-shi, Saitama 359, JP**

(54) Bezeichnung: **DOPPELSTRÄNGIGES OLIGONUKLEOTID UND KARZINOSTATISCHES MITTEL DAS DIESES ALS AKTIVEN INHALTSSTOFF ENTHÄLT**

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**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein doppelsträngiges Oligonucleotid oder ein Derivat davon, das bei der Behandlung und Prävention von humanen Krebsarten nützlich ist.

**[0002]** Mit der Entdeckung einer Reihe von mit Krebs in Verbindung stehenden Genen in den letzten Jahren wurde allmählich mit der Klärung des Mechanismus einer malignen Transformation begonnen. Als Resultat wurde gezeigt, dass viele Krebsarten bestimmte genetische Erkrankungen sind, die durch die Abnormalität von Genen verursacht werden. Da abnormale mutante Zellen von nach ihrer Natur normalen Zellen stammen, werden sie im lebenden Körper nicht leicht als Fremdkörper erkannt und Unterschiede in ihren biologischen oder biochemischen Eigenschaften sind nicht so groß, wie im Fall von Infektionskrankheiten, die durch das Eindringen anderer Organismen verursacht werden.

**[0003]** Obgleich anschließend verschiedene Arzneimittel, Therapieverfahren und Reagentien gegen Krebs entwickelt wurden, beeinflussen diese infolge ihrer geringen Selektivität für Krebszellen nicht nur Krebszellen, sondern auch normale Gewebe und normale Zellen, so dass die Verwendung solcher Arzneimittel in der derzeitigen Situation infolge ihrer Nebenwirkungen, gleich wie wirksam sie sind, stark eingeschränkt ist.

**[0004]** Andererseits wurden in jüngerer Zeit Kontrollverfahren für die Expression spezifischer Gene entwickelt, die von Nukleinsäuren und deren Derivaten Gebrauch machen. Da Krebsarten genetische Krankheiten sind, wie es oben beschrieben wurde, können durch solche Expressionskontrollverfahren krebszellspezifische Wirkungen erwartet werden, wenn ein spezifisches Gen, insbesondere ein maligner Transformationsfaktor, als Ziel eingesetzt wird.

**[0005]** Ein solches Mittel ist das Antisense-Verfahren. In diesem Verfahren wird ein kurzes Oligonucleotid (etwa 15 bis 30 Basen Länge), das eine Nucleotidsequenz hat, die zu einer Nucleotidsequenz eines Gens, das als Ziel verwendet werden soll, komplementär ist, in Zellen eingeführt, um eine Inhibierung der Transkription oder Translation des malignen Transformationsgens zu erreichen.

**[0006]** Da allerdings einzelsträngige Oligonucleotide, die im Antisense-Verfahren zu verwenden sind, in Zellen eine geringe Stabilität haben und im lebenden Körper rasch metabolisiert werden, wurden sie noch nicht als Medikamente verwirklicht.

**[0007]** Andererseits ist eine Expression von mit Zellwachstum in Verbindung stehenden Genen in Krebszellen infolge ihres hohen Zellteilungsvermögens natürlicherweise verstärkt. Daher wurden diese Faktoren, die mit DNA-Synthese und Zellwachstum in Verbindung stehen, als Ziele für Antikrebsmittel verwendet. Allerdings ist bekannt, dass der Expressionsgrad jedes Gens in Abwesenheit von jedem Individuum, jedem Organ- und Gewebetyp variiert und der Grad variiert selbst in demselben Krebsgewebe unter Zellen stark. Folglich haben die herkömmlichen Arzneimittel, in denen ein einzelner Zellwachstumsfaktor als Ziel verwendet wird, infolge eines engen Spektrums eine begrenzte Wirksamkeit.

**[0008]** Xodo, L. E. et al.: "Thermodynamic behaviour of the hepta-decadeoxynucleotide d(CGCGCGTT-TTTCGCGCG) forming B and Z hairpins in aqueous solution", *Nucleic Acids Research* (1986), 14(13), 5389–98, XP002114619; offenbaren das thermodynamische Verhalten des Heptadesoxynucleotids d(CGCGCGTTTTTCGCGCG), das in wässrigen Lösungen B- und Z-Haarnadeln ausbildet.

**[0009]** Lees, J. A. et al.: "The Retinoblastoma Protein Binds to a Family of E2F Transkription Factors", *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 13, Nr. 12, 1. Dezember 1993, Seiten 7813–7825, XP000647897, ISSN: 0270-7306; offenbaren, dass sowohl E2F-2 als auch E2F-3 an Wildtyp-, nicht aber mutante E2F-Erkennungsstellen bindet und in vivo spezifisch an das Retinoblastomprotein bindet. Es wurde entdeckt, dass E2F-2 und E2F-3 fähig sind, die Transkription von auf E2F ansprechenden Genen in einer Art zu aktivieren, die vom Vorliegen wenigstens einer funktionellen E2F-Bindungsstelle abhängig war.

**[0010]** Clusel, C. et al.: „Ex vivo regulation of specific gene expression by nanomolar concentration of double-stranded dumbbell oligonucleotides", *Nucleic Acids Research*, Bd. 21, Nr. 15. 25. Juli 1993, Seiten 3405–3411, XP000572382, ISSN: 0305-1048; offenbaren die ex vivo-Regulierung einer spezifischen Genexpression durch nanomolare Konzentration an doppelsträngigen Hantel-Oligonucleotiden bzw. „Dumbbell“-Oligonucleotiden.

**[0011]** Morishita, R. et al.: "A Novel Molecular Strategy Using cis Element "Decoy" of E2F Binding Site Inhibits

Smooth Muscle Proliferation In Vivo", Circulation (1994), Bd. 90, Nr. 4, Teil 2, Seite 191, Abstract 1021, XP002114865 & 67th Scientific Sessions of the American Heart Association, Dallas, Texas, USA, 14.–17. November 1994; offenbaren eine neue molekulare Strategie unter Verwendung des cis-Elements "Decoy" der E2F-Bindungsstelle, das eine glatte Muskel-Proliferation in vivo inhibiert.

**[0012]** Nevins, J. R.: „E2F: A Link Between the Rb Tumor Suppressor Protein and Viral Oncoproteins", Science, Bd. 258, 16. Oktober 1992, Seiten 424–249, XP002114620; offenbaren E2F, der eine Verknüpfung zwischen dem Rb-Tumor-Suppressor-Protein und viralen Oncoproteinen ist.

**[0013]** WO-A-9511687 bezieht sich auf ein Verfahren zur Modulierung der in vivo-Gentranskription in Säugerzellen, wobei das Verfahren umfasst: Inkontaktbringen eines Säugers mit einer Zusammensetzung, die dsDNA, die eine Sequenz hat, die für eine Bindung an einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription wenigstens eines Gens moduliert, spezifisch ist, wodurch die dsDNA in die Nuclei dieser Zelle in einer Menge eingeführt wird, die ausreicht, um die Bindung des Transkriptionsfaktors an das Gen vollständig zu inhibieren, wodurch die Transkription des Gens moduliert wird.

**[0014]** Huber, H. E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 90, Seiten 3525–3529, 1993, offenbart, dass E2F wie viele andere Transkriptionsfaktoren DNA als Oligomerkomplex, der aus wenigstens zwei verschiedenen Proteinen besteht, bindet.

**[0015]** Dementsprechend besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung eines Oligonucleotids oder eines Derivats davon, das als pharmazeutische Zusammensetzung einsetzbar ist, die als Mittel gegen Krebs oder ähnliches Mittel mit einem breiten Spektrum und starker Wirksamkeit einsetzbar ist, sowie in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Verhinderung und Behandlung von Krebsarten, das von der pharmazeutischen Zusammensetzung Gebrauch macht.

**[0016]** In Anbetracht der obigen Ausführungen haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung zunächst der Tatsache Aufmerksamkeit geschenkt, dass der intracelluläre Transkriptionsfaktor E2F ausgezeichnete Eigenschaften als Ziel für Mittel gegen Krebs besitzt. Der intracelluläre Transkriptionsfaktor E2F wurde als Faktor entdeckt, der an den Adenovirus-E2-Promotor bindet, und weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass er bei der Kontrolle des Zellwachstums eine wichtige Rolle spielt (Nevis, J. R., Science, 258, 424–429 (1992); Internationale Veröffentlichung WO 95/11687). Das heißt, es wurde gezeigt, dass E2F an spezifische Sequenzen bindet, die jeweils aus 8 Basen bestehen (TTTCGCGC und TTTCCCGC), die in der Promotorregion der DNA-Polymerase- $\alpha$ , Dehydrofolatreduktase und c-myc-Genen vorliegen, die für die DNA-Synthese und das Zellwachstum essentiell sind, wodurch die Transkription dieser Gene aktiviert wird.

**[0017]** Folglich haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung angenommen, dass die Expression von mit Zellwachstum in Verbindungen stehenden Genen gemeinsam durch Inhibierung der Funktion des E2F-Proteins inhibiert werden könnte und als Resultat die Entwicklung eines neuen Mittels gegen Krebs, das ein breites Spektrum und eine starke Wirksamkeit hat, möglich gemacht würde.

**[0018]** Allerdings war berichtet worden, dass das E2F-Protein kein einzelnes Protein ist, sondern aus wenigstens 5 verschiedenen Proteinen besteht, die eine sogenannte Genfamilie bilden (siehe z.B. Huber, H.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90, 3525–3529 (1993) und Lees, J. A. et al., Mol. Cell. Biol., 13, 7813–7825 (1993)). Außerdem ist die funktionelle Zuordnung der einzelnen E2F-Proteine noch nicht geklärt. Unter solchen Bedingungen war es schwierig, die Expression aller E2F-Gene selbst durch Verwendung des üblichen Antisense-Verfahrens zu inhibieren.

**[0019]** Als Folge haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung die vorliegende Erfindung auf der Basis der Feststellung vollendet, dass eine Verarmung an intracellulären E2F-Proteinen induziert werden kann, indem die intracellulären E2F-Proteine mit einem doppelsträngigen Oligonucleotid, das TTTSSCGS enthält, welches eine Erkennungssequenz dieser E2F-Proteine ist, absorbiert werden, so dass eine Expression von E2F-betreffenden, mit Zellwachstum in Verbindung stehenden Genen inhibiert werden kann und eine beachtlich starke Krebs-cytotoxische Aktivität erzielt werden kann.

**[0020]** Dementsprechend umfasst die vorliegende Erfindung die folgenden Konstruktionen.

1. Doppelsträngiges Oligonucleotid, das 15 bis 40 Basenpaare umfasst, wobei mindestens eine Seite der Stränge wenigstens eine Nucleotidsequenz enthält, welche durch 5'-TTTSSCGS-3' dargestellt wird, worin S für G oder C steht, und wobei die Basenpaare eine Nucleotidsequenz, die durch 5'-(TTTSSCGS)<sub>n</sub>-3', worin n 2 bis 5 ist, dargestellt wird, an einer Seite der Stränge haben, und wobei das doppelsträngige Oligo-

nucleotid ein Phosphodiestergrundgerüst, ein Methylphosphatgrundgerüst oder ein Phosphorothioatgrundgerüst hat.

2. Doppelsträngiges Oligonucleotid nach Anspruch 1, wobei n 2 bis 4 ist.

3. Doppelsträngiges Oligonucleotid nach Anspruch 1, das die Nucleotidsequenz 5'-TTTGGCGCTT TCGCGCTTTC CCGC-3',

wie sie in Sequence ID No. 1 dargestellt ist, hat.

4. Doppelsträngiges Oligonucleotid nach Anspruch 1, das in einer Hantelform vorliegt.

5. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktives Ingrediens wenigstens eines der in den Ansprüchen 1 bis 4 beschriebenen Oligonucleotide umfasst.

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, die ein präventives und therapeutisches Mittel gegen Krebs ist.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6 zur Verwendung in einem Verfahren zur Prävention und Behandlung von Krebs.

**[0021]** Das doppelsträngige Oligonucleotid der vorliegenden Erfindung umfasst 15 bis 40 Basenpaare, wobei mindestens eine Seite der Stränge wenigstens eine Nucleotidsequenz enthält, welche durch 5'-TTTSSCGS-3' dargestellt wird (S steht für G oder C) (die Sequenz 5'-TTTSSCGS-3' wird im Nachfolgenden Grundsequenz genannt). Ein doppelsträngiges Oligonucleotid, das eine Grundsequenz hat, bedeutet, dass einer der Doppelstränge eine Sequenz 5'-N<sup>1</sup>.....NTTTSSCGSN<sup>2</sup>.....N-3' (N ist A, T, G oder C) durch die Bindung von insgesamt 7 bis 32 optionalen Basen N an seinem 5'-Ende und/oder 3'-Ende bildet und der andere Strang eine Sequenz ist, die zu der erstgenannten Sequenz komplementär ist; das doppelsträngige Oligonucleotid kann entweder in linearer Form oder ringförmiger Form vorliegen.

**[0022]** Auch wenn die Grundsequenz in größerer Zahl vorliegt, kann die Oligonucleotidsequenz in der gleichen Weise wie im obigen Fall einer Basissequenz gebildet werden, indem die vorstehend genannte Sequenz N<sup>1</sup>.....N<sup>2</sup> ganz oder teilweise durch die Grundsequenz ersetzt wird. Der Ersatz der Grundsequenz kann durch kontinuierliche Verknüpfung der Grundsequenz über ein einzelnes N oder über eine Vielzahl von N oder in einer Kombination davon erfolgen. Die S-Basen in jeder Grundsequenz können gleich oder voneinander verschieden sein.

**[0023]** Das doppelsträngige Oligonucleotid der vorliegenden Erfindung kann vorzugsweise 15 bis 32 Basenpaare, bevorzugter 22 bis 32 Basenpaare, haben.

**[0024]** Wenn das doppelsträngige Oligonucleotid der vorliegenden Erfindung nur auf der Grundsequenz aufgebaut ist, kann die Anzahl der Grundsequenzen vorzugsweise 2 bis 5, bevorzugter 2 bis 4, pro Strang sein. Der Ausdruck „nur auf der Grundsequenz aufgebaut“ bezeichnet ein doppelsträngiges Oligonucleotid, das durch 5'-(TTTSSCGS)<sub>n</sub>-3' dargestellt ist, worin n vorzugsweise 2 bis 5, bevorzugter 2 bis 4, ist. Besonders bevorzugt ist die Sequenz der der Sequenz ID NO. 1.

**[0025]** Wenn das doppelsträngige Oligonucleotid der vorliegenden Erfindung durch Einschluss von N aufgebaut wird, ist der Fall bevorzugt, in dem die Grundsequenz an beiden Strängen angeordnet ist, bevorzugter ist der Fall, in dem beide Stränge SSCGS oder einen Teil von SSCGS gemeinsam besitzen, oder der Fall, in dem 5'-TTTSSCGS-3' und sein komplementäres Basenpaar 5'-SCGSSAAA-3' fortlaufende Basenpaare sind, und am meisten bevorzugt ist der Fall, in dem eine Nucleotidsequenz, die durch 5'-TTTSSCGSSAAA-3' ausgedrückt, oder eine Nucleotidsequenz, die durch 5'-SCGSSAAATTTSSCGS-3' dargestellt wird, an einer Seite der Stränge angeordnet ist. Erläuternde Beispiele sind die, die in SEQ ID Nos. 2 und 3 offenbart sind, obgleich keine besondere Beschränkung auf diese besteht.

**[0026]** Das erfindungsgemäße Oligonucleotid kann im Allgemeinen unter Verwendung einer im Handel verfügbaren DNA-Syntheseapparatur gemäß den bekannten Techniken synthetisiert werden. Im Hinblick auf den intracellulären Einbau und die Stabilität kann in diesem Fall eine Phosphodiesterverknüpfung durch eine Methylphosphatverknüpfung (US-Patent 4,511,713) oder eine Phosphorothioatverknüpfung (JP-A-1-503302; der hierin verwendete Ausdruck „JP-A“ bezeichnet eine „ungeprüfte veröffentlichte japanische Patentanmeldung“) ersetzt werden. Jeder dieser Typen kann auch unter Verwendung einer im Handel verfügbaren DNA-Syntheseapparatur synthetisiert werden. Die Bildung eines doppelsträngigen Oligonucleotids nach der Synthese kann durch üblicherweise eingesetzte Anlagerungstechniken bzw. Annealing-Techniken erfolgen.

**[0027]** Außerdem ist es möglich, den intracellulären Einbau zu erhöhen, indem Cholesterin oder eine ähnliche fettlösliche Verbindung an das 5'- oder 3'-Ende des Oligonucleotids, das eine solche Sequenz enthält, gebunden wird, oder es ist möglich, die Nucleaseresistenz deutlich zu erhöhen, indem die doppelsträngige DNA zu

einem sogenannten Dumbbell-Typ bzw. zu einer DNA des Hanteltyps durch Bindung ihrer beiden terminalen Enden unter Verwendung eines Enzyms oder dergleichen geformt wird (Clusel, C. et al., *Nucleic Acids Res.*, 21, 3405–3411 (1993)).

**[0028]** Gemäß dem doppelsträngigen Oligonucleotid gemäß der Erfindung in Hantel-Form wird eine Nucleotidsequenz, die keine Wasserstoffbindung bildet, an beiden Enden des doppelsträngigen Oligonucleotids derart gebunden, dass das doppelsträngige Oligonucleotid ein ringförmiges einzelsträngiges Oligonucleotid bildet, das den doppelsträngigen Teil enthält. Mit anderen Worten, die voranstehend genannte Nucleotidsequenz, die keine Wasserstoffbindung bildet, wird an die 5'- und 3'-endständigen Basen jedes Terminus des doppelsträngigen Oligonucleotids gebunden, wodurch eine Hantel-Form gebildet wird, in der beide Enden einzelsträngig sind und der zentrale bzw. mittlere Teil doppelsträngig ist. Die Nucleotidsequenz, die keine Wasserstoffbindung bildet, kann eine Länge von 1 bis 15 Basen, vorzugsweise 3 bis 8 Basen, pro Terminus haben.

**[0029]** Ein Beispiel für einen derartigen Typ ist das doppelsträngige Oligonucleotid des Hanteltyps, das im vorstehenden Punkt 12 genannt ist, in dem G und C des Basenpaars in Position 1 von Sequenz ID NO. 3 über TTTT miteinander verknüpft sind und C und G des Basenpaars in Position 28 derselben über TTTT miteinander verknüpft sind.

**[0030]** In diesem Zusammenhang ist N des Hantel-Elements des doppelsträngigen Oligonucleotids vom Hanteltyp bzw. „Dumbbell“-Typ nicht in den Basen der 15 bis 40 Basenpaare enthalten, welche das doppelsträngige Oligonucleotid der vorliegenden Erfindung bilden.

**[0031]** Folglich umfassen Beispiele für das doppelsträngige Oligonucleotidderivat der vorliegenden Erfindung solche, die die Wirkung haben, eine Expression von E2F-betreffenden, mit Wachstum in Verbindung stehenden Genen ähnlich wie das vorstehend genannte Oligonucleotid zu inhibieren, in denen die Phosphodiesterverknüpfung durch eine Methylphosphatverknüpfung oder Phosphorothioatverknüpfung ersetzt ist, eine fettlösliche Verbindung an ihr 5'- oder 3'-Ende gebunden ist, oder die ein doppelsträngiges Oligonucleotid der Hantel-Form bilden.

**[0032]** Da das doppelsträngige Oligonucleotid oder ein Derivat davon gemäß der vorliegenden Erfindung (im Folgenden als erfindungsgemäße Verbindung bezeichnet) starke Wirkungen zur Abtötung von Zellen und zur Inhibierung der Expression von E2F-betreffenden, mit Wachstum in Verbindungen stehenden Genen hat, kann es als aktives Ingredienz pharmazeutischer Zusammensetzungen eingesetzt werden.

**[0033]** Die pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann die erfindungsgemäßen doppelsträngigen Oligonucleotide oder Derivate davon alleine oder als eine Kombination in derselben Zusammensetzung enthalten und der Mischungsanteil jedes doppelsträngigen Oligonucleotids oder eines Derivats davon kann gegebenenfalls verändert werden.

**[0034]** Die pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung kann aus dem vorstehend genannten doppelsträngigen Oligonucleotid oder einem Derivat davon und einem bekannten pharmazeutischen Träger hergestellt werden und ist insbesondere als Mittel zur Prävention und Behandlung von Krebs einsetzbar.

**[0035]** Wenn das doppelsträngige Oligonucleotid der vorliegenden Erfindung oder ein Derivat davon als Medizin für Säuger, einschließlich Mensch, angewendet wird, kann es in Abhängigkeit vom jeweiligen präventiven oder therapeutischen Zweck zu verschiedenen Dosierungsformen verarbeitet sein, z.B. Injektionen, Suppositorien, Präparate für eine äußerliche Anwendung (z.B. Cataplasmen, Bänder und ähnliche klebende Präparate, Salben, Cremes und Lotionen), Augentropfen, Nasentropfen und dergleichen; diese Präparate können entsprechend den jeweiligen Medizin-Herstellungstechniken, die dem Fachmann bekannt sind, produziert werden.

**[0036]** Wenn Injektionen hergestellt werden, können subkutane, intramuskuläre und intravenöse Injektionen durch Vermischen der erfindungsgemäßen Verbindung mit einem pH-Einstellmittel, einem Puffer, einem Sterilisierungsmittel, einem isotonischen Mittel, einem Lokalanästhetikum und dergleichen nach einem üblichen Verfahren hergestellt werden. Beispiele für das pH-Einstellmittel und den Puffer umfassen in diesem Fall Natriumcitrat, Natriumacetat, Natriumphosphat und dergleichen. Als Stabilisierungsmittel können Natriumpyrosulfit, EDTA, Thioglykolsäure, Thiomilchsäure und dergleichen verwendet werden. Beispiele für das Lokalanästhetikum umfassen Procainhydrochlorid, Lidocainhydrochlorid und dergleichen. Natriumchlorid, Glucose und dergleichen können als isotonisches Mittel eingesetzt werden.

**[0037]** Suppositorien können durch Vermischen der erfindungsgemäßen Verbindung mit pharmazeutischen Trägern, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, z.B. Polyethylenglykol, Lanolin, Kakaobutter und Fettsäuretriglycerid, wie auch Tween (Handelsbezeichnung) und ähnlichen oberflächenaktiven Mitteln, entsprechend dem Bedarf, und danach Formen des resultierenden Gemisches in einem üblichen Verfahren hergestellt werden.

**[0038]** Salben werden durch Mischen der erfindungsgemäßen Verbindung mit allgemein verwendeten Grundmaterialien, Stabilisatoren, Befeuchtungsmitteln, Gleitmitteln und dergleichen, die vom jeweiligen Zweck abhängig sind, und Mischen der Formulierung nach einem gängigen Verfahren produziert. Beispiele für solche Grundmaterialien umfassen flüssiges Paraffin, weißes Petrolatum, gebleichtes Bienenwachs, Octyldodecylalkohol, Paraffin und dergleichen. Beispiele für die Konservierungsmittel umfassen Methylparaoxybenzoat, Ethylparaoxybenzoat, Propylparaoxybenzoat und dergleichen.

**[0039]** Klebende Präparate werden in üblicher Weise produziert, indem ein allgemein verwendeter Träger mit den vorstehend genannten Salben, Cremes, Gelen, Pasten oder dergleichen beschichtet wird. Beispiele für geeignete Träger umfassen Gewebe oder Faservlies, hergestellt aus Baumwolle, Stapelfasern, chemischen Fasern und dergleichen, sowie Filme oder Schaumfolien aus weichem Vinylchlorid, Polyethylen, Polyurethan und dergleichen.

**[0040]** Außerdem kann die erfindungsgemäße Verbindung durch Einkapselung derselben in Liposomen, in denen das aktive Ingredienz in feinen Partikeln dispergiert ist, welche aus wässrigen konzentrischen Schichten, die fest mit Fettschichten verbunden sind, bestehen, verabreicht werden oder sie kann als pharmakologische Zusammensetzung in anderen Formen verwendet werden. In Abhängigkeit von ihrer Löslichkeit kann die wirksame Verbindung sowohl in wässrigen als auch in Fettschichten vorliegen oder kann in Form einer sogenannten Liposomensuspension verwendet werden. Die hydrophobe Schicht besteht aus einem Phospholipid, z.B. Lecithin, einem Steroid, z.B. Cholesterin, einem leicht ionischen oberflächenaktiven Mittel, z.B. Dicetylphosphat, Stearylamin oder Phosphatidsäure, und/oder anderen hydrophoben Verbindungen. Die Partikelgröße der Liposomen liegt im Allgemeinen im Bereich von etwa 15 nm bis etwa 5 µm.

**[0041]** Obgleich der Anteil des Oligonucleotids der vorliegenden Erfindung in pharmazeutischen Präparaten in Abhängigkeit von jedem Präparat variiert, kann er vorzugsweise im Allgemeinen im Bereich von etwa 1 bis 70 Gew.-% liegen.

**[0042]** Das Verabreichungsverfahren des pharmazeutischen Präparats der vorliegenden Erfindung ist nicht besonders beschränkt und kann gegebenenfalls in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosierungsform, dem Alter, Geschlecht und anderen Bedingungen für jeden Patienten, dem Grad der Symptome und dergleichen gewählt werden. Beispielsweise kann für eine intravenöse Injektion ein Injektionspräparat als solches verwendet werden oder es kann durch Mischen mit üblichen Hilfslösungen, z.B. von Glucose, Aminosäuren und dergleichen, verwendet werden oder es kann nach Bedarf alleine zur intraarteriellen, intramuskulären, subkutanen oder intraperitonealen Injektion verwendet werden. Suppositorien werden in das Rectum verabreicht und Salben werden auf die Haut, die Mundschleimhaut und dergleichen angewendet.

**[0043]** Die Dosis der erfindungsgemäßen Verbindung kann gegebenenfalls in Abhängigkeit vom jeweiligen Verabreichungsverfahren, dem Alter, Geschlecht und anderen Bedingungen jedes Patienten, dem Grad der Symptome und dergleichen ausgewählt werden. Im Allgemeinen kann die erfindungsgemäße Verbindung in einer ungefähren Dosis von 0,01 bis 1000 mg/kg/Tag, vorzugsweise von 0,01 bis 10 mg/kg/Tag verabreicht werden. Die oben angegebene tägliche Dosis kann einmal am Tag oder in 2 bis 4 tägliche Dosen aufgeteilt verwendet werden.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0044]** [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, das das Infrarotabsorptionsspektrum des Oligonucleotids, das durch die Sequenz ID NO. 1 dargestellt wird, zeigt.

**[0045]** [Fig. 2](#) ist eine graphische Darstellung, die die Resultate eines Tests zeigt, der unter Verwendung eines für einzelsträngige DNA spezifischen Verdauungsenzyms durchgeführt wurde, um die Produktion eines doppelsträngigen Oligonucleotids vom Hanteltyp zu bestätigen.

**[0046]** [Fig. 3](#) ist ein Diagramm, das Resultate einer Western-Blot-Analyse von E2F-regulierten Genproteinen nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Verbindung zeigt (Hanteltyp, Sequenz ID NO: 1).

[0047] [Fig. 4](#) ist eine graphische Darstellung, die die Resultate einer RT-PCR-Analyse der Menge an mRNA zeigt, die durch die erfindungsgemäße Verbindung verändert wurde.

[0048] [Fig. 5](#) ist eine graphische Darstellung, die die Resultate eines Gel-Verschiebungs-Assays zeigt, der durchgeführt wurde, um die Bindung von E2F-Protein an die erfindungsgemäße Verbindung zu analysieren.

#### BESTER MODUS ZUR DURCHFÜHRUNG DER ERFINDUNG

[0049] Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der folgenden erfindungsgemäßen Beispiele, Testbeispiele und Formulierungsbeispiele detaillierter erläutert, sollte aber nicht so verstanden werden, dass die vorliegende Erfindung auf diese beschränkt werden soll.

#### Erfindungsgemäßes Beispiel 1:

##### Entwicklung und Herstellung von doppelsträngigem Oligonucleotid

[0050] Unter Verwendung eines im Handel verfügbaren automatischen DNA-Synthesizers (hergestellt von Applied Biosystems), in dem ein  $\beta$ -Cyanoethyl-Syntheseverfahren angewendet wurde, wurden die Oligonucleotide, die durch Sequenz ID NO: 1 bis 3 dargestellt werden, und ihre entsprechenden komplementären Ketten synthetisiert; jedes Paar der Oligonucleotide wurde gemischt und nach einer üblichen Anlagerungstechnik (Annealing) doppelsträngig (lineare Kette) gemacht. Auch das doppelsträngige Oligonucleotid des Hanteltyps (nachfolgend einfach als „Hanteltyp“ bezeichnet), in dem G und C des Basenpaars in Position 1 von ID NO: 3 über TTTTT miteinander verknüpft waren, und C und G des Basenpaars in Position 28 derselben über TTTTT miteinander verknüpft waren, wurde hergestellt, indem ein einzelsträngiges DNA-Fragment mit 38 mer unter Verwendung des C in Position 20 als 5'-Ende synthetisiert wurde, eine Bildung derselben doppelsträngigen Gruppierung von Sequenz ID NO: 3 im Molekül durch Anlagerungsreaktion durchgeführt wurde und das Produkt dann mit T4-Ligase gerundet wurde.

[0051] In [Fig. 1](#) ist ein Diagramm des Infrarotabsorptionsspektrums (KBr-Verfahren) von Sequenz ID NO: 1 gezeigt.

[0052] Eine geeignete geformte Struktur des so produzierten Hanteltyps wurde durch einen Verdau-Test unter Verwendung eines Verdauenzym, das für einzelsträngige DNA spezifisch ist, mit den in [Fig. 2](#) gezeigten Resultaten bestätigt. D.h., das Hanteltyp-Oligonucleotid, das mit  $^{32}\text{P}$  markiert war, wurde mit einem für einzelsträngige DNA spezifischen Verdauenzym, Mungbohennuclease, verdaut, einer 20% Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen und dann wurde das resultierende Gel getrocknet, um seine Radioaktivitätsverteilung unter Verwendung eines BAS-2000 Bio-Imaging-Analyzers (hergestellt von Fuji Photo Film) zu analysieren. Als Resultat bestätigte eine Beurteilung der Mobilität jeder detektierten Bande, dass das Molekül, das der Ringschlussreaktion unterworfen worden war, die einzelsträngige TTTTT-Gruppierung durch den Verdau mit Mungbohennuclease verloren hatte, wobei dasselbe 28 mer lange, doppelsträngige Oligonucleotid von Sequenz ID NO: 3 mit einer Hanteltyp-Struktur gebildet wurde.

#### Testbeispiel 1:

[0053] Die cytotoxischen Aktivitäten des im erfindungsgemäßen Beispiel erhaltenen doppelsträngigen Oligonucleotids, anderer in Tabelle 1 gezeigter Oligonucleotide, die in der gleichen Weise synthetisiert worden waren, und von Adriamycin wurden in einem Kultursystem unter Verwendung humaner, zervikaler Karzinom-HeLa-Zellen untersucht. D.h.  $5 \times 10^2$  Zellen/100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung HeLa-Zellen, suspendiert in 10% mit fötalem Rinderserum ergänztem MEM-Medium, wurden in eine Kulturschale mit 96 Vertiefungen ausgesät und nach 2-tägiger Kultur wurden in jede Vertiefung 100  $\mu\text{l}$  MEM-Medium, das 4  $\mu\text{M}$  Lipofectin und jedes Oligonucleotid enthielt, die vorher bei Raumtemperatur für 1 Stunden umsetzen gelassen worden waren, gegeben. Nach weiteren 3 Tagen Kultur wurde die Anzahl der Zellen durch das Kristallviolett-Verfahren bestimmt, um den  $\text{IC}_{50}$ -Wert zu errechnen. Die Resultate sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

Verbindungen	IC <sub>50</sub> (µM)	Bemerkungen
Sequenz ID NO: 1	3	Erfindungsgemäße Verbindung
Sequenz ID NO: 2	0,4	”
Sequenz ID NO: 3	2	”
Hanteltyp	10	”
Sequenz ID NO: 4	40	Vergleichsverbindung
Sequenz ID NO: 5	260	”
Sequenz ID NO: 6	>667	”
Sequenz ID NO: 7	30	”
Sequenz ID NO: 8	>667	”
Adriamycin	250	”

**[0054]** Wie aus den in Tabelle 1 angegebenen Resultaten klar wird, haben die erfindungsgemäßen Verbindungen der Sequenz ID NO: 1 bis 3 und vom Hanteltyp mehrfache bis 1000fache oder noch stärker cytotoxische Aktivität als die Vergleichsverbindungen der Sequenz ID NO: 4 bis 8. In diesem Zusammenhang ist Sequenz ID NO: 4 eine Sequenz, die durch Verschieben der Nucleotidsequenz von Nucleotidsequenz ID NO: 1 hergestellt wurde. Sequenz ID NO: 5 ist eine Antisense-Verbindung von E2F-1 (eines der E2F-Proteine) und Sequenz ID NO: 7 ist eine Antisense-Verbindung von c-myc und Sequenz ID NO: 6 ist eine Nichtsinn-Verbindung von E2F-1 und Sequenz ID NO: 8 ist eine Nichtsinn-Verbindung von c-myc.

## Testbeispiel 2:

**[0055]** Um zu bestätigen, dass die cytotoxische Aktivität der erfindungsgemäßen Verbindungen, die in Testbeispiel 1 gezeigt wird, durch die Inhibierung der E2F-Funktion bewirkt wird, wurden Änderungen bei der Expressionsmenge an E2F-1 selbst und c-myc, c-myb und Cyclin D1, von denen angenommen wird, dass sie durch E2F-1 reguliert werden, durch Western-Blotting untersucht. D.h., HeLa-Zellen wurden für 2 Tage in einer Platte mit 24 Vertiefungen kultiviert und dann für 16 Stunden mit jedem Oligonucleotid in derselben Weise, wie in Testbeispiel 1 beschrieben, behandelt. Danach wurden die resultierenden Zellen mit einem Solubilisierungsmittel (50 mM Tris-Puffer, pH 7,5/0,05% SDS) behandelt, um einen rohen Zellextrakt zu erhalten. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in jeder Probe wurde eine vorbestimmte Menge des Proteinextrakts einer SDS-PAGE-Elektrophorese unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde Protein auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, um die Menge an exprimiertem Protein in jeder Probe zu bestimmen, wobei jeweils die in Tabelle 2 angegebenen monoclonalen Antikörper verwendet wurden. Als Kontrolltest wurde ein Western-Blotting in der gleichen Weise unter Verwendung von GAPDH (Glutaraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt, die durch die Bedingungen des Zellwachstums kaum verändert wurde. Tabelle 2 zeigt die Wirkung von erfindungsgemäßen Verbindungen und Vergleichsverbindungen auf die Expression von mit E2F-1 und E2F- in Verbindung stehenden Proteinen.

Tabelle 2

Proteintypen	Sequenz ID NO: 5 (0,5 µM)*	Sequenz ID NO: 6 (0,5 µM)*	Sequenz ID NO: 1 (0,01 µM)*	Sequenz ID NO: 4 (0,01 µM)*
E2F-1	A	B	B	B
c-myc	A	B	A	B
c-myb	A	B	A	B
Cyclin D1	B	B	B	B
GAPDH	B	B	B	B

## Bemerkungen:

„\*“: verwendete Menge an Oligonucleotid

A: Inhibierung der Expression

B: keine Veränderung bei der Expression

Sequenz ID NO: 1 ist eine erfindungsgemäße Verbindung

Sequenz ID NO: 4, 5 und 6 sind Vergleichsverbindungen.

**[0056]** Als Resultat wurde die Expression von c-myc und c-myb, die durch E2F-1 reguliert wird, in spezifischer Weise durch Behandlung mit 0,01  $\mu\text{M}$  der erfindungsgemäßen Verbindung der Sequenz ID NO: 1 inhibiert. In diesem Fall sind Änderungen bei der Expression von E2F-1-Protein und GAPDH nicht detektierbar. Im Fall des doppelsträngigen Oligonucleotids der Sequenz ID NO: 4, in der die E2F-Bindungssequenz durch Umordnen der Sequenz der Sequenz ID NO: 1 deletiert war, erfolgte keine Veränderung der Expression der Genprodukte, nämlich der Proteine, die zu dieser Zeit gemessen wurden. Wie in [Fig. 3](#) dargestellt ist, bestätigten außerdem die Resultate der Untersuchung, die 48 Stunden nach der Oligonucleotidbehandlung durchgeführt worden war, dass die Verbindung des Hanteltyps, die eine verbesserte Stabilität hat, die Menge an Cyclin D1- und E2F-1-Proteinen reduzierte, bei der die Verbindung der Sequenz ID NO: 1 nicht wirkt. In diesem Fall waren keine Veränderungen bei der Proteinexpression von GAPDH detektierbar.

**[0057]** Die Resultate einer Untersuchung der Wirkung eines Antisense-Oligonucleotids (Sequenz ID NO: 5) auf E2F-1, die zur gleichen Zeit durchgeführt wurde, zeigte, dass es anders als im Fall der erfindungsgemäßen Verbindung eine Inhibierung der Expression von mit E2F-1 in Verbindung stehenden Genen durch Inhibierung der Transkription von E2F-1 induzieren kann. Allerdings erforderte die Verbindung der Sequenz ID NO: 5 eine 50-mal höhere Konzentration als die erfindungsgemäße Verbindung, um einen ähnlichen Grad der Inhibierungswirkung wie die erfindungsgemäße Verbindung auszuüben.

## Testbeispiel 3:

**[0058]** Um zu bestätigen, dass die Reduktion des durch E2F regulierten Proteins, die in Testbeispiel 2 festgestellt wurde, durch die Inhibierung der Genexpression über eine verringerte mRNA-Synthese bewirkt wird, wurden Veränderungen bei der Menge an mRNA nach Behandlung mit jeweils der Sequenz ID NO: 1 und Verbindungen des Hanteltyps der vorliegenden Erfindung untersucht. HeLa-Zellen wurden jeweils mit der erfindungsgemäßen Sequenz ID NO: 1, Verbindungen des Hanteltyps und 4  $\mu\text{M}$  Lipofectin für 48 Stunden in der gleichen Weise, wie in Testbeispiel 2 beschrieben, behandelt und die Menge jedes mRNA-Typs in Zellen wurde durch das RT-PCR(Umkehrtranskription-Polymerase-Kettenreaktion)-Verfahren analysiert. D.h., RNA wurde in den Zellen unter Verwendung eines RNeasy-RNA-Reinigungs-Kits (hergestellt von Qiagen) gereinigt und cDNA wurde unter Verwendung der so gereinigten RNA als Matrize und poly(dT)<sub>12-18</sub> als Primer mit Hilfe der AMW-reversen Transkriptase und eines First Strand Synthesis-Kits (hergestellt von Life Sciences) hergestellt. Um eine PCR-Amplifikation von mRNA jedes durch E2F regulierten Gens durchzuführen, wurde danach das entsprechende cDNA-Fragment durch das PCR-Verfahren unter Verwendung des entsprechenden Primersatzes amplifiziert. In diesem Fall wurde GAPDH-mRNA, die sich unter Zellwachstumsbedingungen kaum ändert, gleichzeitig als interner Standard verwendet. Die Anzahl der Wiederholungen der Amplifikation für jeden Lauf wurde innerhalb eines Bereiches eingestellt, bei dem eine lineare Amplifikation erzielt werden konnte. Jede der auf diese Weise durch PCR amplifizierten Proben wurde einer 2% Agarosegel-Elektrophorese unterzogen, DNA im resultierenden Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und dann wurden UV-Strahlen auf das Gel angewendet, um die DNA sichtbar zu machen. Ein solches Verfahren macht eine Beurteilung der DNA-Menge als Fluoreszenzintensität jeder DNA-Bande möglich (Wang, H. et al., Anal. Biochemistry, 223, 251–258, 1994).

**[0059]** Die Resultate der Agarose-Elektrophorese sind in [Fig. 4](#) gezeigt (die Menge an DNA wurde wie oben beschrieben beurteilt). Die gleichzeitig amplifizierte GAPDH-mRNA änderte sich durch die Oligonucleotidbehandlung nicht, allerdings nahm die mRNA-Konzentration für Cyclin D1, dessen Expression durch E2F reguliert wird, und von E2F-1 selbst ab, wenn eine Behandlung mit der Verbindung vom Hanteltyp erfolgte. Außerdem induzierte die Verbindung vom Hanteltyp auch eine Verringerung der mRNA-Konzentration von anderen E2F-regulierten Genen von DHFR und DNA-Polymerase- $\alpha$  (DANN-pol- $\alpha$ ).

## Testbeispiel 4:

**[0060]** Um zu bestätigen, dass eine solche Inhibierung der Genexpression über eine verringerte Expressions-

quantität von mRNA auf der sequenzspezifischen kompetitiven Inhibierung von doppelsträngigem Oligonucleotid mit E2F-Protein um seine Transkriptionsregion beruht, wurde die Bindungsfähigkeit von E2F-Protein an doppelsträngiges Oligonucleotid durch einen Gel-Verschiebungs-Assay untersucht, der in [Fig. 5](#) gezeigt ist. D.h., jede der Verbindungen der Sequenz ID NO: 1 und 3 und des Hanteltyps wurde mit  $^{32}\text{P}$  unter Verwendung von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  und T4-Polynucleotid-Kinase markiert. Diese wurde dann mit einem Zellextrakt vermischt, der vorher nach dem Verfahren von Dignam, J. D. et al. (Nucl. Acids Res., 11, 1475–1489, 1983) hergestellt worden war, und das resultierende Gemisch wurde einer 20-minütigen Reaktion bei  $4^\circ\text{C}$  und danach einer 4% Acrylamidgel-Elektrophorese unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das resultierende Gel getrocknet und unter Verwendung eines BAS-2000-Bio-Imaging-Analyzers (hergestellt von Fuji Photo Film) analysiert.

**[0061]** Als Resultat trat ein proteingebundenes, doppelsträngiges Oligonucleotid als Bande (Kontrolle) mit einer langsameren Mobilität als das doppelsträngige Oligonucleotid selbst auf. Dieser Protein-DNA-Komplex verschwand, wenn ein doppelsträngiges Oligonucleotid mit derselben Sequenz ohne  $^{32}\text{P}$ -Markierung (nicht-markierte Sequenz ID NO: 1 oder 3) in einer 100fach größeren Menge als die der  $^{32}\text{P}$ -markierten Verbindung zugesetzt wurde, verschwand aber nicht durch Zusatz einer 100-mal größeren Menge eines Oligonucleotids, in dem die E2F-Protein-Bindungssequenz verschoben worden war (Sequenz ID NO: 4), so dass daraus geschlossen werden kann, dass dieser Komplex ein Komplex eines Proteins ist, der in spezifischer Weise an die E2F-Protein-Bindungssequenz bindet, nämlich das E2F-Protein und das doppelsträngige Oligonucleotid.

**[0062]** Auf der Basis der obigen Resultate kann davon ausgegangen werden, dass die erfindungsgemäße Verbindung eine Inhibierung der Expression von mit Wachstum in Verbindung stehenden Genen, die durch E2F reguliert werden, durch ihre Funktion, eine sequenzspezifische kompetitive Inhibierung der Bindung des E2F-Proteins an die Transkriptionsregion bei niedriger Konzentration einzugehen, induziert, wodurch sie ihre Wirkung, das Wachstum von Krebszellen zu inhibieren, die stärker ist als die des Antisense-Oligonucleotids, ausübt.

#### Herstellungsbeispiel 1:

##### Injektions-Präparation

erfindungsgemäße Verbindung	5 mg
destilliertes Wasser zu Injektionszwecken	<u>Rest</u>
pro Ampulle	5 ml

**[0063]** Nach einem üblichen Verfahren wurde unter Verwendung der obigen Formulierung ein Injektionspräparat hergestellt.

#### Herstellungsbeispiel 2:

##### Suppositorien-Präparation

erfindungsgemäße Verbindung	20 mg
Witepsol W-35 (Handelsbezeichnung, hergestellt von Dynamite Novel)	1380 mg
pro Stück	<u>1400 mg</u>

**[0064]** Nach einem üblichen Verfahren wurde unter Verwendung der obigen Formulierung ein Suppositorien-Präparat hergestellt.

### INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

**[0065]** Da das doppelsträngige Oligonucleotid der vorliegenden Erfindung oder ein Derivat davon die Expression von mit Wachstum in Verbindung stehenden Genen, die durch E2F reguliert sind, durch seine Funktion, eine sequenzspezifische kompetitive Inhibierung der Bindung von E2F-Protein an die Transkriptionsregion bei niedriger Konzentration einzugehen, inhibieren kann, kann es das Wachstum von Tumoren inhibieren und ist daher als Mittel mit geringen Nebenwirkungen zur Verwendung bei der Prävention und Behandlung von Krebs einsetzbar.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.
- (B) STRASSE: 27, Kandanishikicho 1-chome, Chiyoda-ku
- (C) ORT: Tokio
- (E) LAND: Japan
- (F) POSTLEITZAHL: 101

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: DOPPELSTRÄNGIGES OLIGO-NUCLEOTID UND MITTEL GEGEN KREBS, DAS DASSELBE ALS AKTIVES INGREDIENS ENTHÄLT

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: EP 95 938 023.9

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: beides

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

TTTGGCGCTT TCGCGCTTTC CCGC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: beides

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CGGCCACAAT TTCGCGCCAA ACTTGACCGC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: beides

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(iv) ANTISENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCTTTCCCGC CAAATTTTCGC GCGAAAGC

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGTGTCTCGG TCTCTCCGTC TCTC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(iv) ANTISENSE: ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AAGGCCATGA CGCTCACGGC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GAGCACGACT GACTCCGAGC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(iv) ANTISENSE: ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AAGCTAACGT TGAGGGGCAT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: andere Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = „synthetisches Oligonucleotid“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATGCCCTCA ACGTTAGCTT

20

### Patentansprüche

1. Doppelsträngiges Oligonucleotid, das 15 bis 40 Basenpaare umfasst, wobei mindestens eine Seite der Stränge wenigstens eine Nucleotidsequenz enthält, welche durch 5'-TTTSSCGS-3' dargestellt wird, worin S für G oder C steht, und wobei die Basenpaare eine Nucleotidsequenz haben, die durch 5'-(TTTSSCGS)<sub>n</sub>-3', worin n 2 bis 5 ist, dargestellt wird, an einer Seite der Stränge haben, und wobei das doppelsträngige Oligonucleotid ein Phosphodiestergrundgerüst, ein Methylphosphatgrundgerüst oder ein Phosphorothioatgrundgerüst hat.

2. Doppelsträngiges Oligonucleotid nach Anspruch 1, wobei n 2 bis 4 ist.

3. Doppelsträngiges Oligonucleotid nach Anspruch 1, das die Nucleotidsequenz

5'-TTTGGCGCTT TCGCGCTTTC CCGC-3',  
wie sie in Sequence ID No. 1 dargestellt ist, hat.

4. Doppelsträngiges Oligonucleotid nach Anspruch 1, das in einer Hantelform vorliegt.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktives Ingrediens wenigstens eines der in den Ansprüchen 1 bis 4 beschriebenen Oligonucleotide umfasst.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, die ein präventives und therapeutisches Mittel gegen Krebs ist.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6 zur Verwendung in einem Verfahren zur Prävention und Behandlung von Krebs.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

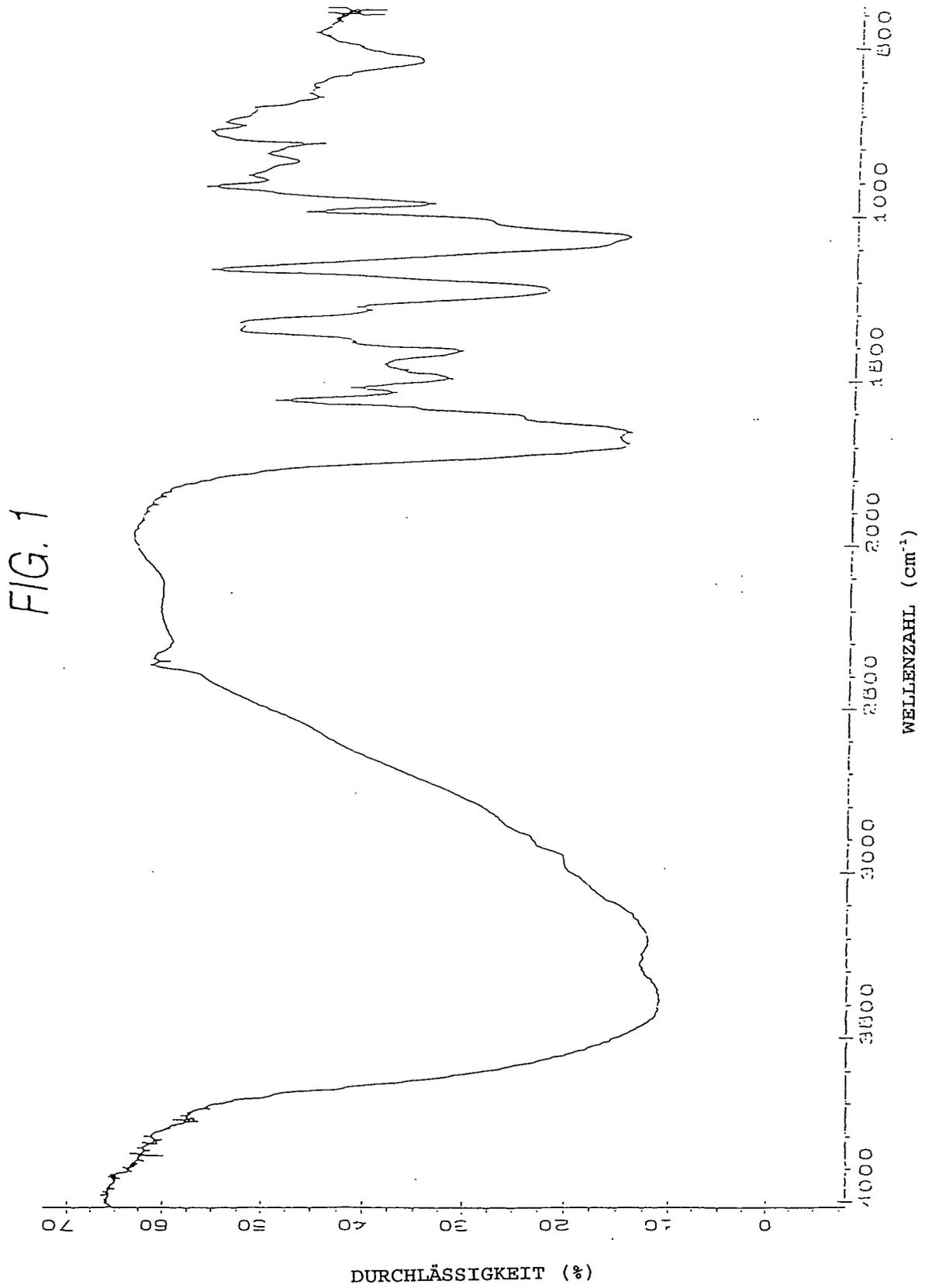
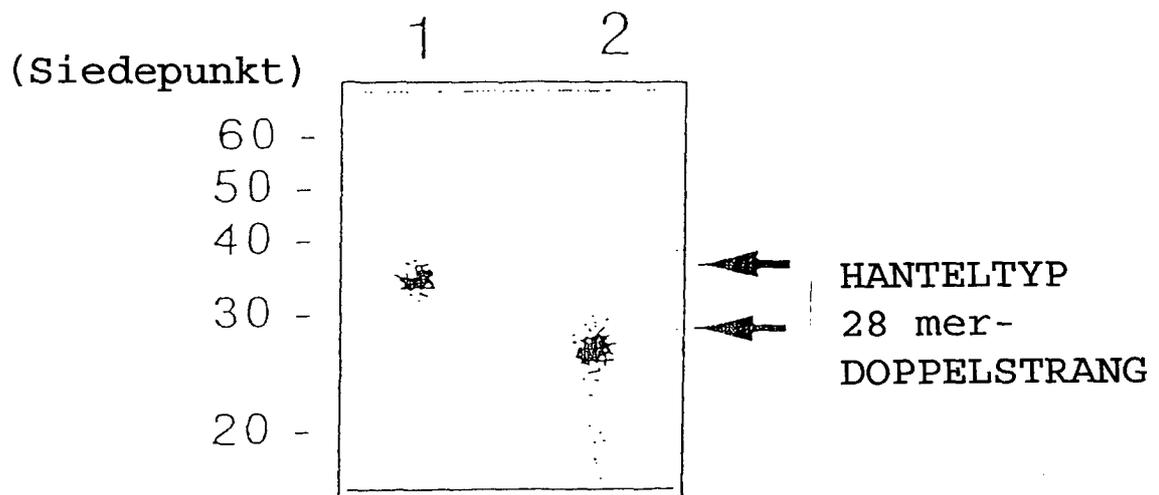


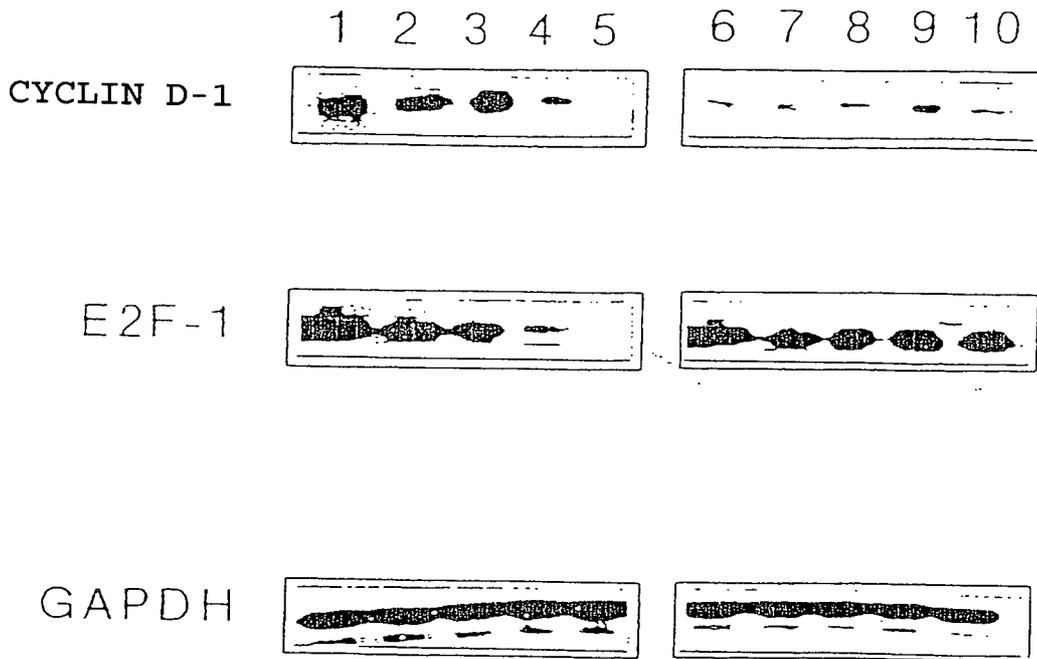
FIG. 2



1 HANTELTYP - MUNGBOHNENNUCLEASE

2 HANTELTYP + MUNGBOHNENNUCLEASE

FIG. 3



- 1. KONTROLLE
- 2. LIPOFECTIN
- 3. HANTELTYP 10 nM
- 4. 30 nM
- 5. 100 nM
- 6. KONTROLLE
- 7. LIPOFECTIN
- 8. SEQUENZ ID NO: 1 1 nM
- 9. 3 nM
- 10. 10 nM

FIG. 4

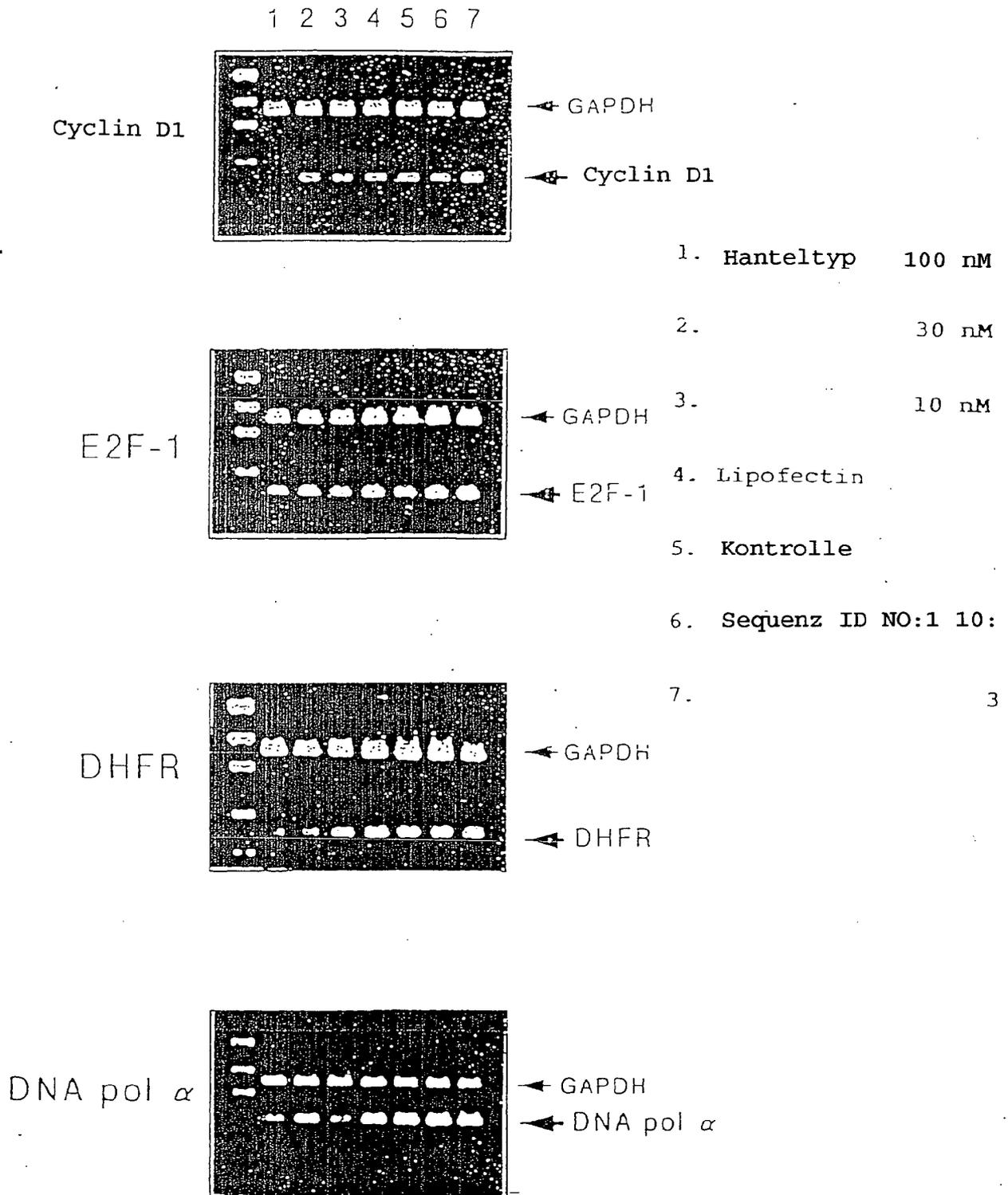
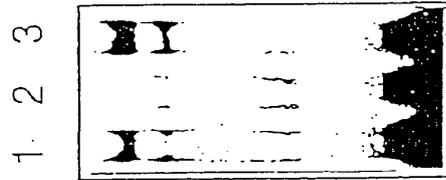
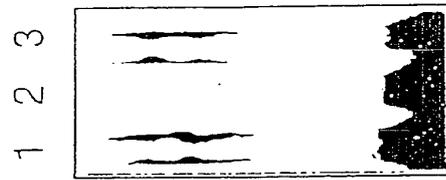


FIG. 5

Hanteltyp

SEQUENZ ID NO: 1



DNA-E2F-Komplex

DNA-E2F-Komplex

nicht-kombinierte DNA

nicht-kombinierte DNA

- |   |                                    |   |                                    |
|---|------------------------------------|---|------------------------------------|
| 1 | Kontrolle                          | 1 | Kontrolle                          |
| 2 | + nicht-markierte Sequenz ID NO: 1 | 2 | + nicht-markierte Sequenz ID NO: 3 |
| 2 | + nicht-markierte Sequenz ID NO: 4 | 3 | + nicht-markierte Sequenz ID NO: 4 |