



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 20 481 T2** 2004.02.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 928 335 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 20 481.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/16017**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 941 505.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/011211**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.07.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/11**
A61K 31/70, C07H 21/04

(30) Unionspriorität:
711568 10.09.1996 US

(73) Patentinhaber:
Hybridon, Inc., Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman Vossius, Dr. Martin Grund, Dr. Georg Schnappauf, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:
AGRAWAL, Sudhir, Shrewsbury, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR VERWENDUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN MIT MODIFIZIERTEN CPG DINUKLEOSIDEN**

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 bezieht sich auf modifizierte Oligonukleotide, die nützlich für Genexpressionsstudien und für den therapeutischen Antisense-Ansatz sind.

Zusammenfassung des verwandten Fachgebiets

[0002] Das Potential zur Verwendung von Oligonukleotiden als Inhibitoren der spezifischen Genexpression in einem therapeutischen Antisense-Ansatz wurde zum ersten Mal in drei Artikeln, die 1977 und 1978 veröffentlicht wurden, nahe gelegt. Paterson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4370–4377 (1977) offenbaren, dass die zellfreie Translation von mRNA durch Bindung eines komplementären Oligonukleotids an die mRNA inhibiert werden kann. Zamecnik und Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 280–284 und 285–288 (1978), offenbaren, dass ein synthetisches 13-mer-Oligonukleotid, das komplementär zu einem Teil des Rous-Sarkomavirus (RSV)-Genoms ist, die RSV-Replikation in infizierten Zellkulturen inhibieren kann und die RSV-vermittelte Transformation von primären Küken-Fibroblasten in maligne Sarkomazellen inhibieren kann.

[0003] Seit diesen frühen Studien wurde die Fähigkeit von Antisense-Oligonukleotiden, die Virus-Vermehrung zu inhibieren, fest etabliert. Die US-PS 4,806,463 lehrt, dass die Vermehrung des humanen Immundefizienzvirus inhibiert werden kann durch Oligonukleotide, die komplementär zu einer der verschiedenen Regionen des HIV-Genoms sind. Die US-PS 5,194,428 beschreibt die Inhibierung der Influenzavirus-Replikation durch Phosphorothioat-Oligonukleotide, die komplementär zu dem Influenzavirus Polymerase 1-Gen sind. Agrawal, Trends in Biotechnology 10: 152–158 (1992), bespricht die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden als antivirale Mittel.

[0004] Antisense-Oligonukleotide wurden auch als anti-parasitische Mittel entwickelt. Die PCT-Veröffentlichung WO 93/13740 offenbart die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden zur Inhibierung der Vermehrung von medikamentenresistenten Malaria-Parasiten. Tao et al., Antisense Research and Development 5: 123–129 (1995), lehren die Inhibierung der Vermehrung von Schistosoma-Parasiten durch Antisense-Oligonukleotide.

[0005] Kürzlich erwiesen sich Antisense-Oligonukleotide vielversprechend als Kandidaten zur therapeutischen Anwendung für Krankheiten, die aus der Expression zellulärer Gene resultieren. Die PCT-Veröffentlichung WO 95/09236 offenbart die Aushebung von beta-Amyloid-induzierten neuronalen Zelllinien-morphologischen Abnormalitäten durch Oligonukleotide, die beta-Amyloid-Expression inhibieren. Die

PCT-Veröffentlichung WO 94/26887 offenbart den Rückgang von abnormalem Spleißen eines Globin-Gentranskripts durch Oligonukleotide, die komplementär zu bestimmten Teilen dieses Transkripts sind. Die PCT-Anmeldung PCT/US94/13685 offenbart die Inhibierung von Tumorigenität durch Oligonukleotide, die komplementär zu dem Gen sind, das DNA-Methyltransferase kodiert.

[0006] Die Entwicklung verschiedener Antisense-Oligonukleotide als therapeutische und diagnostische Mittel wurde kürzlich von Agrawal und Iyer, Current Opinion in Biotechnology 6: 12–19 (1995) besprochen.

[0007] Da das Interesse an dem therapeutischen Antisense-Ansatz gewachsen ist, wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, um die pharmakologischen Eigenschaften von Oligonukleotiden durch Modifikation des Zuckerphosphat-Rückgrats zu verbessern. Die US-PS 5,149,797 beschreibt chimäre Oligonukleotide, die eine Phosphorothioat-Kernregion zwischen Methylphosphonat oder Phosphoramidat-flankierenden Regionen besitzen. Die PCT-Veröffentlichung WO 94/02498 offenbart Hybrid-Oligonukleotide, die 2'-O-substituierte Ribonukleotide haben, die eine DNA-Kernregion flankieren.

[0008] Zur Zeit wird viel über die pharmakodynamischen Eigenschaften von Oligonukleotiden entdeckt. Agrawal et al., Clinical Pharmacokinetics 28: 7–16 (1995) und Zhang et al., Clinical Pharmacology and Therapeutics 58: 44–53 (1995), offenbaren die Pharmakokinetik von anti-HIV-Oligonukleotiden in humanen Patienten. Einige dieser neuen Entdeckungen haben zu neuen Herausforderungen geführt, die zur Optimierung von Oligonukleotiden als therapeutische Mittel überwunden werden müssen. Zum Beispiel offenbaren Kniep et al., Nature 374: 546–549 (1995), dass Oligonukleotide, die das CG-Dinukleotid flankiert von bestimmten andere Sequenzen enthalten, eine mitogene Wirkung haben. Wir haben entdeckt, dass viele Nebenwirkungen, die durch Phosphorothioat-Oligonukleotide erzeugt werden, eine Konsequenz der Phosphorothioat-verknüpften CpG-Dinukleotide sind. Es besteht daher ein Bedarf an modifizierten Oligonukleotiden, die Genexpressions-inhibierende Eigenschaften beibehalten, während sie weniger Nebenwirkungen als konventionelle Phosphorothioat-Oligonukleotide erzeugen.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die Erfindung betrifft modifizierte Oligonukleotide, die nützlich für Studien der Genexpression und für den therapeutischen Antisense-Ansatz sind. Die Erfindung stellt modifizierte Oligonukleotide zur Verfügung, die die Genexpression inhibieren und weniger Nebenwirkungen als konventionelle Phosphorothioat-Oligonukleotide erzeugen. Insbesondere stellt die Erfindung Verfahren zur Verwendung von CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleoti-

den zur Verfügung, zur Modulation von Genexpression mit reduzierter Splenomegalie und reduzierter Depletion von Blutplättchen im Verhältnis zu konventionellen CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotiden.

[0010] In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide und Zusammensetzungen zur Verfügung, die von Bedeutung sind für die Inhibierung spezifischer Genexpression mit reduzierten Nebenwirkungen. Diese Inhibierung der Genexpression kann als eine Alternative zur Mutantenanalyse zur Bestimmung der biologischen Funktion von spezifischen Genen in Zell- oder Tiermodellen verwendet werden. Diese Inhibierung der Genexpression kann auch zur therapeutischen Behandlung von Krankheiten verwendet werden, die durch Expression von Genen eines Virus oder eines Pathogens verursacht werden oder durch die unangebrachte Expression von zellulären Genen. Insbesondere stellt die Erfindung eine Zusammensetzung zur Inhibierung spezifischer Genexpression mit reduzierten Nebenwirkungen zur Verfügung, wobei die Zusammensetzung ein modifiziertes CpG-enthaltendes Phosphorothioat-Oligonukleotid umfasst, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder zu einem Gen für das Inhibierung der Expression gewünscht wird oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wurde, ist; wobei alle CpG-Dinukleoside, die in dem Oligonukleotid vorkommen, modifiziert sind, und wobei ein CpG-Dinukleosid modifiziert ist, so dass es verglichen mit dem Oligonukleotid eine reduzierte Fähigkeit besitzt, Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion auszulösen, wenn es einem Säuger verabreicht wird, im Verhältnis zu einem ansonsten identischen Oligonukleotid, das ein unmodifiziertes Phosphorothioat-CpG-Dinukleosid besitzt.

[0011] In einem zweiten Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung von einem modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid zur Verfügung, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder zu einem Gen für das Inhibierung einer Expression gewünscht wird oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wurde, ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Modulation der Genexpression in einem Säuger mit reduzierten Nebenwirkungen, wobei das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen ist, das exprimiert wird und wobei die reduzierten Nebenwirkungen reduzierte Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion einschließen, im Verhältnis zu einem ansonsten identischen unmodifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid und wobei alle CpG-Dinukleoside, die in dem Oligonukleotid vorkommen, modifiziert sind. In der Verwendung gemäß diesem Aspekt der Erfindung wird die Zusammensetzung gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung einem Säuger verabreicht, wobei das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen ist, das in dem Säuger exprimiert wird.

[0012] In einem dritten Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung von einem modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid zur Verfügung, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder zu einem Gen für das Inhibierung der Expression gewünscht wird oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wurde, ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur therapeutischen Behandlung einer Krankheit, die durch abnormale Genexpression verursacht wird, mit reduzierten Nebenwirkungen, wobei das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen ist, das abnormal exprimiert wird, wobei diese abnormale Expression die Krankheit verursacht und wobei die reduzierten Nebenwirkungen reduzierte Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion einschließen, im Verhältnis zu einem ansonsten identischen unmodifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid und wobei alle CpG-Dinukleoside, die in dem Oligonukleotid vorkommen, modifiziert sind. In diesem Zusammenhang bedeutet abnormale Genexpression die Expression eines Gens, das für die Vermehrung eines Virus oder eines prokaryotischen oder eukaryotischen Pathogens benötigt wird, in einem Wirtsorganismus oder unangebrachte Expression eines zellulären Gens des Wirts. Unangebrachte zelluläre Genexpression des Wirts schließt die Expression eines mutierten Allels eines zellulären Gens oder Unterexpression oder Überexpression eines normalen Allels eines zellulären Gens ein, so dass die Krankheit aus dieser unangebrachten zellulären Genexpression des Wirts resultiert.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0013] **Fig. 1** zeigt die Ergebnisse von Blutplättchenzählungen von CD1-Mäusen, denen intraperitoneal Saline, konventionelles Phosphorothioat-Oligonukleotid (**91**), Methylphosphonatmodifiziertes CpG-Oligonukleotid (**255**), invertiertes CpG-Oligonukleotid (**256**) und 5-MethylC-CpG-Oligonukleotid (**257**) verabreicht wurde.

[0014] **Fig. 2** zeigt die Ergebnisse von Milzgewichtsuntersuchungen von CD1-Mäusen, denen intraperitoneal Saline, konventionelles Phosphorothioat-Oligonukleotid (**91**), Methylphosphonatmodifiziertes CpG-Oligonukleotid (**255**), invertiertes CpG-Oligonukleotid (**256**) und 5-MethylC-CpG-Oligonukleotid (**257**) verabreicht wurde.

[0015] **Fig. 3** zeigt die Ergebnisse der Analyse der Plättchenzählungen (Feld A), die ALT-Spiegel (Feld B) und die AST-Spiegel (Feld C) von Fisher-Ratten, denen intraperitoneal Saline, konventionelles Phosphorothioat-Oligonukleotid (**1**), invertiertes CpG-Oligonukleotid (**2**), invertiertes CpG-Oligonukleotid (**3**), 5-MethylC-CpG-Oligonukleotid (**4**), Methylphosphonatmodifiziertes CpG-Oligonukleotid (**5**), 2'-O-substituiertes CpG-Oligonukleotid (**6**) verabreicht wurde.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0016] Die Erfindung betrifft modifizierte Oligonukleotide, die nützlich für Studien der Genexpression und für den therapeutischen Antisense-Ansatz sind. Alle US-Patente, Patentveröffentlichungen und wissenschaftliche Literatur, die in dieser Beschreibung zitiert werden, zeigen den Wissensspiegel auf diesem Gebiet und werden hiermit durch Referenz eingeschlossen.

[0017] Die Erfindung stellt modifizierte Oligonukleotide zur Verfügung, die Genexpression inhibieren und die weniger Nebenwirkungen als konventionelle Phosphorothioat-Oligonukleotide erzeugen. Insbesondere stellt die Erfindung modifizierte CpG-enthaltende Oligonukleotide zur Verfügung, die in reduzierter Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion resultieren, wenn sie an einen Säuger verabreicht werden, im Verhältnis zu konventionellen CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotiden. Die Erfindung stellt weiterhin Verwendungen von solchen Oligonukleotiden zur Verfügung, zur Modulation der Genexpression in vivo, einschließlich der therapeutischen Behandlung von Krankheiten, die durch unangebrachte Genexpression ausgelöst werden.

[0018] In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung modifizierte CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide und Zusammensetzungen zur Verfügung, die von Bedeutung für die Inhibierung spezifischer Genexpression mit reduzierten Nebenwirkungen sind. Diese Inhibierung der Genexpression kann als eine Alternative zur Mutantenanalyse verwendet werden, zur Bestimmung der biologischen Funktion von spezifischen Genen in Zell- oder Tiermodellen. Diese Inhibierung der Genexpression kann auch zur therapeutischen Behandlung von Krankheiten verwendet werden, die durch Expression der Gene eines Virus oder eines Pathogens oder durch unangebrachte Expression von zellulären Genen verursacht werden. Insbesondere stellt die Erfindung eine Zusammensetzung zur Inhibierung spezifischer Genexpression mit reduzierten Nebenwirkungen zur Verfügung, wobei die Zusammensetzung ein modifiziertes CpG-enthaltendes Phosphorothioat-Oligonukleotid umfasst, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder zu einem Gen, für das Inhibierung der Expression gewünscht wird oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wurde, ist, wobei die reduzierten Nebenwirkungen reduzierte Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion einschließen, im Vergleich zu einem ansonsten identischen unmodifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid und wobei alle CpG-Dinukleoside, die in den Oligonukleotiden vorkommen, modifiziert sind. Das CpG-Dinukleosid ist 5'-CpG-3', d. h. in der 5'- zu 3'-Orientierung ist ein C-Nukleosid kovalent an ein G-Nukleosid durch eine Internukleosid-Verbindung gebunden. Für die erfindungsgemäßen Zwecke gilt ein CpG-Dinukleosid als "unmodifiziert", wenn die Internukleosid-Verbindung eine raze-

mische Phosphorothioat-Verbindung ist und die 5'-Position des C-Nukleosids mit einem Wasserstoffatom besetzt ist. Für die erfindungsgemäßen Zwecke ist ein CpG-Dinukleosid "modifiziert", wenn es von dem unmodifizierten CpG-Dinukleosid abweicht, so dass es auf das Oligonukleotid eine reduzierte Fähigkeit Splenomegalie oder Blutplättchen-Depletion zu verursachen überträgt, wenn es einem Säuger verabreicht wird, im Verhältnis zu einem ansonsten identischen Oligonukleotid, das ein unmodifiziertes Phosphorothioat-CpG-Dinukleosid besitzt. Eine Zusammensetzung von Bedeutung für die Inhibierung spezifischer Genexpression mit reduzierten Nebenwirkungen gemäß diesem Aspekt der Erfindung umfasst ein modifiziertes CpG-enthaltendes Phosphorothioat-Oligonukleotid, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder zu einem Gen, für das Inhibierung der Expression gewünscht wird oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wurde, ist. Für die erfindungsgemäßen Zwecke schließt der Begriff Oligonukleotid Polymere von zwei oder mehr Desoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden oder 2'-Osubstituierten Ribonukleotid-Monomeren oder jede Kombination davon ein. Der Begriff Oligonukleotid umfasst auch solche Polymere, die chemisch modifizierte Basen oder Zucker haben und/oder zusätzliche Substituenten besitzen, einschließlich; ohne Einschränkung, lipophile Gruppen, interkalierende Mittel, Diamine und Adamantan. Für die erfindungsgemäßen Zwecke bezeichnet der Begriff "Phosphorothioat-Oligonukleotid" ein Oligonukleotid, das wenigstens eine Phosphorothioat-Internukleosid-Verbindung enthält, vorzugsweise von etwa 20% bis etwa 100% Phosphorothioat-Internukleosid-Verbindungen und am meisten bevorzugt von etwa 50% bis etwa 100% Phosphorothioat-Internukleosid-Verbindungen. Vorzugsweise besitzen solche Oligonukleotide von etwa 12 bis etwa 50 Nukleotide, am meisten bevorzugt von etwa 17 bis etwa 35 Nukleotide. Für die erfindungsgemäßen Zwecke bedeutet der Begriff "2'-O-substituiert" eine Substitution der 2'-Position des Pentoserestes mit einer niederen -O-Alkylgruppe, die 1-6 gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoffatome enthält oder mit einer O-Aryl- oder Allylgruppe, die 2-6 Kohlenstoffatome enthält, wobei diese Alkyl-, Aryl- oder Allylgruppe unsubstituiert oder substituiert sein kann, z. B. mit Halo-, Hydroxy-, Trifluormethyl-, Cyano-, Nitro-, Acyl-, Acyloxy-, Alkoxy-, Carboxyl-, Carbalkoxy- oder Aminogruppen; oder mit einer Hydroxy-, einer Amino- oder einer Halogruppe, aber nicht mit einer 2'-H-Gruppe. Der Begriff "komplementär" bedeutet die Fähigkeit zu besitzen, an eine genomische Region, ein Gen oder an RNA-Transkripte davon unter physiologischen Bedingungen zu hybridisieren. Diese Hybridisierung ist normalerweise das Ergebnis von basenspezifischer Wasserstoffbindung zwischen komplementären Strängen, vorzugsweise um Watson-Crick oder Hoogsteen-Basenpaare zu bilden, obwohl andere Ar-

ten der Wasserstoffbindung genauso wie Basenstapelung auch zur Hybridisierung führen kann. Praktischerweise kann solch eine Hybridisierung aus der Beobachtung spezifischer Genexpressions-Inhibierung geschlussfolgert werden. Die Gensequenz oder RNA-Transkriptsequenz, zu der die modifizierte Oligonukleotidsequenz komplementär ist, wird von der biologischen Wirkung abhängen, die modifiziert werden soll. In einigen Fällen kann die genomische Region, das Gen oder das RNA-Transkript davon von einem Virus sein. Bevorzugte Viren schließen ohne Einschränkung ein, humanes Immundefizienzvirus (Typ 1 oder 2), Influenzavirus, Herpes Simplex Virus (Typ 1 oder 2), Epstein-Barr Virus, Cytomegalovirus, respiratorischer Syncytialvirus, Influenzavirus, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus und Papillomavirus. In anderen Fällen kann die genomische Region, das Gen oder das RNA-Transkript davon von endogenen Säuger (einschließlich humaner) chromosomaler DNA sein. Bevorzugte Beispiele solcher genomischer Regionen, Gene oder RNA-Transkripte davon schließen ohne Einschränkung ein, Sequenzen die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) kodieren, beta-Amyloid, DNA-Methyltransferase, Proteinkinase A, ApoE4-Protein, p-Glykoprotein, c-MYC-Protein, BCL-2-Protein und CAPL. In noch anderen Fällen kann die genomische Region, das Gen oder das RNA-Transkript davon von einem eukaryotischen oder prokaryotischen Pathogen stammen, ohne Einschränkung einschließend, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, Schistosoma spp. und Mycobacterium tuberculosis.

[0019] Zusätzlich zu den erfindungsgemäßen modifizierten Oligonukleotiden kann die Zusammensetzung von Bedeutung für die Inhibierung der Genexpression mit reduzierten Nebenwirkungen optional einen der gut bekannten pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Verdünnungsmittel enthalten. Die Zusammensetzung von Bedeutung kann weiterhin eine oder mehrere zusätzliche erfindungsgemäße Oligonukleotide enthalten. Alternativ kann diese Zusammensetzung ein oder mehrere traditionelle Antisense-Oligonukleotide enthalten, so wie ein Oligonukleotid-Phosphorothioat, ein Hybrid-Oligonukleotid oder ein chimäres Oligonukleotid oder es kann jedes andere pharmakologisch aktive Mittel enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform gemäß diesem Aspekt der Erfindung ist das modifizierte CpG-Dinukleosid ausgewählt aus Alkylphosphonat-CpG, invertiertem CpG, 5-Methylcytosin-CpG, 2'-O-substituiertem CpG, stereospezifischem Phosphorothioat-CpG, Phosphotriester-CpG, Phosphoramidat-CpG und 2'-5'-CpG.

[0020] Ein Alkylphosphonat-CpG ist ein CpG-Dinukleosid, in dem das C-Nukleosid und das G-Nukleosid durch eine Alkylphosphonat-Internukleosid-Verbindung kovalent miteinander verbunden sind. Alkylphosphonat-CpG-enthaltende Oligonukleotide werden normalerweise unter Verwendung jedes konven-

tionellen Festphasensynthese-Protokolls hergestellt, um die CpG-enthaltenden Oligonukleotide herzustellen, mit der Ausnahme, dass das Alkylphosphonat CpG-Dinukleosid hergestellt wird unter Verwendung jedes Standardverfahrens zur Einführung von Alkylphosphonat-Internukleosid-Verbindungen in Oligonukleotide. Ein besonders bevorzugtes Verfahren für diesen Schritt ist beschrieben in Iyer et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 6: 1393-1398 (1996). Vorzugsweise ist der Alkylrest der Alkylphosphonat-Verbindung ein niedriger Alkylrest von 1-6 Kohlenstoffatomen, die optional ungesättigt und/oder gesättigt sein können. Am meisten bevorzugt ist das Alkylphosphonat-CpG ein Methylphosphonat-CpG.

[0021] Ein invertiertes CpG ist ein 5'-GpC-3'-Dinukleosid. Invertierte CpG-enthaltende Oligonukleotide werden in geeigneter Weise unter Verwendung jedes konventionellen Festphasensynthese-Protokolls zur Herstellung des Oligonukleotids hergestellt, mit der Ausnahme, dass ein G-Monomer-Synthon anstelle des C-Monomer-Synthons verwendet wird und umgekehrt.

[0022] Ein 5-Methyl-CpG ist ein CpG-Dinukleosid, in dem das C-Nukleosid an der 5 Position der Cytosin Base methyliert ist. 5-MethylCpG-enthaltende Oligonukleotide werden in geeigneter Weise hergestellt, unter Verwendung jedes konventionellen Festphasensynthese Protokolls hergestellt, um das Oligonukleotid herzustellen, mit der Ausnahme, dass ein 5-MethylC Monomer-Synthon anstelle des C-Monomer-Synthons verwendet wird.

[0023] Ein 2'-O-substituiertes CpG ist ein CpG-Dinukleosid, in dem die 2'-Position des Pentoserestes substituiert ist, das eine niedere -O-Alkylgruppe, die 1-6 gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoffatome enthält oder eine -O-Aryl- oder Allylgruppe, die 2-6 Kohlenstoffatome besitzt, wobei diese Alkyl-, Aryl- oder Allylgruppe unsubstituiert oder substituiert sein kann, z. B. mit Halo-, Hydroxy-, Trifluormethyl-, Cyano-, Nitro-, Acyl-, Acyloxy-, Alkoxy-, Carboxyl-, Carbalkoxyl- oder Aminogruppen; oder mit einer Hydroxy-, einer Amino- oder einer Halogruppe, jedoch nicht mit einer 2'-H-Gruppe. Am meisten bevorzugt ist das 2'-O-substituierte CpG, ein 2'-O-Methylcytosin-enthaltendes CpG oder ein 2'-O-Methylguanosin-enthaltendes CpG oder beides. 2'-O-substituierte CpG-enthaltende Oligonukleotide werden in geeigneter Weise hergestellt durch Verwendung jedes konventionellen Festphasen-Syntheseprotokolls zur Herstellung des Oligonukleotids, mit der Ausnahme, dass ein 2'-O-substituiertes Monomer-Synthon verwendet wird anstelle des Monomer-Synthons.

[0024] Ein Phosphotriester-CpG ist ein CpG-Dinukleosid, in dem das C-Nukleosid und das G-Nukleosid kovalent durch eine Phosphotriester-Internukleosid-Verbindung miteinander verbunden sind. Phosphotriester-CpG-enthaltende Oligonukleotide werden in geeigneter Weise hergestellt durch Verwendung jedes konventionellen Festphasen-Syntheseprotokolls zur Herstellung des CpG-enthaltenden Oli-

gonukleotids, mit der Ausnahme, dass das Phosphotriester-CpG-Dinukleosid hergestellt wird unter Verwendung jedes Standardverfahren zur Einführung von Phosphotriester-Internukleosid-Verbindungen in Oligonukleotide. Ein besonders bevorzugtes Verfahren für diesen Schritt ist beschrieben in Iyer et al., Tetrahedron Letters 37: 1539–1542 (1996). Vorzugsweise ist die Phosphotriester-Verbindung eine Methylphosphotriester-Verbindung.

[0025] Ein Phosphoramidat-CpG ist ein CpG-Dinukleosid, in dem das C-Nukleosid und das G-Nukleosid kovalent durch eine Phosphoramidat-Internukleosid-Verbindung miteinander verbunden sind. Phosphoramidat-CpG-enthaltende Oligonukleotide werden in geeigneter Weise hergestellt durch Verwendung jedes konventionellen Festphasen-Syntheseprotokolls zur Herstellung des CpG-enthaltenden Oligonukleotids, mit der Ausnahme, dass das Phosphoramidat-CpG-Dinukleosid hergestellt wird unter Verwendung jedes Standardverfahren zur Einführung von Phosphoramidat-Internukleosid-Verbindungen in Oligonukleotide. Ein besonders bevorzugtes Verfahren für diesen Schritt ist beschrieben in Iyer et al., Tetrahedron Letters 37: 1539–1542 (1996). Am stärksten bevorzugt ist die Phosphoramidat-Internukleosid-Verbindung eine primäre Phosphoramidat-Internukleosid-Verbindung.

[0026] Ein stereospezifisches Phosphorothioat-CpG ist ein CpG-Dinukleosid, in dem das C-Nukleosid und das G-Nukleosid durch eine stereospezifische Phosphorothioat-Internukleosid-Verbindung kovalent miteinander verbunden sind. Stereospezifische Phosphorothioat-CpG-enthaltende Oligonukleotide werden in geeigneter Weise hergestellt unter Verwendung jedes konventionellen Festphasen-Syntheseprotokolls zur Herstellung des CpG-enthaltenden Oligonukleotids, mit der Ausnahme, dass das Phosphoramidat-CpG-Dinukleosid hergestellt wird unter Verwendung eines Verfahrens zur Einführung von stereospezifischen Phosphorothioat-Internukleosid-Verbindungen in Oligonukleotide, bevorzugt, wie beschrieben in Iyer et al., Tetrahedron Asymmetry 6: 1051–1054 (1995).

[0027] Ein 2'-5'-CpG ist ein CpG-Dinukleosid, in dem das C-Nukleosid und das G-Nukleosid kovalent durch eine 2'-5'-Internukleosid-Verbindung miteinander verbunden sind. Die Internukleosid-Verbindung kann von jedem Typ sein und ist vorzugsweise eine Phosphorothioat- oder Phosphodiester-Verbindung. 2'-5'-CpG-enthaltende Oligonukleotide werden in geeigneter Weise hergestellt durch Verwendung jedes konventionellen Festphasen-Syntheseprotokolls zur Herstellung des CpG-enthaltenden Oligonukleotids, mit der Ausnahme, dass das 2'-5'-CpG-Dinukleosid hergestellt wird unter Verwendung eines Verfahrens zur Einführung von stereospezifischen Phosphorothioat-Internukleosid-Verbindungen in Oligonukleotide, z. B. wie beschrieben in Dougherty et al., J. Am. Chem. Soc. 114: 6254 (1992) oder Hashimoto und Switzer.

[0028] Andere Modifikationen des CpG-Dinukleosids schließen Substitutionen der Phosphorothioat-Internukleosid-Verbindung mit jeder anderen Internukleosid-Verbindung ein, einschließlich, ohne Einschränkung, Phosphorothioat, Alkylphosphonothioat, Siloxan, Carbonat, Carboxymethylester, Acetamidat, Carbamat, Thioether, Amid (PNA), verbrücktes Phosphoramidat, verbrücktes Methylenphosphonat, verbrücktes Phosphorothioat und Sulfon-Internukleosid-Verbindungen.

[0029] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen der Zusammensetzungen gemäß diesem Aspekt der Erfindung werden die Oligonukleotide als "chimäre" oder "hybride" Oligonukleotide konfiguriert, z. B. wie jeweils beschrieben in der US-PS 5,149,797 und der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 94/02498. Kurz, chimäre Oligonukleotide enthalten Oligonukleotid-Regionen mit ionischen Internukleosid-Verbindungen wie auch Oligonukleotid-Regionen mit nicht-ionischen Internukleosid-Verbindungen. Hybrid-Oligonukleotide besitzen Oligonukleotid-Regionen, die DNA enthalten, genauso wie Oligonukleotid-Regionen, die RNA oder 2'-O-substituierte RNA enthalten. Der Fachmann wird erkennen, dass die Elemente von diesen bevorzugten Ausführungsformen kombiniert werden können und dass der Erfinder solche Kombinationen in Erwägung zieht. Zum Beispiel können 2'-O-substituierte Ribonukleotid-Regionen gut von einer bis zu allen nicht-ionischen Internukleosid-Verbindungen enthalten. Alternativ können nicht-ionische Regionen von einer bis zu allen 2'-O-substituierte Ribonukleotide besitzen. Vielmehr können die erfindungsgemäßen Oligonukleotide 2'-O-substituierte oder nicht-ionische Regionen in dem Kernbereich des Oligonukleotids enthalten, flankiert durch Phosphorothioat-enthaltende DNA-Regionen oder umgekehrt und können weiterhin Kombinationen von einem oder mehreren 2'-O-substituierten Ribonukleotid-Regionen und einer oder mehreren nicht-ionischen Regionen enthalten, von denen eine oder beide durch Phosphorothioat-Regionen flankiert werden (vgl. Nucleosides & Nucleotides 14: 1031–1035 (1995) für relevante Synthesetechniken).

[0030] In einem zweiten Aspekt stellt die Erfindung eine Verwendung eines modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids zur Verfügung, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder zu einem Gen, für das Inhibierung der Expression gewünscht wird oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wurde, ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Modulation der Genexpression mit reduzierten Nebenwirkungen, wobei dieses Oligonukleotid komplementär zu einem Gen ist, das exprimiert wird, und wobei die reduzierten Nebenwirkungen reduzierte Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion einschließen, im Verhältnis zu einem ansonsten identischen unmodifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid, und wobei alle CpG-Dinukleoside, die in dem Oligonukleotid vorkommen, modifi-

ziert sind. In der Verwendung gemäß diesem erfindungsgemäßen Aspekt wird eine Zusammensetzung gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung an einen Säuger verabreicht, wobei das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen ist, das in dem Säuger exprimiert wird. Vorzugsweise kann diese Verabreichung parenteral, oral, intranasal oder intrarektal sein. Vorzugsweise wird eine Gesamtdosis der Oligonukleotide in einem Bereich von etwa 0,1 mg Oligonukleotid pro kg Körpergewicht pro Tag bis etwa 200 mg Oligonukleotid pro kg Körpergewicht pro Tag liegen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die biologische Wirkung der Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion reduziert, nachdem die Zusammensetzung verabreicht wurde, verglichen mit der gleichen Wirkung, die erhalten wird, nach Verabreichung einer ansonsten identischen Zusammensetzung, die die gleiche Menge eines ansonsten identischen Oligonukleotids enthält, mit der Ausnahme, dass dieses Oligonukleotid ein unmodifiziertes CpG-Dinukleosid anstelle des modifizierten CpG-Dinukleosids enthält. Diese bevorzugte biologische Wirkung kann verfolgt werden durch Messen der Blutplättchenspiegel vor und nach Oligonukleotid-Verabreichung. Vorzugsweise werden weniger als etwa 20%, mehr bevorzugt weniger als etwa 10% der Blutplättchen depletiert. Die biologische Wirkung kann auch durch Messung des Serumalanin-Aminotransferase- (ALT) und Serumaspartat-Aminotransferase- (AST) Spiegels nach Oligonukleotid-Verabreichung verfolgt werden. Vorzugsweise werden Serum-ALT- und AST-Spiegel weniger als 2,5-fach, mehr bevorzugt weniger als 2,0-fach steigen.

[0031] In einem dritten Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung eines modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids zur Verfügung, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder zu einem Gen, für das die Inhibierung der Expression gewünscht wird, oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wurde, ist, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur therapeutischen Behandlung einer Krankheit, die durch abnormale Genexpression verursacht wird, mit reduzierten Nebenwirkungen, wobei das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen ist, das abnormal exprimiert wird und diese abnormale Expression verursacht die Krankheit und wobei die reduzierten Nebenwirkungen reduzierte Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion einschließen, im Vergleich zu einem ansonsten identischen unmodifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid, und wobei alle CpG-Dinukleoside, die in dem Oligonukleotid vorkommen, modifiziert sind. In der Verwendung wird eine Zusammensetzung gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung an ein Individuum, das die Krankheit hat, verabreicht, wobei das Oligonukleotid komplementär zu einem Gen ist, das abnormal exprimiert wird, wobei diese abnormale Expression die Krankheit verursacht. Somit ist dies ein bevorzugtes Beispiel für eine Verwendung zur Modula-

tion der Genexpression in einem Säuger, wie vorstehend für den zweiten Aspekt der Erfindung diskutiert. In diesem Zusammenhang bedeutet abnormale Genexpression die Expression eines Gens, das für die Vermehrung eines Virus oder eines prokaryotischen oder eukaryotischen Pathogens benötigt wird in einem Wirtsorganismus oder unangebrachte Expression eines zellulären Gens des Wirts. Unangebrachte zelluläre Genexpression des Wirts schließt die Expression eines mutierten Allels eines zellulären Gens ein oder Unterexpression oder Überexpression eines normalen Allels eines zellulären Gens, so dass die Krankheit aus dieser unangebrachten zellulären Genexpression des Wirts resultiert. Vorzugsweise sollte diese Verabreichung parenteral, oral, sublingual, transdermal, topisch, intranasal oder intrarektal erfolgen. Die Verabreichung der therapeutischen Zusammensetzung kann durchgeführt werden unter Verwendung bekannter Verfahren zur Dosierung und für Zeiträume, die wirksam sind, die Symptome zu reduzieren oder die Krankheitsmerkmale zu ersetzen. Wenn systemisch verabreicht wird, wird die therapeutische Zusammensetzung vorzugsweise mit einer ausreichenden Dosis verabreicht, um einen Blutspiegel des Oligonukleotids von etwa 0,01 Mikromolar bis etwa 10 Mikromolar zu erreichen. Für lokale Verabreichung können viel geringere Konzentrationen als diese wirksam sein und viel höhere Konzentrationen können toleriert werden. Vorzugsweise wird eine Gesamtdosis des Oligonukleotids von etwa 0,1 mg Oligonukleotid pro Patient pro Tag bis zu etwa 200 mg Oligonukleotid pro kg Körpergewicht pro Tag reichen. Es kann erwünscht sein, simultan oder nacheinander eine therapeutisch wirksame Menge einer oder mehrerer der therapeutischen Zusammensetzungen der Erfindung als einen Einzelbehandlungsabschnitt an ein Individuum zu verabreichen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die biologischen Wirkungen der Splenomegalie und Blutplättchen-Depletion nach Verabreichung der entsprechenden Zusammensetzung reduziert, im Vergleich zu den gleichen Wirkungen, die erhalten werden, wenn eine ansonsten identische Zusammensetzung, die die gleiche Menge eines ansonsten identischen Oligonukleotids enthält, mit der Ausnahme, dass dieses Oligonukleotid ein unmodifiziertes CpG-Dinukleosid anstelle des modifizierten CpG-Dinukleosids enthält, verabreicht wird. Diese biologische Wirkung kann durch Messen des Blutspiegels der Blutplättchen vor und nach Oligonukleotid-Verabreichung verfolgt werden. Vorzugsweise werden weniger als etwa 20% der Blutplättchen depletiert sein, stärker bevorzugt weniger als etwa 10%. Die bevorzugte biologische Wirkung kann auch durch Messen der Serumalanin-Aminotransferase- (ALT) und Serumaspartat-Aminotransferase- (AST) Spiegel nach Oligonukleotid-Verabreichung verfolgt werden. Vorzugsweise werden Serum-ALT- und AST-Spiegel um weniger als das 2,5-fache, mehr bevorzugt um weniger als das 2,0-fache steigen.

[0032] Die nachstehenden Beispiele sollen die be-

vorzugten Ausführungsformen der Erfindung weiter darstellen und sind nicht dazu gedacht, den Rahmen der Erfindung einzuschränken.

Beispiel 1

Synthese, Deprotektion und Reinigung von Oligonukleotiden

[0033] Oligonukleotid-Phosphorothioate werden unter Verwendung eines automatisierten DNA-Synthesizers (Modell 8700, Biosearch, Bedford, MA) unter Verwendung eines Beta-Cyanoethyl-Phosphoramidit-Ansatzes in einem 10-Mikromol-Maßstab synthetisiert. Um die Phosphorothioat-Verbindungen herzustellen, wurden die intermediäre Phosphit-Verbindung, die nach jeder Kopplung erhalten wurde, unter Verwendung von 3H,1,2-Benzodithiol-3H-on-1,1-dioxid oxidiert (vgl. Beaucage, in: *Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties*, Agrawal (Hrsg.), Humana Press, Totowa, NJ, Seiten 33–62 (1993)). Ähnliche Synthesen wurden durchgeführt, um Phosphodiester-Verbindungen herzustellen, mit der Ausnahme, dass eine Standard-Oxidation durchgeführt wurde unter Verwendung von Standard-Iod-Reagenz. Die Synthese von Methylphosphonat-CpG-enthaltendem Oligonukleotid wurde auf die gleiche Weise durchgeführt, mit der Ausnahme, dass Methylphosphonat-Verbindungen unter Verwendung von Nukleosid-Methylphosphoramidit hergestellt wurden (Glen Research, Sterling, VA), gefolgt von Oxidation mit 0,1 M Iod in Tetrahydrofuran/2,6-Lutidin/Wasser (75 : 25 : 0,25) (vgl. Agrawal & Goodchild, *Tet. Lett.* 28: 3539–3542 (1987)). Deprotektion und Reinigung von Oligonukleotiden wurde gemäß Standardverfahren durchgeführt (vgl. Padmapriya et al., *Antisense Res. & Dev.* 4: 185–199 (1994)), mit Ausnahme von Oligonukleotiden, die Methylphosphonat-enthaltende Regionen enthielten. Für diese Oligonukleotide wurde das CpG-gebundene Oligonukleotid mit konzentriertem Ammoniumhydroxid 1 Stunde bei Raumtemperatur behandelt und der Überstand wurde entfernt und abgedampft, um einen blassgelben Rest zu erhalten, der dann mit einem Gemisch von Ethylendiamin/Ethanol (1 : 1 v/v) 6 Stunden bei Raumtemperatur behandelt wurde und dann wieder unter reduziertem Druck getrocknet wurde.

Beispiel 2

Reduzierte in vivo-Salenomegalie unter Verwendung modifizierter CpG-enthaltender Oligonukleotide

[0034] CD-1-Mäusen und Fischer-Ratten (Charles River Laboratories, Raleigh, NC) wurde tägliche für 7 Tage intravenös eine Dosis von 3–30 mg/kg Körpergewicht eines CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, Methylphosphonat-CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, invertierten

CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, 5-MethylC-CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, 2'-O-substituierten CpG oder Saline als Kontrolle injiziert. An Tag 8 wurden die Tiere eingeschläfert und die Milz wurde entfernt und gewogen. Tiere, die mit Methylphosphonat-CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid, invertiertem CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid, 5-MethylC-CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid oder 2'-O-substituiertem CpG behandelt wurden, zeigten eine signifikant geringere Steigerung des Milzgewichts als die, die mit CpG-enthaltenden Oligonukleotid-Phosphorothioaten behandelt wurden. Ähnliche Ergebnisse werden für Phosphotriester-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide, Phosphoramidat-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide und 2'-5'-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide erwartet.

Beispiel 3

Reduzierte in vivo-Blutalättchen-Depletion unter Verwendung modifizierter CpG-enthaltender Oligonukleotide

[0035] CD-1-Mäusen und Fischer-Ratten wurde täglich für 7 Tage eine Dosis von 3–30 mg/kg Körpergewicht eines CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, Methylphosphonat-CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, invertierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, 5-MethylC-CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, 2'-O-substituierten CpG oder Saline als Kontrolle injiziert. An Tag 8 wurde den Tieren Blut entnommen und Blutplättchenwerte wurden gemessen. Tiere, die mit Methylphosphonat-CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid, invertiertem CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid oder mit 5-MethylC-CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid behandelt wurden, zeigten signifikant weniger Depletion der Blutplättchen als diejenigen, die mit CpG-enthaltenden Oligonukleotid-Phosphorothioaten behandelt wurden. Ähnliche Ergebnisse werden für Phosphotriester-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide, Phosphoramidat-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide und 2'-5'-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide erwartet.

Beispiel 4

Reduzierter in vivo-Anstieg in Serum-ALT- und AST-Spiegeln unter Verwendung von modifizierten CpG-enthaltenden Oligonukleotiden

[0036] CD-1-Mäusen und Fischer-Ratten wurde täglich für 7 Tage eine Dosis von 3–30 mg/kg Körpergewicht eines CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, Methylphosphonat-CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, invertierten

CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, 5-MethylC-CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, 2'-O-substituierten CpG oder Saline als Kontrolle intravenös verabreicht. An Tag 8 wurde den Tieren Blut entnommen und Serum-ALT und AST-Spiegel wurden unter Verwendung eines Roche Cobas Fara-Chemie-Analysegeräts (Roche Diagnostics Systems, Branchburg, NJ) gemessen. Tiere, die mit Methylphosphonat-CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid, invertiertem CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid, 5-MethylC-CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid oder mit 2'-O-substituiertem CpG-enthaltendem Phosphorothioat-Oligonukleotid behandelt wurden, zeigten eine signifikante Reduktion in dem Anstieg von Serum-ALT und AST-Spiegeln verglichen mit denjenigen, die mit CpG-enthaltenden Oligonukleotid-Phosphorothioaten behandelt wurden. Ähnliche Ergebnisse werden für Phosphotriester-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide, Phosphoramidat-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide und 2'-5'-CpG-enthaltende Phosphorothioat-Oligonukleotide erwartet.

Patentansprüche

1. Eine Zusammensetzung zur Hemmung spezifischer Genexpression mit verminderten Nebenwirkungen, wobei die Zusammensetzung ein modifiziertes CpG-enthaltendes Phosphorothioat-Oligonukleotid umfasst, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder Gen ist, wofür Hemmung der Expression gewünscht wird, oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wird, wobei die verminderten Nebenwirkungen verminderte(n) Splenomegalie und Abbau der Blutplättchen verglichen mit einem sonst identischen, nicht modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid einschliessen, und wobei alle CpG-Dinukleoside, die im Oligonukleotid vorhanden sind, modifiziert sind.

2. Die Zusammensetzung gemäss Anspruch 1, wobei das modifizierte CpG ausgewählt ist aus Alkylphosphonat-CpG, invertiertes CpG, 2'-O-substituiertes CpG, 5-Methylcytosin-CpG, stereospezifisches Phosphorothioat-CpG, Phosphotriester-CpG, Phosphoramidat-CpG und 2'-5'-CpG.

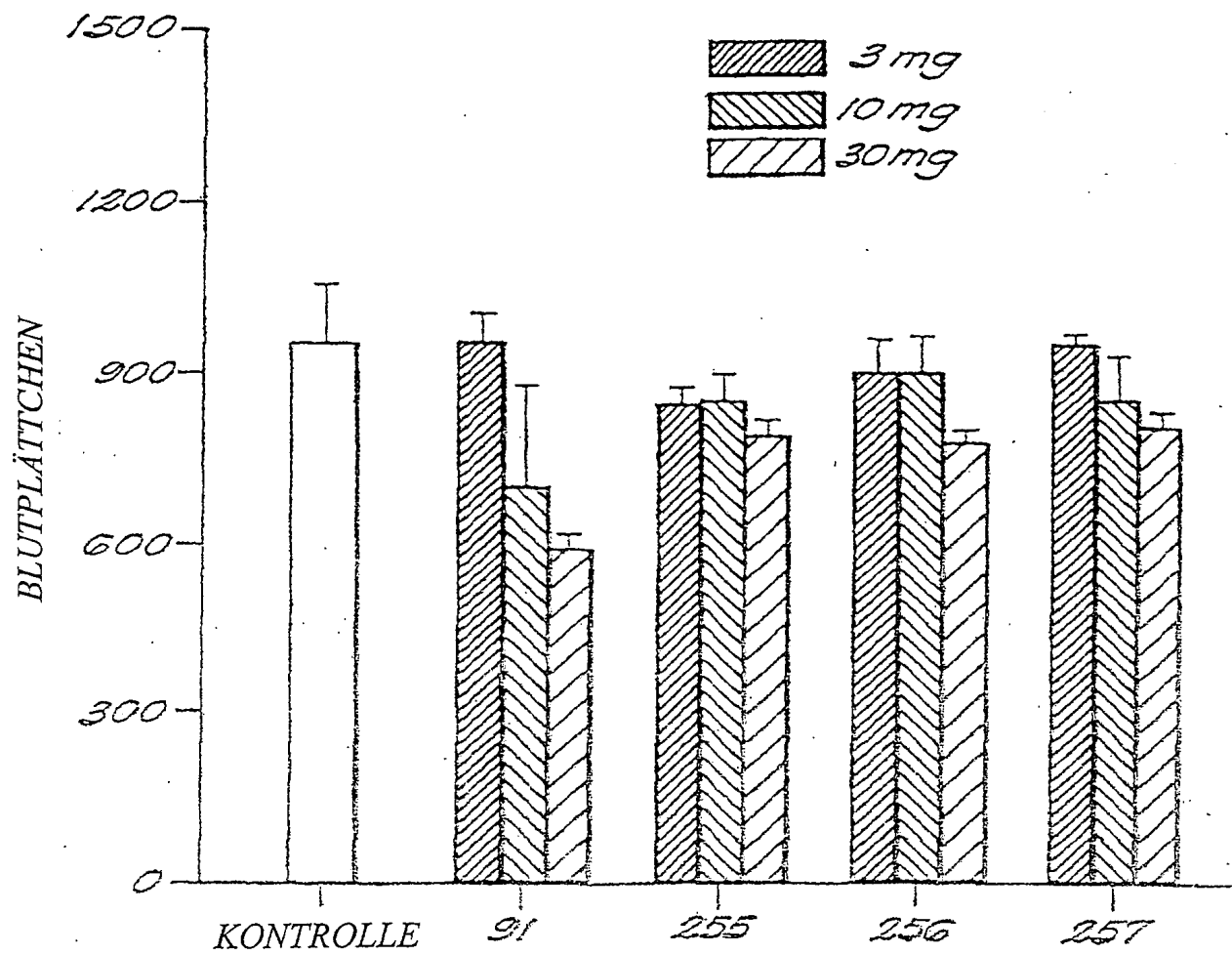
3. Die Verwendung eines modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder Gen ist, wofür Hemmung der Expression gewünscht wird, oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wird, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Veränderung der Genexpression mit verminderten Nebenwirkungen, wobei das Oligonukleotid komplementär ist zu einem Gen, das exprimiert wird, und wobei die verminderten Nebenwirkungen verminderte(n) Sple-

nomegalie und Abbau der Blutplättchen verglichen mit einem sonst identischen, nicht modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid einschliessen, und wobei alle CpG-Dinukleoside, die im Oligonukleotid vorhanden sind, modifiziert sind.

4. Die Verwendung eines modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotids, das komplementär zu einem Teil einer genomischen Region oder Gen ist, wofür Hemmung der Expression gewünscht wird, oder zu einer RNA, die von einem solchen Gen transkribiert wird, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur therapeutischen Behandlung mit verminderten Nebenwirkungen einer Krankheit, die durch fehlerhafte Genexpression verursacht wird, wobei das Oligonukleotid komplementär ist zu einem Gen, das fehlerhaft exprimiert wird und diese fehlerhafte Expression die Krankheit verursacht, und wobei die verminderten Nebenwirkungen verminderte(n) Splenomegalie und Abbau der Blutplättchen verglichen mit einem sonst identischen, nicht modifizierten CpG-enthaltenden Phosphorothioat-Oligonukleotid einschliessen, und wobei alle CpG-Dinukleoside, die im Oligonukleotid vorhanden sind, modifiziert sind.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

**FIG. 1**

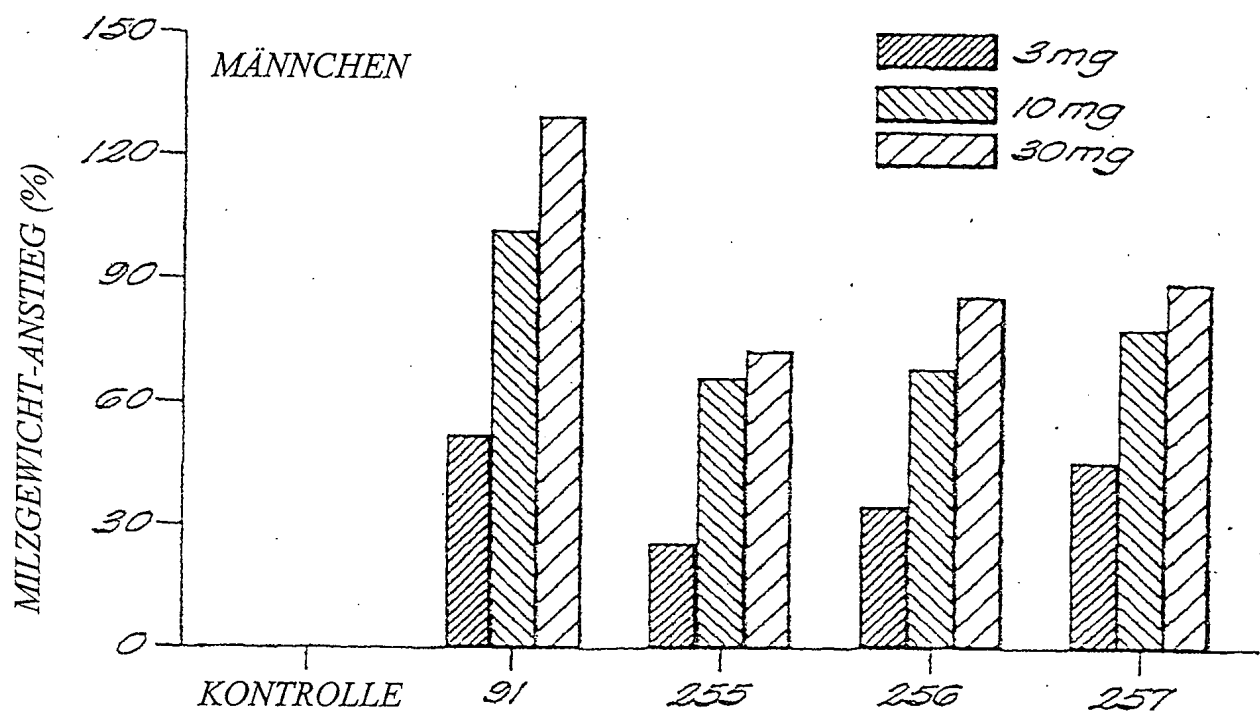
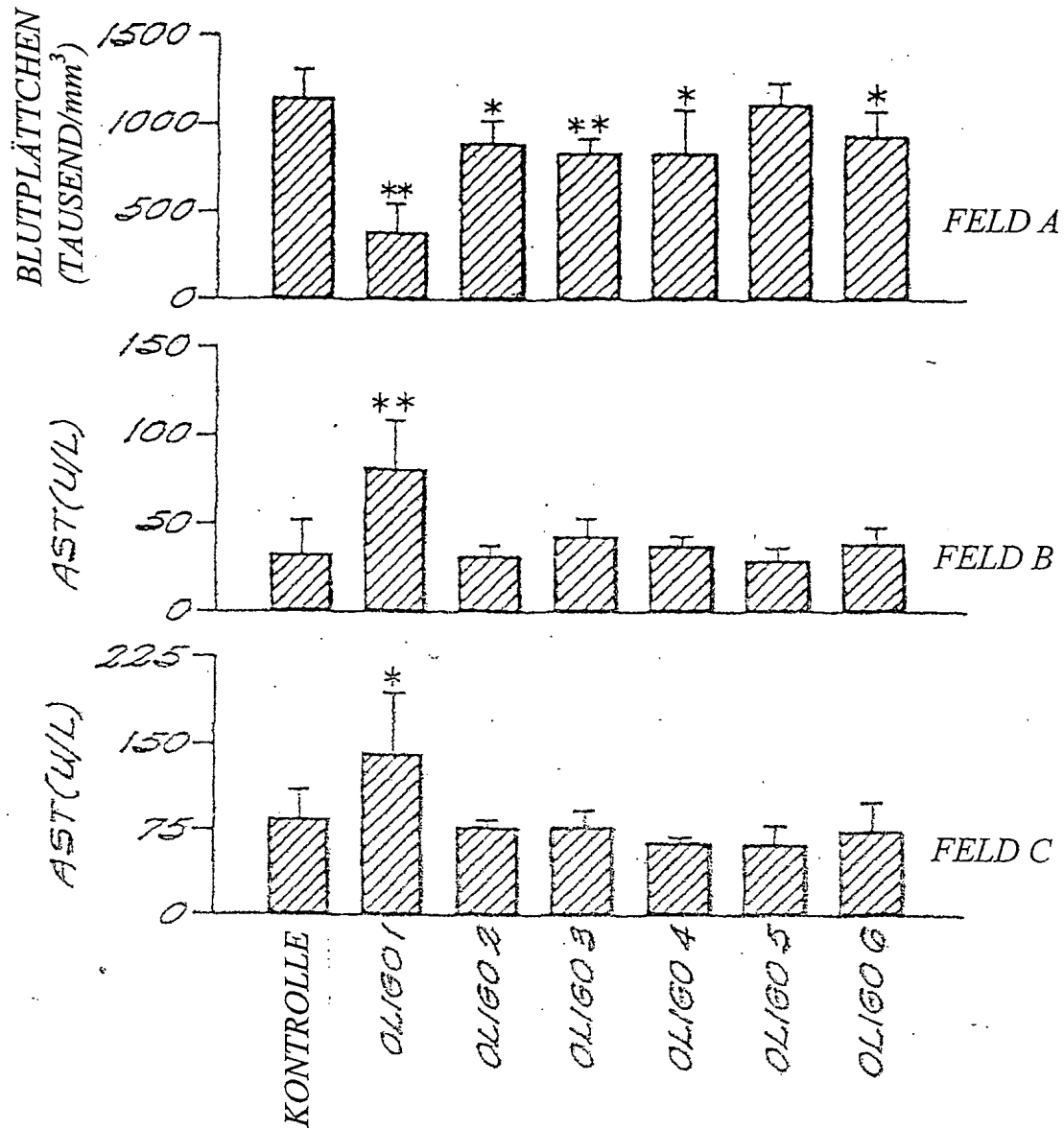


FIG. 2

**FIG. 3**