



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 32 170 T2 2008.12.18

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 252 307 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 32 170.7

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US01/02681

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 903 365.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/055370

(86) PCT-Anmeldetag: 26.01.2001

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.08.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 30.10.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 02.01.2008

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 18.12.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

178562 P 26.01.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Idera Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:

AGRAWAL, Sudhir, Shrewsbury, MA 01545, US

(74) Vertreter:

Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman Vossius, Dr. Georg Schnappauf, 81679 München

(54) Bezeichnung: MODULIERUNG DER DURCH CpG-OLIGONUKLEOTIDE VERURSACHTEN IMMUNSTIMULIERUNG DURCH POSITIONSBEDINGTE VERÄNDERUNG VON NUKLEOSIDEN

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 eingereicht, 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****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erhöhen der immunstimulatorischen Wirkung von Oligonukleotiden und solche Oligonukleotide mit einer erhöhten immunstimulatorischen Wirkung.

**Zusammenfassung des betreffenden Stands der Technik**

**[0002]** Oligonukleotide sind unentbehrliche Werkzeuge in der modernen Molekularbiologie geworden, die in einer breiten Vielfalt an Techniken, die sich von diagnostischen Untersuchungsverfahren bis PCR bis Antisense-Inhibierung von Genexpression erstrecken, verwendet werden. Diese weit verbreitete Verwendung von Oligonukleotiden hat zu einer ansteigenden Nachfrage an schnellen, kostengünstigen und effizienten Verfahren zum Synthetisieren von Oligonukleotiden geführt.

**[0003]** Die Synthese von Oligonukleotiden für Antisense- und diagnostische Anwendungen kann jetzt routinemäßig erreicht werden. Siehe z. B. Methods in Molecular Biology, Band 20: Protocols for Oligonucleotides and Analogs, S. 165–189 (S. Agrawal, Hrsg., Humana Press, 1993), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, S. 87–108 (F. Eckstein, Hrsg., 1991) und Uhlmann und Peyman, *supra*, Agrawal und Iyer, *Curr. Op. in Biotech.* 6: 12 (1995) und Antisense Research and Applications (Crooke und Lebleu, Hrsg., CRC Press, Boca Raton, 1993). Frühe synthetische Ansätze beinhalteten Phosphodiester- und Phosphotriesterchemien. Khorana et al., *J. Molec. Biol.* 72: 209 (1972), offenbaren Phosphodiesterchemie für die Oligonukleotidsynthese. Reese, *Tetrahedron Lett.* 34: 3143–3179 (1978), offenbart Phosphotriesterchemie für die Synthese von Oligonukleotiden und Polynukleotiden. Diese frühen Ansätze sind weitgehend den effizienteren Phosphoramidit- und H-Phosphonatsyntheseansätzen gewichen. Beaucage und Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859–1862 (1981), offenbaren die Verwendung von Desoxynukleosidphosphoramiditen in der Polynukleotidsynthese. Agrawal und Zamecnik, US-PS 5,149,798 (1992), offenbaren eine optimierte Synthese von Oligonukleotiden durch den H-Phosphonatansatz.

**[0004]** Beide dieser modernen Ansätze wurden verwendet, um Oligonukleotide zu synthetisieren, die eine Vielfalt an modifizierten Internukleotidbindungen aufweisen. Agrawal und Goodchild, *Tetrahedron Lett.* 28: 3539–3542 (1987), lehren die Synthese von Oligonukleotidmethylphosphonaten unter Verwendung von Phosphoramiditchemie. Connolly et al., *Biochemistry* 23: 3443 (1984), offenbaren die Synthese von Oligonukleotidphosphorothioaten unter Verwendung von Phosphoramiditchemie. Jager et al., *Biochemistry*, 27: 7237 (1988), offenbaren die Synthese von Oligonukleotidphosphoramidaten unter Verwendung von Phosphoramiditchemie. Agrawal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7079–7083 (1988), offenbaren die Synthese von Oligonukleotidphosphoramidaten und -phosphorothioaten unter Verwendung von H-Phosphonatchemie.

**[0005]** Alul und Bhan, WO 98/00564, offenbaren 2'-5'-Oligonukleotide als Mittel, eine Genexpression in einer sequenzspezifischen Art und Weise zu bestimmen.

**[0006]** Kandimalla und Agrawal, US-PS 5,886,165, offenbaren Oligonukleotide, die sowohl Desoxyribonukleotide mit 3'-5'-Internukleotidbindungen als auch Ribonukleotide mit 2'-5'-Internukleotidbindungen umfassen.

**[0007]** Kürzlich haben verschiedene Wissenschaftler die Validität des Antisense-Ansatzes zur therapeutischen Behandlung einer Erkrankung gezeigt. Crooke, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8: vii–viii, offenbart die erfolgreiche Vermarktungszulassung eines Phosphorothioatoligonukleotids zur Behandlung von humaner Cytomegalovirus-induzierter Retinitis. Unglücklicherweise ist die Verwendung von Phosphorothioatoligonukleotiden komplizierter geworden als ursprünglich erwartet. Bestimmte Wirkungen, die durch Phosphorothioatoligonukleotide hervorgerufen werden, konnten nicht durch den erwarteten Antisense-Mechanismus erklärt werden. Zum Beispiel lehren McIntyre et al., *Antisense Res. Dev.* 3: 309–322 (1993), dass ein "Sense"-Phosphorothioatoligonukleotid eine spezifische Immunstimulation hervorruft. Diese und andere Nebenwirkungen haben das Bild von Phosphorothioatoligonukleotiden verkompliziert.

**[0008]** Andererseits hat die Beobachtung, dass Phosphodiester- und Phosphorothioatoligonukleotide eine Immunstimulation induzieren können, ein Interesse verursacht, diese Nebenwirkung als therapeutisches Werkzeug zu entwickeln. Diese Anstrengungen wurden auf Phosphorothioatoligonukleotide, die das Dinukleotid CpG enthalten, fokussiert. Kuramoto et al., *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 1128–1131 (1992), lehren, dass Phosphodiesteroligonukleotide, die ein Palindrom enthalten, das ein CpG-Dinukleotid beinhaltet, die Synthese von Interferon-alpha und -gamma induzieren und die natürliche Killeraktivität verstärken können. Krieg et al., Na-

ture 371: 546–549 (1995), offenbaren, dass CpG-haltige Phosphorothioatoligonukleotide immunstimulatorisch sind. Liang et al., J. Clin. Invest. 98: 1119–1129 (1996), offenbaren, dass solche Oligonukleotide humane B-Zellen aktivieren. Moldoveanu et al., Vaccine 16: 1216–124 (1998), lehren, dass CpG-haltige Phosphorothioatoligonukleotide die Immunantwort gegen Influenzavirus erhöhen. McCluskie und Davis, The Journal of Immunology 161: 4463–4466 (1998), lehren, dass CpG-haltige Oligonukleotide als starke Adjuvantien wirken, welche die Immunantwort gegen das Hepatitis B-Oberflächenantigen erhöhen.

**[0009]** Diese Berichte verdeutlichen, dass es einen Bedarf gibt, die durch CpG-haltige Oligonukleotide ausgelöste Immunantwort zu modulieren. Idealerweise sollte solch eine Modulation das Vermindern der immunstimulatorischen Wirkung für Antisense-Anwendungen sowie das Erhöhen der immunstimulatorischen Wirkung für Immuntherapieanwendungen beinhalten.

#### KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0010]** Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Modulieren der Immunantwort, die durch CpG-haltige Oligonukleotide ausgelöst wird, bereit. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht, die immunstimulatorische Wirkung für Immuntherapieanwendungen zu erhöhen. Somit stellt die Erfindung ferner Oligonukleotide mit optimalen Graden an immunstimulatorischer Wirkung für diese Anwendungen bereit.

**[0011]** Der Erfinder hat überraschenderweise festgestellt, dass eine positionsabhängige Modifikation von CpG-haltigen Oligonukleotiden deren immunstimulatorische Fähigkeiten dramatisch beeinflusst. Insbesondere wirkt eine 3'-Alkylierung oder -Alkoxylierung von Oligonukleotiden oder ein Einbringen einer ungeladenen Internukleosidbindung bei speziellen Positionen 5' oder 3' zum CpG-Dinukleotid in einer reproduzierbaren und voraussagbaren Art und Weise entweder erhöhend oder vermindernd auf deren immunstimulatorische Wirkung.

**[0012]** In einem ersten Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zum Erhöhen der immunstimulatorischen Wirkung eines CpG-haltigen Oligonukleotids bereitgestellt. Das Verfahren gemäß diesem erfindungsgemäßen Aspekt umfasst ein Einbringen in das Oligonukleotid eines 3'-substituierten Nukleosids oder einer 2'-5'-Internukleosidbindung bei einer Position, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, das das 3'-substituierte Nukleosid oder die 2'-5'-Internukleosidbindung enthält, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 3'-Substitution oder 2'-5'-Internukleosidbindung fehlt. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen ist das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid. In bevorzugten Ausführungsformen beinhaltet dieses Verfahren ein Erzeugen einer 2'-5'-Bindung zwischen der 2'-Position eines 3'-substituierten Nukleosids und der 5'-Position eines weiteren Nukleosids, das ein oder kein 3'-substituiertes Nukleosid sein kann. In bevorzugten Ausführungsformen ist das 2'-5'-Internukleosid ein Alkylphosphonat, vorzugsweise ein Methylphosphonat.

**[0013]** In einem zweiten Aspekt wird erfindungsgemäß ein CpG-haltiges Oligonukleotid mit einer erhöhten immunstimulatorischen Wirkung bereitgestellt, wobei das Oligonukleotid ein 3'-substituiertes Nukleosid bei einer Position umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, das das 3'-substituierte Nukleosid enthält, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 3'-Substitution fehlt. In bestimmten Ausführungsformen ist das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid. In bevorzugten Ausführungsformen weist das Oligonukleotid eine Länge von etwa 6 bis etwa 50 Nukleotiden auf. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Oligonukleotid ferner modifizierte Internukleotidbindungen oder modifizierte Zucker, um die Stabilität zu verbessern. In bevorzugten Ausführungsformen beinhaltet das CpG-haltige Oligonukleotid gemäß diesem erfindungsgemäßen Aspekt eine 2'-5'-Bindung zwischen der 2'-Position eines 3'-substituierten Nukleosids und der 5'-Position eines weiteren Nukleosids, das ein oder kein 3'-substituiertes Nukleosid sein kann.

**[0014]** In einem dritten Aspekt wird erfindungsgemäß ein CpG-haltiges Oligonukleotid mit einer erhöhten immunstimulatorischen Wirkung bereitgestellt, wobei in das Oligonukleotid eine 2'-5'-Internukleosidbindung bei einer Position eingebracht wurde, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, in das eine 2'-5'-Internukleosidbindung eingebracht wurde, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 2'-5'-Internukleosidbindung fehlt. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen weist das Oligonukleotid eine Länge von etwa 6 bis etwa 50 Nukleotiden auf. In bevorzugten Ausführungsformen ist die 2'-5'-Internukleosidbindung ein Alkylphosphonat, vorzugsweise ein Methylphosphonat. In bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Oligonukleotid ferner modifizierte Zucker, um die Stabilität zu verbessern.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0015]** [Fig. 1](#) zeigt Ergebnisse eines Proliferationsassays von Mausmilzziellen in Gegenwart von keinem Oligonukleotid (C), Lipopolysaccharid (LPS) oder verschiedenen unsubstituierten oder 2'- oder 3'-substituierten Oligonukleotiden.

**[0016]** [Fig. 2](#) zeigt die Milzvergrößerung in Mäusen, denen kein Oligonukleotid oder verschiedene unsubstituierte oder 2'- oder 3'-substituierte Oligonukleotide verabreicht wurden.

**[0017]** [Fig. 3](#) zeigt Ergebnisse eines Proliferationsassays von Mausmilzziellen und zeigt die Milzvergrößerung in Mäusen, denen kein Oligonukleotid (C) oder verschiedene unsubstituierte oder Methylphosphonat-substituierte Oligonukleotide verabreicht wurden. Unterstrichene Nukleoside weisen eine Methylphosphonatbindung bei der 3'-Position auf.

#### GENAUE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0018]** Die Erfindung betrifft die therapeutische Verwendung von Oligonukleotiden sowohl im Antisense-Ansatz als auch als immunstimulatorische Mittel. Die hierin zitierten Patente und Veröffentlichungen geben den Wissensstand auf dem Gebiet wieder. Im Falle eines Konflikts zwischen einer jeglichen Lehre irgendeiner hierin zitierten Referenz und der vorliegenden Beschreibung soll sich die letztere für die Zwecke der Erfindung durchsetzen.

**[0019]** Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Modulieren der Immunantwort, die durch CpG-haltige Oligonukleotide ausgelöst wird, bereit. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht ein Erhöhen der immunstimulatorischen Wirkung für Immuntherapieanwendungen. Somit stellt die Erfindung ferner Oligonukleotide mit optimalen Graden an immunstimulatorischer Wirkung für diese Anwendungen bereit.

**[0020]** Der Erfinder hat überraschenderweise festgestellt, dass eine positionsabhängige Modifikation von CpG-haltigen Oligonukleotiden deren immunstimulatorische Fähigkeiten dramatisch beeinflusst. Insbesondere wirkt eine 3'-Alkylierung oder -Alkoxylierung der Oligonukleotide oder ein Einbringen einer ungeladenen Internukleosidbindung bei bestimmten Positionen 5' oder 3' zu dem CpG-Dinukleotid in einer reproduzierbaren und voraussagbaren Art und Weise entweder erhöhend oder vermindernd auf deren immunstimulatorische Wirkung.

**[0021]** Eine Synthese von Oligonukleotiden, die 3'-substituierte Nukleoside enthalten, wurde kürzlich von Kumar und Takaku, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9: 2515–2520 (1999), beschrieben.

**[0022]** In einem ersten Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zum Erhöhen der immunstimulatorischen Wirkung eines CpG-haltigen Oligonukleotids bereitgestellt. Das Verfahren gemäß diesem erfindungsgemäßen Aspekt umfasst ein Einbringen in das Oligonukleotid eines 3'-substituierten Nukleosids oder einer 2'-5'-Internukleosidbindung bei einer Position, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid

und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, das das 3'-substituierte Nukleosid oder die 2'-5'-Internukleosidbindung enthält, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 3'-Substitution oder 2'-5'-Internukleosidbindung fehlt. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen ist das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid. In bevorzugten Ausführungsformen beinhaltet dieses Verfahren ein Erzeugen einer 2'-5'-Bindung zwischen der 2'-Position eines 3'-substituierten Nukleosids und der 5'-Position eines weiteren Nukleosids, das ein oder kein 3'-substituiertes Nukleosid sein kann. In bevorzugten Ausführungsformen ist das 2'-5'-Internukleosid ein Alkylphosphonat, vorzugsweise ein Methylphosphonat.

**[0023]** Für die Zwecke des ersten erfindungsgemäßen Aspektes ist ein "Antisense-Oligonukleotid" ein Oligonukleotid, das exakt komplementär zu einem Gen oder einem Gentranskript ist und fähig ist, die Expression des Gens oder Gentranskripts, zu dem es exakt komplementär ist, zu vermindern.

**[0024]** Das Verfahren gemäß diesem erfindungsgemäßen Aspekt kann in geeigneter Weise unter Verwendung einer jeglichen der wohlbekannten Synthesetechniken ausgeführt werden, indem einfach das entsprechende 3'-substituierte Monomersynthon im Syntheseprozess in dem Zyklus verwendet wird, der unmittelbar auf den Einbau des CpG-Dinukleotids folgt. Bevorzugte Monomere beinhalten Phosphoramidite, Phosphotriester und H-Phosphonate. Somit bedeutet "Einbringen in das Oligonukleotid eines 3'-substituierten Nukleosids bei einer Position, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon", für die Zwecke der Erfindung einfach das Synthetisieren eines Oligonukleotids, das ein 3'-substituiertes Nukleosid bei solch einer Position oder solchen Positionen aufweist. Des Weiteren bedeutet "Einbringen in das Oligonukleotid einer 2'-5'-Internukleosidbindung bei einer Position" für die Zwecke der Erfindung einfach ein Synthetisieren eines Oligonukleotids, das eine 2'-5'-Internukleosidbindung bei solch einer Position, d. h. von dem C des CpG gezählt, aufweist, dass die ungeladene Internukleosidbindung die 3'-Bindung dieses Nukleosids ist. Die Synthese von Oligonukleotiden, die 2'-5'-Internukleosidbindungen enthalten, ist auf dem Gebiet wohlbekannt.

**[0025]** In einem zweiten Aspekt wird erfindungsgemäß ein CpG-haltiges Oligonukleotid mit einer erhöhten immunstimulatorischen Wirkung bereitgestellt, wobei das Oligonukleotid ein 3'-substituiertes Nukleosid bei einer Position umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, das das 3'-substituierte Nukleosid enthält, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 3'-Substitution fehlt. In bestimmten Ausführungsformen ist das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid. In bevorzugten Ausführungsformen beinhaltet das CpG-haltige Oligonukleotid gemäß diesem erfindungsgemäßen Aspekt eine 2'-5'-Bindung zwischen der 2'-Position eines 3'-substituierten Nukleosids und der 5'-Position eines weiteren Nukleosids, das ein oder kein 3'-substituiertes Nukleosid sein kann.

**[0026]** Bevorzugte Oligonukleotide gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt weisen eine Länge von etwa 6 bis etwa 50 Nukleotiden auf und können ferner modifizierte Internukleotidbindungen oder modifizierte Zucker umfassen, um die Stabilität, Bioverfügbarkeit oder andere klinisch relevante Merkmale zu verbessern.

**[0027]** Die Oligonukleotide gemäß dem zweiten erfindungsgemäßen Aspekt können einem Säugetier verabreicht werden, um eine Immunantwort zu induzieren.

**[0028]** Vorzugsweise sollte eine Verabreichung von Oligonukleotiden parenteral, oral, sublingual, transdermal, topisch, intranasal oder intrarektal erfolgen. Eine Verabreichung der therapeutischen Zusammensetzungen kann unter Verwendung von bekannten Verfahren bei Dosierungen und für Zeitspannen ausgeführt werden, die wirksam sind, Symptome oder Ersatzmarker der Erkrankung zu vermindern. Wenn systemisch verabreicht, wird die therapeutische Zusammensetzung vorzugsweise bei einer ausreichenden Dosierung verabreicht, um eine Blutkonzentration an Oligonukleotid von etwa 0,01 mikromolar bis etwa 10 mikromolar zu erreichen. Bei lokaler Verabreichung können viel geringere Konzentrationen als diese wirksam sein, und viel höhere Konzentrationen können toleriert werden. Vorzugsweise wird die Gesamtdosierung an Oligonukleotid von

etwa 0,1 mg Oligonukleotid pro Patient pro Tag bis etwa 200 mg Oligonukleotid pro kg Körpergewicht pro Tag reichen. Es mag erstrebenswert sein, eine therapeutisch wirksame Menge einer oder mehrerer der therapeutischen Zusammensetzungen einem Individuum simultan oder sequenziell als eine einzelne Behandlungsepisode zu verabreichen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird, nachdem die Zusammensetzung verabreicht wurde, eine oder mehrere Messungen biologischer Wirkungen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Komplementaktivierung, Mitogenese und Inhibierung der Thrombingerinnselbildung, durchgeführt.

**[0029]** In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen werden erfindungsgemäß Oligonukleotide in Kombination mit Vakzinen und/oder Adjuvanten verabreicht, um die Spezifität oder das Ausmaß der Immunantwort zu erhöhen. Entweder das Oligonukleotid oder das Vakzin oder beide können gegebenenfalls an ein immunogenes Protein, wie Napfschnecken-Hämocyanin, die Choleratoxin B-Untereinheit oder ein jegliches anderes immunogenes Trägerprotein, gekoppelt werden. Ein jegliches der Fülle an Adjuvanten kann verwendet werden, einschließlich in nicht begrenzender Weise komplettes Freund-Adjuvans. Für die Zwecke dieses Aspektes bedeutet "in Kombination mit" im Zuge der Behandlung derselben Erkrankung in demselben Patienten und beinhaltet ein Verabreichen des Oligonukleotids und/oder des Vakzins und/oder des Adjuvans in einer jeglichen Reihenfolge, einschließlich simultaner Verabreichung sowie in zeitlich getrennter Reihenfolge von bis zu einigen Tagen voneinander getrennt. Solch eine Kombinationsbehandlung kann auch mehr als eine einzige Verabreichung des Oligonukleotids und/oder unabhängig davon des Vakzins und/oder unabhängig davon des Adjuvans beinhalten. Die Verabreichung des Oligonukleotids und/oder Vakzins und/oder Adjuvans kann über denselben Weg oder verschiedene Wege erfolgen.

**[0030]** Diese Anwendung ist für Modellstudien des Immunsystems verwendbar und ist ferner für die therapeutische Behandlung von humanen oder Tiererkrankungen verwendbar.

**[0031]** In einem dritten Aspekt wird erfindungsgemäß ein CpG-haltiges Oligonukleotid mit einer erhöhten immunstimulatorischen Wirkung bereitgestellt, wobei in das Oligonukleotid eine 2'-5'-Internukleosidbindung bei einer Position eingebracht wurde, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, in das eine 2'-5'-Internukleosidbindung eingebracht wurde, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 2'-5'-Internukleosidbindung fehlt.

**[0032]** Bevorzugte Oligonukleotide gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt weisen eine Länge von etwa 6 bis etwa 50 Nukleotiden auf und können ferner modifizierte Zucker umfassen, um die Stabilität, Bioverfügbarkeit oder andere klinisch relevante Merkmale zu verbessern. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid. In bestimmten Ausführungsformen ist die 2'-5'-Internukleosidbindung ein Alkylphosphonat, vorzugsweise ein Methylphosphonat.

**[0033]** Die Oligonukleotide gemäß dem dritten erfindungsgemäßen Aspekt können einem Säugetier zum Induzieren einer Immunantwort verabreicht werden.

**[0034]** Vorzugsweise sollte eine Verabreichung von Oligonukleotiden parenteral, oral, sublingual, transdermal, topisch, intranasal oder intrarektal erfolgen. Eine Verabreichung der therapeutischen Zusammensetzungen kann unter Verwendung von bekannten Verfahren bei Dosierungen und für Zeitspannen ausgeführt werden, die wirksam sind, Symptome oder Ersatzmarker der Erkrankung zu vermindern. Wenn systemisch verabreicht, wird die therapeutische Zusammensetzung vorzugsweise bei einer ausreichenden Dosierung verabreicht, um eine Blutkonzentration an Oligonukleotid von etwa 0,01 mikromolar bis etwa 10 mikromolar zu erreichen. Bei lokaler Verabreichung können viel geringere Konzentrationen als diese wirksam sein, und viel höhere Konzentrationen können toleriert werden. Vorzugsweise wird eine Gesamtdosierung an Oligonukleotid von etwa 0,1 mg Oligonukleotid pro Patient pro Tag bis etwa 200 mg Oligonukleotid pro kg Körpergewicht pro Tag reichen. Es mag erstrebenswert sein, eine therapeutisch wirksame Menge einer oder mehrerer der therapeutischen Zusammensetzungen einem Individuum simultan oder sequenziell als eine einzige Behandlungsepisode zu verabreichen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird, nachdem die Zusammensetzung verabreicht wurde, eine oder mehrere Messungen biologischer Wirkungen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Komplementaktivierung, Mitogenese und Inhibierung der Thrombingerinnselbildung, durchgeführt.

**[0035]** In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen werden die erfindungsgemäßen Oligonukleotide in

Kombination mit Vakzinen und/oder Adjuvantien verabreicht, um die Spezifität oder das Ausmaß der Immunantwort zu erhöhen. Entweder das Oligonukleotid oder das Vakzin oder beide können gegebenenfalls an ein immunogenes Protein, wie Napfschnecken-Hämocyanin, die Choleratoxin B-Untereinheit oder ein jegliches anderes immunogenes Trägerprotein, gekoppelt werden. Ein jegliches der Fülle an Adjuvantien kann verwendet werden, einschließlich in nicht begrenzender Weise komplettes Freund-Adjuvans. Für die Zwecke dieses Aspekts bedeutet "in Kombination mit" im Zuge der Behandlung derselben Erkrankung in demselben Patienten und beinhaltet ein Verabreichen des Oligonukleotids und/oder des Vakzins und/oder des Adjuvans in einer jeglichen Reihenfolge, einschließlich simultaner Verabreichung sowie in zeitlich getrennter Reihenfolge von bis zu mehreren Tagen voneinander getrennt. Solch eine Kombinationsbehandlung kann auch mehr als eine einzige Verabreichung des Oligonukleotids und/oder unabhängig davon des Vakzins und/oder unabhängig davon des Adjuvans beinhalten. Die Verabreichung des Oligonukleotids und/oder Vakzins und/oder Adjuvans kann über denselben Weg oder verschiedene Wege erfolgen.

**[0036]** Für die Zwecke aller erfindungsgemäßen Aspekte beinhaltet der Begriff "Oligonukleotid" Polymere von zwei oder mehr Desoxyribonukleotiden oder einem jeglichen modifizierten Nukleosid, einschließlich 2'-Halogen-Nukleoside, 2'- oder 3'-substituiert, 2'- oder 3'-O-substituierte Ribonukleoside, Deazanukleoside oder einer jeglichen Kombination davon. Solche Monomere können durch eine jegliche der zahlreichen bekannten Internukleosidbindungen aneinander gekoppelt werden. In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen können diese Internukleosidbindungen Phosphodiester-, Phosphotriester-, Phosphorothioat- oder Phosphoramidatbindungen, 2'-5'-Bindungen eines jeglichen der vorher genannten oder Kombinationen davon sein. Der Begriff Oligonukleotid umfasst auch solche Polymere mit chemisch modifizierten Basen oder Zuckern und/oder mit zusätzlichen Substituenten, einschließlich in nicht begrenzender Weise lipophiler Gruppen, interkalierender Mittel, Diamine und Adamantan. Der Begriff Oligonukleotid umfasst auch PNA, LNA und Oligonukleotide, die Rückgrate oder Rückgratabschnitte aus Nicht-Pentosezucker (z. B. Hexose) umfassen. Für die Zwecke der Erfindung bedeutet der Begriff "3'-O-substituiert" eine Substitution der 3'-Position des Pentoserestes mit einem Halogenatom (vorzugsweise Cl, Br oder F) oder einer -O-Niederalkylgruppe mit 1-6 gesättigten oder ungesättigten Kohlenstoffatomen oder mit einer -O-Aryl- oder Allylgruppe mit 2-6 Kohlenstoffatomen, wobei solch eine Alkyl-, Aryl- oder Allylgruppe unsubstituiert oder z. B. mit Halogen-, Hydroxy-, Trifluormethyl-, Cyan-, Nitro-, Acyl-, Acyloxy-, Alkoxy-, Carboxyl-, Carbalkoxyl- oder Aminogruppen substituiert sein kann, oder solch eine 3'-Substitution kann mit einer Hydroxygruppe (um ein Ribonukleosid herzustellen), einer Amino- oder einer Halogengruppe erfolgen. Für die Zwecke aller erfindungsgemäßen Aspekte bedeuten die Begriffe "CpG" oder "CpG-Dinukleotid" das Dinukleotid 5'-Cytidin-Guanidin-3', wobei p eine Internukleotidbindung ist und wobei das Zuckerrückgrat des Dinukleotids Ribose, Desoxyribose oder eine 3'-substituierte Ribose oder Kombinationen davon sein kann. In bevorzugten Ausführungsformen der drei erfindungsgemäßen Aspekte wird p aus Phosphodiester, Phosphorothioat und Phosphordithioat ausgewählt.

**[0037]** Die nachstehenden Beispiele sollen bestimmte bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsformen weiter veranschaulichen und sollen nicht den Umfang der Erfindung einschränken.

#### Beispiel 1

Herstellung von Oligonukleotiden, die lagespezifische 3'-O-Methylribonukleoside enthalten

**[0038]** Oligonukleotide wurden unter Verwendung von Festphasenphosphoramiditchemie (1  $\mu$ mol-Maßstab) auf einem automatisierten DNA-Synthesegerät (Expedite 8909, PE Biosystems, MA) synthetisiert. Das 3'-O-Methylribonukleosidphosphorothioat-Segment wurde in das Oligonukleotid unter Verwendung von 3'-O-Methyl-2'-cyanethylribonukleosidphosphoramiditen (ChemGenes, MA) eingebaut. Ein Oligonukleotid wurde unter Verwendung von 3H-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid sulfuriert. Oligonukleotide wurden mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt und mittels CGE (Datenprozessierung durch PE Nelson Turbochrom-Software) und MALDI-TOF-Massenanalyse (Bruker Profex III-Massenspektrometer) charakterisiert.

#### Beispiel 2

Modulation der immunstimulatorischen Wirkung in vitro: 3'-Substitutionen

**[0039]** Um die immunstimulatorische Aktivität von Oligonukleotiden in der vorliegenden Studie zu bestimmen, haben wir einen Mausmilzzenproliferationsassay, wie in Beispiel 1 beschrieben, verwendet. Die in Tabelle 1 gezeigten Oligos wurden für diese Studien verwendet.

Tabelle 1

Oligo Nr.	Sequenz und Modifikation
1	<b>TCCATGACGTTCCCTGATGC</b>
2	<b>TCCATGACGTTCCCTGATGC</b>
3	<b>TCCAUGACGTTCCCTGATGC</b>
4	<b>TCCATGACGTTCCCTGATGC</b>
5	<b>TCCATGACGUTCCCTGATGC</b>

Fettgedruckte Buchstaben zeigen eine 3'-O-Methylmodifikation an

**[0040]** Wir verwendeten ein PS-Oligonukleotid, das ein einziges CpG-Dinukleotid enthält (Oligo 1), und Oligos 2–5, in denen eine Substitution von einem oder zwei Desoxynukleosiden mit modifizierten Nukleosiden an spezifischen Stellen durchgeführt worden war.

**[0041]** Eine Substitution mit 3'-O-Methylribonukleosiden in den Oligos 2–5 führte gleichzeitig zum Einbau von 2'-5'-Internukleosidbindungen. Eine Substitution 5' zu dem CpG ohne dazwischenliegende Nukleoside (Oligo 2) verminderte die immunstimulatorische Aktivität. Überraschenderweise verminderte eine Substitution 3' zu dem CpG ohne dazwischenliegende Nukleoside (Oligo 5) auch die immunstimulatorische Aktivität. Außerdem erhöhen Oligos 3 und 4 mit einer 3'-O-Methylribonukleosidsubstitution 3 zu dem CpG die immunstimulatorische Aktivität (Indizes von 4,6 +/–0,43 bzw. 5,7 +/–0,87).

### Beispiel 3

#### Modulation der immunstimulatorischen Wirkung in vivo: Methylphosphonatsubstitutionen

**[0042]** Um die Anwendbarkeit der in vitro-Ergebnisse auf ein in vivo-Modell zu testen, wurden ausgewählte Oligonukleotide an Mäuse verabreicht und der Grad an Splenomegalie wurde als ein Indikator des Grades an immunstimulatorischer Aktivität gemessen. Eine einzige Dosis von 5 mg/kg wurde an Balb/c-Mäuse (weiblich, 4–6 Wochen alt, Harlan Spraque Dawley Inc.) intraperitoneal verabreicht. Die Mäuse wurden 72 Stunden nach der Verabreichung getötet und die Milzen wurden entnommen und gewogen. Positivkontrolloligo 1 verursachte einen 74%igen Anstieg des Milzgewichts im Vergleich zu Negativkontrollmäusen, die nur PBS erhalten haben.

**[0043]** Oligonukleotide, die Methylphosphonatinternukleotidbindungen enthalten, sind in [Fig. 3](#) gezeigt. Oligonukleotide mit Methylphosphonatbindungen 3 oder 4 Nukleotide 5' zu dem CpG-Dinukleotid oder 2 oder 3 Nukleotide 3' zu dem CpG-Dinukleotid wurden hergestellt. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt, waren alle diese Oligonukleotide immunstimulatorischer als Oligo 1 sowohl in dem Mausmilzellenproliferationsassay als auch im Milzvergrößerungsassay.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Erhöhen der immunstimulatorischen Wirkung eines CpG-haltigen Oligonukleotids, wobei das Verfahren ein Einbringen in das Oligonukleotid eines 3'-substituierten Nukleosids oder einer 2'-5'-Internukleosidbindung bei einer Position umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, das das 3'-substituierte Nukleosid oder die 2'-5'-Internukleosidbindung enthält, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 3'-Substitution oder 2'-5'-Internukleosidbindung fehlt.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die 2'-5'-Internukleosidbindung ein Alkylphosphonat ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Alkylphosphonat ein Methylphosphonat ist.

5. CpG-haltiges Oligonukleotid mit einer erhöhten immunstimulatorischen Wirkung, wobei das Oligonukleotid ein 3'-substituiertes Nukleosid bei einer Position aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, das das 3'-substituierte Nukleosid enthält, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 3'-Substitution fehlt.

6. CpG-haltiges Oligonukleotid mit einer erhöhten immunstimulatorischen Wirkung, wobei in das Oligonukleotid eine 2'-5'-Internukleosidbindung bei einer Position eingebracht wurde, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem dritten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 5' zu dem CpG-Dinukleotid, zwei Nukleosiden 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem dritten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem vierten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem fünften Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid, dem sechsten Nukleosid 3' zu dem CpG-Dinukleotid und Kombinationen davon, wobei das Oligonukleotid, in das eine 2'-5'-Internukleosidbindung eingebracht wurde, eine erhöhte immunstimulatorische Wirkung aufweist im Vergleich zu einem Oligonukleotid, dem die 2'-5'-Internukleosidbindung fehlt.

7. Oligonukleotid gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei das Oligonukleotid kein Antisense-Oligonukleotid ist.

8. Oligonukleotid gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei das Oligonukleotid eine Länge von etwa 6 bis etwa 50 Nukleotide aufweist.

9. Oligonukleotid gemäß Anspruch 5, wobei das Oligonukleotid ferner modifizierte Internukleotidbindungen oder modifizierte Zucker umfasst, um die Stabilität zu verbessern.

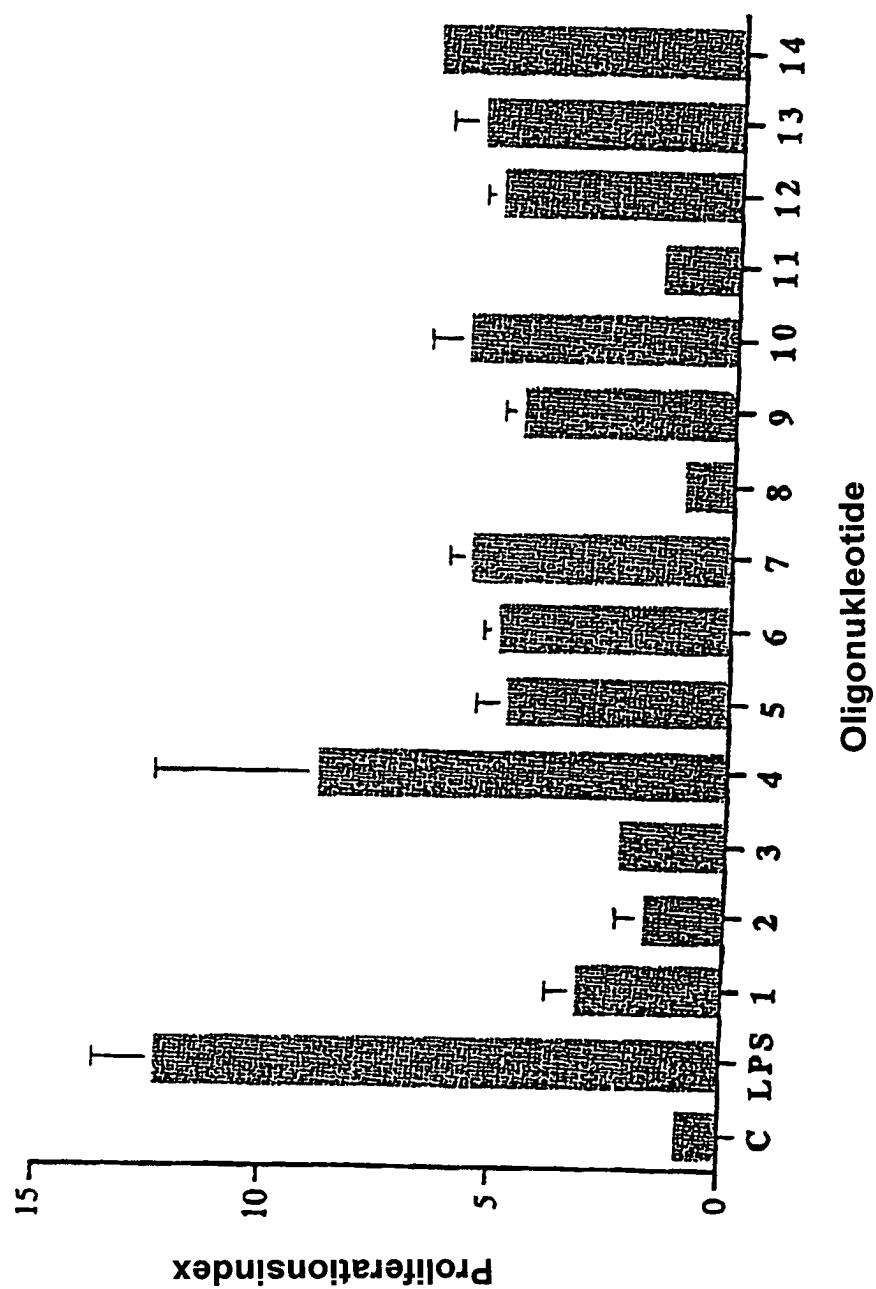
10. Oligonukleotid gemäß Anspruch 6, wobei die 2'-5'-Internukleosidbindung ein Alkylphosphonat ist.

11. Oligonukleotid gemäß Anspruch 10, wobei das Alkylphosphonat ein Methylphosphonat ist.

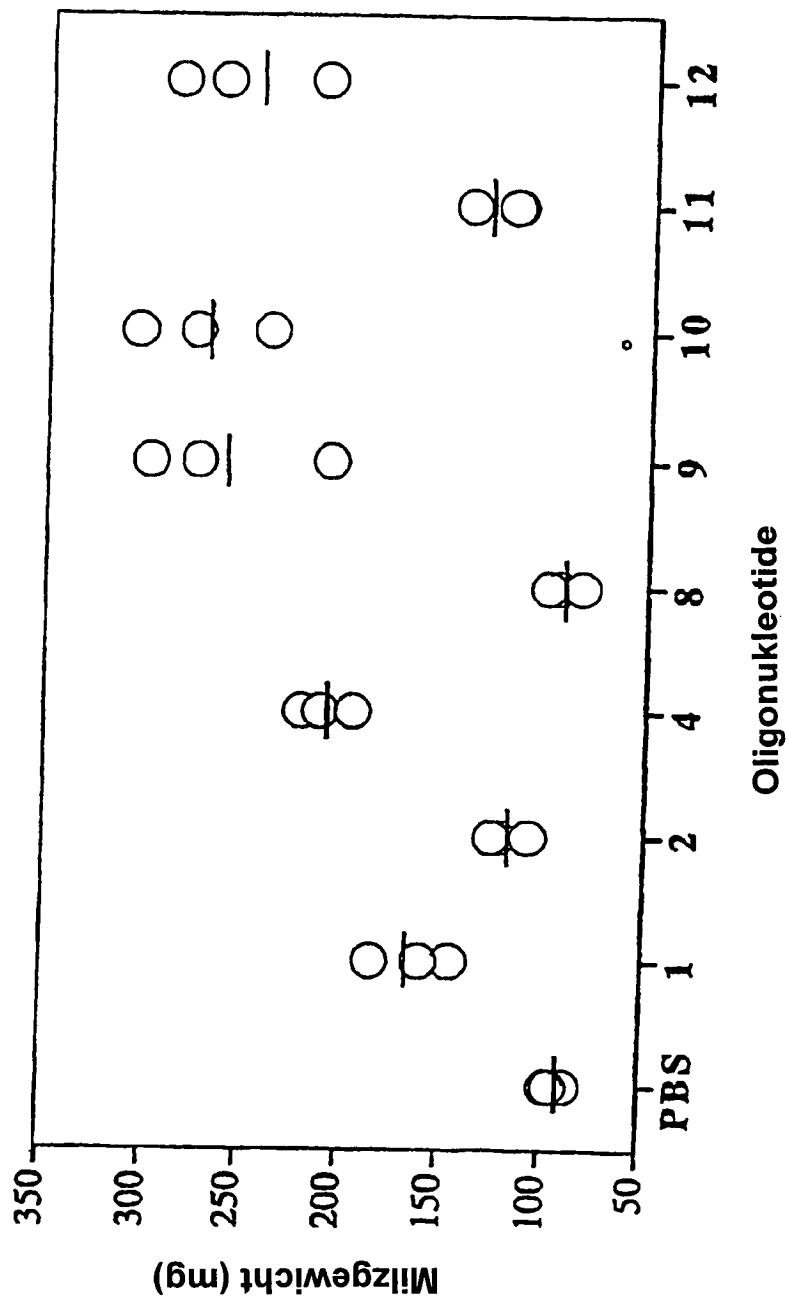
12. Oligonukleotid gemäß Anspruch 6, wobei das Oligonukleotid ferner modifizierte Zucker umfasst, um die Stabilität zu verbessern.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

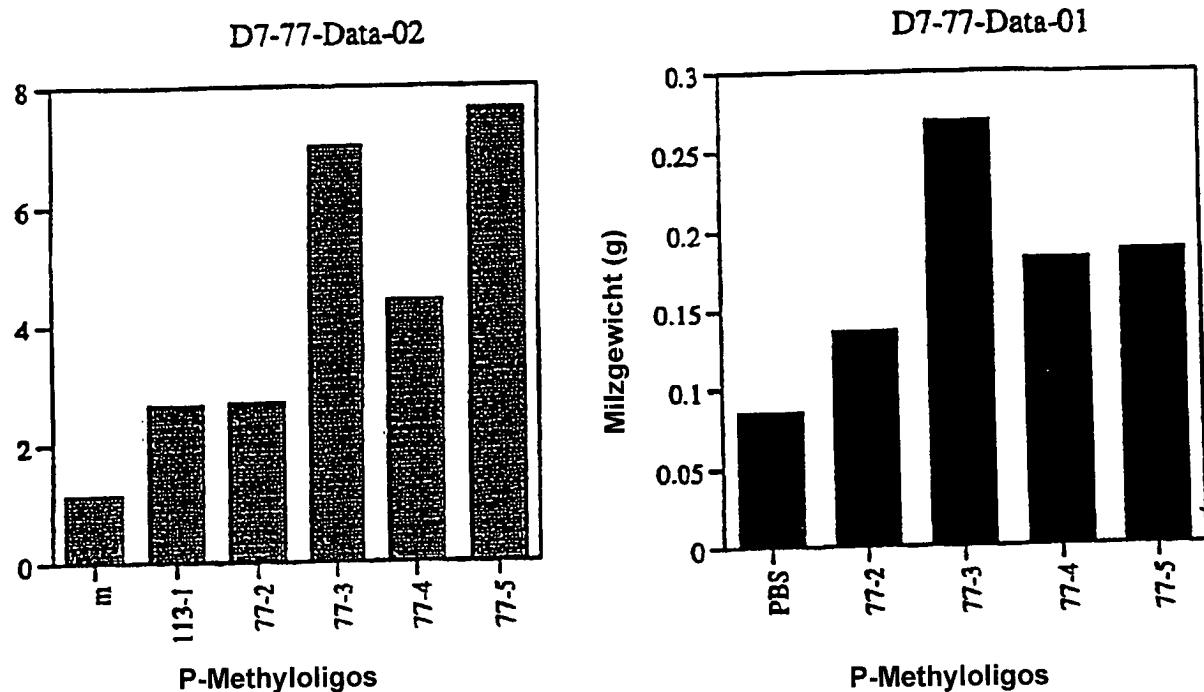
Anhängende Zeichnungen



Figur 1



Figur 2



113-1 TCCATGACGTTCTGATGC

77-2 TCCATGACGTTCTGATGC

77-3 TCCATGACGTTCTGATGC

77-4 TCCATGACGTTCCTGATGC

77-5 TCCATGACGTTCTGATGC

**Figur 3**