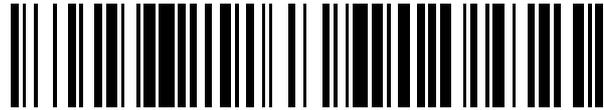


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 731**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/117** (2010.01)

**A61K 31/7125** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2009 E 09825058 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2342341**

54 Título: **Compuestos y procedimientos para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares**

30 Prioridad:

**04.11.2008 US 111284 P**

**04.11.2008 SE 0802338**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.06.2014**

73 Titular/es:

**INDEX PHARMACEUTICALS AB (100.0%)**

**Tomtebodavägen 23 a, plan 6**

**171 65 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**ADMYRE, CHARLOTTE;**

**AXELSSON, LARS-GÖRAN;**

**VON STEIN, OLIVER y**

**ZARGARI, AREZOU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 464 731 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos y procedimientos para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares

**Campo técnico**

5 La presente invenciones se refiere a procedimientos y compuestos para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares, y en particular a compuestos y procedimientos para la prevención, tratamiento o alivio de diversas afecciones en las que las propiedades y el comportamiento de células polimorfonucleares desempeñan una función en la patogénesis.

**Antecedentes**

10 La inflamación es un término general para los mecanismos por los que el cuerpo reacciona a infección, irritación y otra lesión, movilizandando componentes del sistema inmunitario. Las células polimorfonucleares son reclutadas en las fases tempranas de la inflamación, y migran al sitio de inflamación. Las quimiocinas y sus receptores, junto con otros quimioatrayentes, son mediadores clave para la migración de PMN. Ejemplos de quimioatrayentes son IL-8 y LTB<sub>4</sub>, que uniéndose a sus receptores CXCR1/CXCR2 y BLT1, respectivamente, desempeñan una función crucial en el reclutamiento de PMN al sitio de inflamación. Y, lo que es más importante, la inflamación desempeña una función en  
15 numerosas afecciones, no solo enfermedades normalmente clasificadas como enfermedades inflamatorias.

20 La isquemia es una falta absoluta o relativa del riego sanguíneo a un órgano que produce lesión de tejido debido a una falta de oxígeno y nutrientes. El corazón, el cerebro y los riñones están entre los órganos que son los más sensibles al riego sanguíneo inadecuado. Se usan diferentes estrategias de tratamiento dependiendo de los órganos implicados y la causa de isquemia. Un ejemplo es, después de una isquemia aguda de corazón (infarto de miocardio), tanto una terapia trombolítica como intervención coronaria percutánea primaria que va a usarse para restaurar la circulación sanguínea (reperusión miocárdica) en la arteria coronaria relacionada con el infarto. Sin embargo, la restauración de la sangre después de un episodio isquémico produce la muerte de miocitos cardíacos que eran viables inmediatamente antes de la reperusión miocárdica. Esta lesión miocárdica se llama lesión por reperusión letal que aumenta el tamaño final del infarto de miocardio. Se cree que la isquemia miocárdica y la lesión por reperusión están asociadas a reacciones inflamatorias que implican diversos tipos de células y citocinas (Entman y Smith 1994).  
25

30 Otro ejemplo es el accidente cerebrovascular, y en particular el accidente cerebrovascular isquémico. En un accidente cerebrovascular isquémico, el riego sanguíneo a una o más partes del cerebro disminuye, conduciendo a disfunción y necrosis del tejido cerebral en aquellas partes. Hay varias causas subyacentes a un accidente cerebrovascular isquémico: trombosis (obstrucción de un vaso sanguíneo por un coágulo de sangre que se forma localmente), embolia (obstrucción de un vaso sanguíneo debido a un émbolo formado en cualquier parte en el cuerpo), hipoperfusión sistémica (disminución general en el riego sanguíneo, por ejemplo, como consecuencia de choque) y trombosis venosa.

35 La embolia es una grave afección que puede conducir a riego sanguíneo limitado a órganos o tejidos, aguas abajo del émbolo. La embolia, mencionada anteriormente como un factor causante en accidente cerebrovascular, es conocida por producir la obstrucción en otros órganos, frecuentemente en los pulmones, riñones o hígado, pero también en las extremidades inferiores. Un émbolo puede formarse espontáneamente, por ejemplo, cuando se desplaza placa de las paredes de un vaso sanguíneo y se viaja en la corriente sanguínea. Los émbolos también pueden formarse como resultado de traumatismo, por ejemplo, émbolos de grasa de fracturas complicadas o coágulos de sangre (trombos) del sitio de hemorragia. Los pacientes que se someten a cirugía también están en riesgo, ya que tanto los trombos como los émbolos de grasa pueden formarse durante la intervención quirúrgica. También son factores de riesgo inmovilidad, obesidad y cáncer, conocidos por asociarse a embolia.  
40

45 La isquemia mesentérica es una afección médica en la que la inflamación y lesión del intestino delgado resultan de riego sanguíneo inadecuado. Las causas de la reducida circulación sanguínea pueden incluir cambios en la circulación sistémica (por ejemplo, baja tensión arterial) o factores locales tales como constricción de vasos sanguíneos o un coágulo de sangre. Otros trastornos y afecciones intestinales que posiblemente conducen a isquemia incluyen ileo, distensión, invaginación y vólvulo, en los que la orientación anormal de los intestinos, alteración del movimiento peristáltico y otras afecciones pueden conducir a circulación sanguínea reducida, inflamación y eventualmente isquemia. Por ejemplo, el ileo puede aumentar la formación de adhesiones, debido a  
50 que los segmentos intestinales están en contacto prolongado, permitiendo que se formen adhesiones fibrosas, y la distensión intestinal puede producir lesión serosa e isquemia. Tales trastornos pueden producirse como resultado de intervención quirúrgica, tanto durante la cirugía como durante la recuperación, como resultado de traumatismo, quemaduras, choque o diversa etiología, etc., y puede conducir a insuficiencia multiorgánica.

55 Las células polimorfonucleares (PMN), en particular los neutrófilos polimorfonucleares, que constituyen la mayoría de los leucocitos de la sangre, se meten en la zona de infarto por quimioatrayentes durante las 6 primeras horas de reperusión miocárdica, y durante las siguientes 24 horas migran al tejido miocárdico. Este proceso se facilita por moléculas de adhesión a células. Los neutrófilos producen taponamiento vascular y liberan enzimas degradadoras y especies reactivas de oxígeno (Vinten-Johansen J, 2004). Por tanto, los neutrófilos son la principal diana con el fin

del tratamiento o prevención de inflamación. Varias intervenciones tuvieron como objetivo reducir los neutrófilos del área de infarto durante la reperfusión miocárdica, por ejemplo, sangre desleucocitada, anticuerpos contra las moléculas de adhesión a células, e inhibidores farmacológicos de activación del complemento. Sin embargo, los estudios clínicos correspondientes no han mostrado ningún efecto cardioprotector significativo de tales intervenciones (revisado en Yellon, 2007).

Se ha mostrado que la acumulación y activación de PMN desempeña una función importante en la patogénesis de una amplia variedad de estados de enfermedad tan diversos como artritis reumatoide, aterosclerosis, colitis ulcerosa, psoriasis y lesión isquémica. Por tanto, la elucidación de mecanismos reguladores endógenos que pueden controlar funciones de neutrófilos son de interés terapéutico considerable. Se han hecho grandes esfuerzos para identificar candidatos a fármacos, y un enfoque se representa por el uso de compuestos peptídicos, que se unen al dominio  $\alpha$ M de integrina I e inhiben la formación de sus complejos con proMMP-9, previniendo así la migración de neutrófilos (véase, por ejemplo, el documento WO2004/110477)

Otro enfoque es el uso de derivados de lipoxina y lipoxina, compuestos lipófilos pequeños que se ha mostrado que inhiben el reclutamiento de leucocito e infiltración de PMN en modelos animales de inflamación (véase, por ejemplo, el documento W02000/055109).

Todavía otro enfoque es el uso de anticuerpos. A principios de los años 90 se identificó un potente anticuerpo específico (Ab) para CD47, C5/D5, que era capaz de inhibir la migración de PMN a través del endotelio vascular, filtros recubiertos de colágeno y epitelio intestinal sin inhibir la adhesión mediada por integrina  $\beta$ 2 (Parkos y col., 1996). Al mismo tiempo se mostró que anti-CD47 también inhibió la migración de PMN a través de monocapas endoteliales (Cooper, y col., Proc Natl Acad Sci USA, 92: 3978; 1995). Estudios posteriores con ratones inactivados en CD47 han confirmado la importancia de CD47 en la migración de PMN *in vivo* sugiriendo que CD47 desempeña una función en regular la tasa de reclutamiento de PMN a sitios de infección (Lindberg y col., 1996).

El trasplante es otra aplicación en la que deben considerarse las consecuencias de la isquemia por reperfusión. Trasplante significa la transferencia de células, tejido o partes de órganos u enteros de una localización a otra. Los trasplantes pueden ser autólogos, los llamados autoinjertos, en los que las células se toman principalmente de un individuo y se devuelven al mismo individuo. Más frecuentemente, el término trasplante se usa para células, tejido u órganos tomados de una persona, el donante, y dados a otra persona, el receptor. Los trasplantes de riñón son los que más realizan comúnmente. Los trasplantes de corazón, hígado y pulmones también se llevan a cabo regularmente. A medida que avanza la medicina también están siendo usados otros órganos vitales que incluyen el páncreas e intestino delgado en trasplantes. Tejido tal como córneas, válvulas del corazón, piel y hueso también pueden donarse.

Por motivos prácticos, un trasplante necesita almacenarse fuera del cuerpo durante un periodo de tiempo, para permitir el transporte, pruebas funcionales, tipado de tejido y coincidencia del donante y el receptor. Desde la llegada del trasplante, los órganos que van a trasplantarse se han mantenido en almacenamiento isquémico en frío. Aunque este procedimiento tuvo como objetivo ayudar a reducir el grado de lesión del órgano durante el transporte, todavía se produce lesión significativa. Cuanto más tiempo pase, más grave será la lesión. Se han propuesto diferentes soluciones técnicas y químicas. Sin embargo, como el número de personas en necesidad de un trasplante supera con creces el número de donantes, y como el procedimiento es muy complicado, costoso y estresante para todas las partes, sigue existiendo la necesidad de mejoras que aumenten la probabilidad de un trasplante satisfactorio. El minimizar la lesión de órganos durante el almacenamiento y transporte es una cuestión importante.

El documento WO 2005/080568 se refiere al uso de compuestos inhibidores de NF-kB para la prevención o reducción del grado de lesión isquémica secundaria en un mamífero. Los compuestos inhibidores de NF-kB se eligen del grupo que consiste en: un oligonucleótido de la subunidad p65 de NF-KB antisentido; una forma negativa dominante de la subunidad p65 de NF-KB; un señuelo; inhibidores de ribosomas; ARN enzimático contra p65 de NF-KB; y construcciones de ARNip.

El documento WO 2007/030580 se refiere a procedimientos de protección de células contra ataque citotóxico, que implica la administración de una composición que incluye un agente que se une a y activa un receptor similar a Toll a un sujeto, opcionalmente en combinación con la administración de un inhibidor de ASIC. Se establece que los procedimientos se aplican a la protección de células neurales y no neurales. Por ejemplo, se proporcionan procedimientos de protección de una célula neural contra lesión cerebral excitotóxica. También se proporcionan procedimientos para preparar medicamentos para el tratamiento profiláctico de lesión excitotóxica, isquemia y/o hipoxia.

El documento WO 2007/030581 es una aplicación paralela al documento WO 2007/030580 anterior, que se basa en la administración de un oligonucleótido CpG para proteger células contra ataque citotóxico.

## Resumen

Los presentes inventores han mostrado sorprendentemente que compuestos de oligonucleótidos específicos influyen en las propiedades y comportamiento de células polimorfonucleares, en particular el reclutamiento y/o

migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación, y que mediante este mecanismo tienen utilidad en la prevención, tratamiento y/o alivio de diversas enfermedades.

5 Los inventores ponen a disponibilidad oligonucleótidos y procedimientos de su uso en terapia, además de en la fabricación de composiciones farmacéuticas para este fin. Las situaciones clínicas en las que se desea prevenir o reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación incluyen, pero no se limitan a, inflamación de las vías respiratorias, pleuritis, infarto de miocardio, infarto cerebral, accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión relacionada con trasplantes de tejido u órganos; y lesión por reperfusión relacionada con intervención quirúrgica, embolia, cicatrización y traumatismo.

10 Un aspecto de la invención es la provisión de compuestos novedosos, además de procedimientos de su uso, tales como procedimientos para prevenir o reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación en enfermedades de diferente etiología. Otros aspectos de la invención, junto con sus ventajas, serán obvios para un experto tras el estudio de las reivindicaciones, incorporadas por este documento por referencia.

### Breve descripción de los dibujos

15 La invención se desvelará en más detalle más adelante, en la descripción, ejemplos no limitantes y reivindicaciones, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La **Figura 1a** es el protocolo profiláctico en el modelo murino de inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA. Los ratones se sensibilizaron con dos inyecciones i.p. de OVA en gel de hidróxido de aluminio en el día 0 y 12. Los tratamientos se realizaron con dos administraciones intranasales del fármaco de prueba o vehículo en el día 16 y 21. Entonces, los ratones se expusieron a cuatro exposiciones de aerosol. El experimento se terminó en el día 35.

20 La **Figura 1b** es un histograma que muestra valores medios de células derivadas de líquido BAL después del tratamiento según la Fig. 1a. El tratamiento con IDX9059 produjo reducción de los leucocitos, principalmente eosinófilos, y linfocitos. La barra indica media  $\pm$  DE.

\* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  por ANOVA unilateral con corrección a posteriori de Bonferroni frente a control de PBS.

25 La **Figura 2** muestra la reducción de la acumulación de PMN después del tratamiento con compuestos inventivos en un modelo de pleuritis inducida por tioglicolato en ratones. **2a)** IDX9010 se administró 20 minutos antes de la inducción de pleuritis y produjo una reducción de PMN inmigrantes en la cavidad pleural del 68,2 %. **2b)** IDX9059 se administró 20 minutos antes de la inducción de pleuritis y produjo una reducción de PMN inmigrantes en la cavidad pleural del 25,1%. Las barras indican media  $\pm$  DE.

30 La **Figura 3a** es un histograma de células por campo de microscopio sin estimulación con ningún factor quimiotáctico en un modelo de microscopía intravital de vénulas en el músculo cremáster en ratones. R = células rodantes, A = células adherentes y T = células transmigradas.  $n=4$ , media  $\pm$  DE. Las células sin estimular revelaron un orden de actividad de células de  $R > A > T$ . El tratamiento con IDX9059 mostró efectos de regulación por disminución sobre el rodamiento y la adherencia de células PMN sin estimular.

35 La **Figura 3b** es un histograma de células por campo de microscopio después de la adición de factor de activación de plaquetas (PAF) quimiotáctico en un modelo de microscopía intravital de vénulas en el músculo cremáster en ratones. R = células rodantes, A = células adherentes y T = células transmigradas. En células estimuladas (después de PAF), el orden de actividad se invirtió,  $T > A > R$ . El tratamiento con IDX9059 mostró efectos de regulación por disminución sobre el rodamiento y la adherencia de y migración de células PMN.  $n=4$ , media  $\pm$  DE.

40 Las **Figuras 4a - c** muestran el efecto del tratamiento con fármacos inventivos y vehículo (PBS) después de la inducción de isquemia cerebral en modelo de rata de isquemia focal.

45 **4a)** consiste en dos fotografías que muestran una comparación del grado de lesión isquémica en animales no tratados administrados con PBS (transparencia E) frente a IDX9059 (transparencia D). La oclusión transitoria de la arteria cerebral media se usó para inducir lesión cerebral isquémica en ratas Wistar Hannover macho. Se usó láser Doppler para mostrar la circulación sanguínea cortical de la arteria cerebral media (ACM). Después de 90 minutos de oclusión, el filamento se eliminó y la circulación de la sangre continuó en la ACM y se restituyó la circulación sanguínea cortical. Las sustancias se inyectaron intraperitonealmente 0 y 24 horas después de la recirculación. Los animales se sacrificaron después de 48 horas de la operación y el cerebro se extirpó y se cortó en rebanadas de 2 mm de espesor. Entonces, las rebanadas se incubaron en 0,8 % de cloruro de trifeníltetrazolio (TTC) en tampón fosfato para distinguir las células cerebrales viables (rojas) de las necróticas (pálidas). Se fotografiaron las rebanadas y la lesión cerebral se evaluó por análisis computacional.

50 **4b)** es un diagrama de barras que muestra el porcentaje de lesión cerebral total.

**4c)** es un diagrama de barras que muestra el porcentaje de área de necrosis nerviosa selectiva (NNS). La necrosis nerviosa selectiva se representa como una estimación de la parte que tiene un tono ligeramente rosa y se considera que es la región de penumbra.

**4d)** es un diagrama de barras que muestra el porcentaje de región de infarto (núcleo isquémico). Los datos se mostraron como media  $\pm$  DE (n=4-8). La media se indicó con barra. \*P<0,05 se obtuvo por prueba de la t para datos independientes en grupo tratado frente a control de PBS.

La **Figura 5** es un diagrama de barras que muestran el porcentaje de infarto en un modelo animal de isquemia de corazón. IDX9059 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) o placebo se administró (100  $\mu$ l) subcutáneamente 24 h antes de la extirpación del corazón. Los corazones se recogieron y se perfundieron durante 20 minutos para estabilización. La isquemia global se indujo deteniendo la perfusión, seguido de 120 minutos de reperfusión. Al final de la reperfusión, el corazón se extrajo y el ventrículo izquierdo se cortó en cuatro rebanadas, cada una de un mm de espesor, y se incubaron en 1 % de cloruro de trifeniltetrazolio en tampón fosfato para distinguir los cardiomiocitos viables. Se tomaron fotografías de las rebanadas y el volumen de infarto se evaluó por análisis computacional. Los resultados se muestran en un diagrama de barras que muestra el porcentaje de lesión del infarto. Los datos muestran media (n=8) y EEM. \*P<0,05 se calculó por la prueba de Mann-Whitney.

Las **Figuras 6a - c** muestran el resultado del tratamiento con IDX0150 y vehículo (PBS) en un modelo de ratón de isquemia intestinal-reperfusión. La isquemia se indujo por 15 minutos de ligación de la arteria mesentérica, seguido de 3 horas de reperfusión. El ratón recibió PBS (**6a**) o IDX0150 (**6b**) 20 minutos antes de la inducción de isquemia. **6a-b)** ilustran parte del tubo digestivo del ratón (estómago, izquierda; intestino delgado; ciego y colon) después de la administración de PBS o IDX0150, respectivamente. La puntuación inflamatoria de ratones tratados con IDX0150 (puntuación 2) frente a ratones que recibieron PBS (puntuación 6,5) se muestra en **6c**.

Las **Figuras 6d - g** muestran los niveles de mieloperoxidasa (MPO) en tejido intestinal y de pulmón en el modelo de ratón de isquemia intestinal y lesión por reperfusión. IDX0150 o PBS se administró subcutáneamente 20 min antes de la inducción de isquemia (**6d** y **6f**) o inmediatamente después de empezar la reperfusión (**6e** y **6g**). Después de 3 h de reperfusión, el intestino delgado (**6d** y **6e**) y los pulmones (**6f** y **6g**) se homogeneizaron y los niveles de MPO se analizaron con ELISA. Los resultados se presentan como valores medios con desviaciones estándar.

Las **Figuras 7a-f** muestran los resultados de la expresión de CXCR1 y CXCR2 en PMN periféricas humanas después de la estimulación con diferentes sustancias de prueba. Las PMN humanas de 5 donantes de sangre sanos se estimularon con 25  $\mu$ M de compuestos de prueba o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Las células se recogieron posteriormente y se analizaron para expresión de CXCR1 y CXCR2 por citometría de flujo. Los cambios en veces en la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CXCR1 (**7a**) y CXCR2 (**7c**) o los cambios en veces en el % de PMN CD66b+ CXCR1+ (**7b**) y CXCR2+ (**7d**) se calcularon normalizando la IMF o % de PMN positivas de células sin tratar correspondientes a 1 (línea negra de puntos). **7e**) ilustra la IMF relativa de PMN CXCR1+ después de la estimulación con 0,5, 10 y 25  $\mu$ M de IDX9052, IDX9054 y IDX9059 (n=5). **7f**) muestra la IMF relativa de PMN CXCR1+ después de la estimulación con IDX9074 10  $\mu$ M en experimentos separados usando PMN de 5 donantes de sangre sanos.

Los resultados se presentan como media  $\pm$  EEM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 se calcularon por ANOVA bilateral con corrección a posteriori de Bonferroni frente a células sin tratar.

La **Figura 7g** ilustra la expresión de CXCR1 en PMN humanas estimuladas con IDX9059 para diversos momentos de tiempo. PMN humanas de 3 donantes de sangre sanos se estimularon con 10  $\mu$ M de IDX9059 durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h o 3 h. Las células se recogieron posteriormente y se fijaron en cada momento de tiempo y se analizaron para expresión de CXCR1 por citometría de flujo. Los cambios en veces en IMF de CXCR1 de PMN positivas para CD66b en células tratadas con IDX9059 se calcularon normalizando la IMF de células sin tratar correspondientes a 1. Los resultados se presentan como valores medios  $\pm$  EEM.

La **Figura 7h** muestra la importancia de oligonucleótidos CpG y oligo G sobre la expresión superficial de CXCR1. PMN humanas de 3 donantes de sangre sanos se incubaron durante 3 h con 0,5, 10 ó 25  $\mu$ M de IDX9022 y IDX9059, además de los oligonucleótidos de control modificados IDX0480 y IDX9134, que tienen las mismas secuencias que IDX9022 y IDX9059, respectivamente, pero sin motivos de CpG. Las células se recogieron posteriormente y se analizaron para expresión de CXCR1 por citometría de flujo. Los cambios en veces en IMF de PMN CD66b+ CXCR1+ se calcularon normalizando la IMF de células sin tratar a 1 (línea negra de puntos). Los resultados se presentan como media  $\pm$  EEM.

La **Figura 7i** demuestra el efecto de cloroquina sobre la regulación por disminución de la expresión superficial de CXCR1 después del tratamiento con compuestos inventivos. PMN humanas de 4 donantes de sangre sanos se pre-incubaron durante 30 min con 0,5, 5 ó 10  $\mu$ g/ml de cloroquina antes de estimularse con 10  $\mu$ M de compuestos de prueba durante 3 h. Las células se recogieron posteriormente y se analizaron para expresión de CXCR1 por citometría de flujo. Los cambios en veces en IMF se calcularon normalizando la IMF de células sin tratar correspondientes a 1 (línea negra de puntos). Los resultados se presentan como media  $\pm$  EEM. \*P<0,05 se calculó por ANOVA bilateral con corrección a posteriori de Bonferroni frente a células sin tratar.

Las **Figuras 7j-k** muestran los resultados de la expresión superficial de BLT1 sobre PMN humanas después de la estimulación con diferentes sustancias de prueba. PMN humanas de 5 donantes de sangre sanos se estimularon con 0,5, 10 ó 25  $\mu$ M de compuestos inventivos o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Las células se recogieron

posteriormente y se analizaron para expresión de BLT1 por citometría de flujo. El cambio en veces en IMF (7j) o % de PMN positivas para CD66b BLT1+ (7k) se calculó normalizando la IMF o % de células sin tratar correspondientes a 1 (línea negra de puntos). Los resultados se presentan como media y EEM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 se calcularon por ANOVA bilateral con corrección a posteriori de Bonferroni frente a células sin tratar.

5 La **Figura 7l-n** muestran el efecto de los compuestos inventivos sobre la quimiotaxia inducida por IL-8 y LTB<sub>4</sub> de PMN. PMN humanas de 5 (7l) o 4-6 (7n) donantes de sangre sanos se preincubaron con 0,5, 10 ó 25 µM de compuestos inventivos durante 1 h después de lo cual el compuesto libre se lavó y las células se investigaron para su capacidad para migrar hacia IL-8 (7l) o LTB<sub>4</sub> (7n) en un ensayo de quimiotaxia durante 3 h. Los resultados se presentan como el número medio de PMN migradas ± EEM. \*P<0,05 y \*\*P<0,01 se calcularon por ANOVA unilateral con corrección a posteriori de Dunnett frente a células sin tratar incubadas con IL-8/LTB<sub>4</sub>. 7m) muestra un experimento separado en el que PMN de 2 donantes de sangre sanos se preincubaron con 0,5, 10 ó 25 µM de IDX9045 durante 1 h, después de lo cual las células se investigaron para su capacidad para migrar hacia IL-8 en presencia de compuesto libre en un ensayo de quimiotaxia durante 3 h.

10 Las **Figuras 7o-q** demuestran la correlación entre la expresión superficial de CXCR1, CXCR2 y BLT1 y la migración de PMN después de la estimulación con los compuestos inventivos. La IMF de CXCR1 (7o), CXCR2 (7p) y BLT1 (7q) de PMN después de la estimulación con compuestos inventivos se representó contra el número de PMN que migraron hacia IL-8 (7o y 7p) o LTB<sub>4</sub> (7q) en el ensayo de quimiotaxia. El ajuste a curva (r<sup>2</sup>) se especifica en las figuras.

15 Las **Figuras 8a-f** muestran los resultados de la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 sobre PMN periféricas humanas aisladas de pacientes con EM después de la estimulación con diferentes sustancias de prueba. PMN humanas de pacientes con EM se estimularon con 0,5, 10 y 25 µM de compuestos de prueba o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Las células se recogieron posteriormente y se analizaron para expresión de CXCR1 (n=4), CXCR2 (n=4) y BLT1 (n=2) por citometría de flujo. Los cambios en veces en la intensidad media de fluorescencia (IMF) para CXCR1 (8a), CXCR2 (8c) y BLT1 (8e) o los cambios en veces en el % de PMN CD66b+ CXCR1+ (8b), CXCR2+ (8d) y BLT1+ (8f) se calcularon normalizando la IMF o el % de PMN positivas de células sin tratar correspondientes a 1 (línea negra de puntos). Los resultados se presentan como media ± EEM. \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 se calcularon por ANOVA bilateral con corrección a posteriori de Bonferroni frente a células sin tratar.

20 Las **Figuras 8g-i** ilustran los resultados de la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN periféricas humanas derivadas de un paciente asmático después de la estimulación con los compuestos inventivos. PMN humanas de un paciente asmático se estimularon con 0,5, 10 y 25 µM de compuestos de prueba o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Las células se recogieron posteriormente y se analizaron para expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 por citometría de flujo. Los cambios en veces en la intensidad media de fluorescencia (IMF) para PMN CD66b+ CXCR1 (8g), CXCR2 (8h) y BLT1 (8i) se calcularon normalizando la IMF de células sin tratar correspondientes a 1 (línea negra de puntos).

### 35 Descripción detallada

Antes de describir la presente invención debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento se usa solo con el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solo por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

40 Debe observarse que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

Por tanto, el término “aproximadamente” se usa para indicar una desviación de +/- 2 % del valor dado, preferentemente +/- 5 %, y lo más preferentemente +/- 10 % de los valores numéricos, si procede.

Además de lo anterior, se usarán los siguientes términos:

45 El término “homología” y “grado de homología” significa la similitud o identidad entre dos secuencias, en la que el 100 % de homología significa que las secuencias son idénticas y una menor homología indica la presencia de variaciones. Por ejemplo, para una secuencia que consiste en 20 nucleobases, otra secuencia es el 90 % homóloga si 18 bases son iguales.

50 “Funcionalmente homólogo” significa secuencias que quizás comparten una menor homología estructural con la secuencia desvelada, pero presentan función homóloga *in vivo*, en tanto el organismo sano como enfermo, por ejemplo, codificando las mismas proteínas o proteínas altamente similares con funciones celulares similares.

Los términos “tratamiento”, “terapia”, “uso terapéutico”, “medicamento” y “uso médico” engloban tanto aplicaciones humanas y animales como veterinarias.

55 Los presentes inventores han encontrado que oligonucleótidos específicos pueden influir en las propiedades y comportamiento de células polimorfonucleares, por ejemplo, su adhesión y transmigración endotelial, y que estos compuestos mediante estos y otros posibles mecanismos tienen utilidad en la prevención y/o alivio de enfermedades

de diferente etiología. Estos hallazgos se han confirmado en experimentos animales y en pruebas *in vitro* realizadas en PMN aisladas de sangre de donante.

Tabla 1. Ejemplos de secuencias de oligonucleótidos

SEC ID N°	IDX-N°	Sec 5'-3'
1	IDX9005	T*C*G*TCCATGGTCA GGGTCCC GG*G*G*G
2	IDX9010	T*C*C*CAAGAGTCGTCC*A*G*G
3	IDX9022	T*C*G*TCGTTCTGCCATCGTC*G*T*T
4	IDX9030	T*C*G*TCTGCCATGGCGGCC*G*C*C
5	IDX9031	T*C*G*TCGATTCTGTCTGCCA*T*G*G
6	IDX9045	G*G*G*TCGCAGC*T*G*G
7	IDX9054	G*G*G*GTCGTCTGC*G*G*G
8	IDX9059	G*A*T*CGTCCG*G*G*G
9	IDX9074	T*C*G*TTCGTCTTTTCGTC*T*G*C
10	IDX9092	T*T*T*CGTCTGCTTTTCGTTTCG*T*T*T
11	IDX9095	T*C*G*TCTGCTTTTCGTC*T*G*C
12	IDX9096	G*A*T*CGTCCGATCG*T*C*C
13	IDX0150	G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*C
14	IDX9052	G*G*G*GTCGTCTG*C*G*G
15	IDX0480	T*G*C*TGCTTCTGCCATGCTG*C*T*T
16	IDX9134	G*A*T*GCTCTG*G*G*G

- 5 Los inventores proporcionan novedosos oligonucleótidos y, por consiguiente, una realización de la invención es un oligonucleótido aislado y sustancialmente purificado como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059].

Preferentemente, al menos un nucleótido en una secuencia elegida de las secuencias anteriores tiene una modificación del esqueleto de fosfato. Dicha modificación del esqueleto de fosfato es preferentemente una modificación de fosforotioato o fosforoditioato.

- 10 Los inventores también proporcionan una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido elegido de las secuencias anteriores.

Una realización de la invención es el uso de un oligonucleótido para la producción de una preparación farmacéutica para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación, en el que el oligonucleótido es como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059].

- 15 Preferentemente, según los resultados actualmente disponibles para los inventores, dicho reclutamiento y/o migración reducidos de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación es un resultado de una regulación por disminución de al menos uno de los receptores CXCR1 y CXCR2, o un resultado de una regulación por disminución del receptor BLT1.

- 20 En el uso anterior, el oligonucleótido se administra preferentemente mediante una de las siguientes vías de administración: administración subcutánea, intraperitoneal, mucosa, intestinal, oral, gástrica, esofágica, bucal, nasal y pulmonar.

Según una realización preferida, libremente combinable con la anterior, el oligonucleótido se administra como una etapa en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

- 25 Según otra realización preferida, libremente combinable con la anterior, el oligonucleótido se administra a un paciente que ha padecido, o se sospecha que ha padecido, un infarto de miocardio.

Según otra realización preferida, libremente combinable con la anterior, el oligonucleótido se administra a un paciente que ha padecido, o se sospecha que ha padecido, un accidente cerebrovascular.

Según otra realización preferida, libremente combinable con la anterior, el oligonucleótido se administra a un paciente que ha padecido traumatismo o quemadura, o que tiene programado someterse a cirugía.

5 Según otra realización preferida, libremente combinable con la anterior, el oligonucleótido se administra a un paciente que tiene una embolia antes de la eliminación de la embolia o antes de la administración de un agente trombolítico. Como también se ha mostrado que los compuestos tienen un efecto post-acondicionamiento, se contempla que también se administren después de la eliminación de la embolia o administración de un agente trombolítico, algo que aumenta significativamente su utilidad en una unidad de cuidados intensivos.

10 Según otra realización preferida, libremente combinable con la anterior, el oligonucleótido se administra a un órgano designado para trasplante, tanto *in situ*, antes de la extracción del donante, *in transit*, antes de la implantación en el receptor, o *in vivo*, antes de o en el momento de restaurar la circulación sanguínea.

15 Además, los inventores proporcionan un procedimiento para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación en un órgano de un paciente humano, en el que el oligonucleótido que es como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059] se administra localmente a dicho órgano o sistémicamente a dicho paciente.

20 Alternativamente, los inventores proporcionan un procedimiento para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación en un órgano, en el que un oligonucleótido se administra localmente a dicho órgano o sistémicamente a dicho paciente antes, simultáneamente con o después de la reperusión de dicho órgano, en el que el oligonucleótido es como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059].

En cualquiera de los procedimientos anteriores de tratamiento, y según los resultados actualmente disponibles para los inventores, dicho reclutamiento y/o migración reducidos de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación es un resultado de una regulación por disminución de al menos uno de los receptores CXCR1 y CXCR2, o un resultado de una regulación por disminución del receptor BLT1.

25 Los inventores también contemplan un procedimiento para acondicionar un paciente que padece o que se sospecha que ha padecido una alteración o interrupción en la circulación sanguínea en un órgano y programado para tratamiento, en el que un oligonucleótido que puede reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación en dicho órgano se administra a dicho paciente antes, simultáneamente con o después del tratamiento programado, en el que el oligonucleótido tiene SEC ID N° 8 [IDX9059].

30 En una realización del procedimiento anterior, dicho órgano es preferentemente el corazón, y dicha reducción del reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación en dicho órgano es eficaz para reducir la lesión isquémica y prevenir o aliviar lesión secundaria a reperusión. En esta realización, dicha lesión secundaria a reperusión puede ser una lesión tras restaurar la circulación sanguínea al corazón mediante la administración de un agente trombolítico. Alternativamente, dicha lesión secundaria a reperusión es una lesión tras restaurar la circulación sanguínea al corazón mediante intervención quirúrgica, por ejemplo, cirugía de derivación.

35 Alternativamente, dicha lesión secundaria a reperusión es una lesión tras restaurar la circulación sanguínea al corazón mediante angioplastia con globo. Alternativamente, dicha lesión secundaria a reperusión es una lesión tras restaurar quirúrgicamente la circulación sanguínea a un órgano trasplantado en el receptor del trasplante.

40 En otra realización del procedimiento anterior, dicho órgano es el cerebro, y dicha lesión isquémica es una lesión secundaria a reperusión. En esta realización, dicha lesión secundaria a reperusión puede ser una lesión tras la restauración de la circulación sanguínea al cerebro mediante la administración de un agente trombolítico.

En otra realización más del procedimiento anterior, dicho órgano se elige de entre el hígado, al menos un riñón, los intestinos o partes de los mismos, al menos un pulmón o partes del mismo, y dicha lesión isquémica es una lesión secundaria a reperusión.

45 En cualquiera de las realizaciones anteriores del procedimiento, el oligonucleótido se administra mediante una de las siguientes vías de administración: administración sistémica, preferentemente subcutánea, intraperitoneal, mucosa, que incluye intestinal, oral, gástrica, esofágica, bucal, nasal y pulmonar.

50 Los inventores también proporcionan un procedimiento auxiliar para el tratamiento de infarto de miocardio, en el que un oligonucleótido como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059] se administra antes, después de o simultáneamente con la administración de un agente trombolítico.

Además, los inventores proporcionan un procedimiento auxiliar para el tratamiento de accidente cerebrovascular, en el que un oligonucleótido como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059]; se administra antes, después de o simultáneamente con la administración de un agente trombolítico.

Otra realización de la invención es una disolución técnica para el almacenamiento y/o transporte de trasplantes, en el que dicha disolución comprende un oligonucleótido que puede influir en las propiedades y comportamiento de células polimorfonucleares, por ejemplo, suprimir la adhesión endotelial y reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares, en una cantidad suficiente para la prevención y/o alivio de lesión isquémica, y dicho oligonucleótido es SEC ID N° 8 [IDX9059].

En los procedimientos anteriores de uso, además de los procedimientos de tratamiento, el oligonucleótido se administra en una dosis terapéuticamente eficaz. La definición de una "dosis terapéuticamente eficaz" depende de la enfermedad y ambiente del tratamiento, siendo una "dosis terapéuticamente eficaz" una dosis que sola o en combinación con otros tratamientos produce una mejora medible de la afección del paciente. Un experto puede determinar una dosis terapéuticamente eficaz tanto empíricamente como basándose en experimentos de laboratorio, realizados sin excesiva carga. El médico práctico también puede determinar una dosis adecuada, basándose en su experiencia y considerando la naturaleza y gravedad de la enfermedad, además de la afección del paciente.

Según una realización, el oligonucleótido se administra en una dosis en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 µg/kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 µg/kg de peso corporal, lo más preferentemente en una dosis en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal.

El oligonucleótido puede administrarse en una dosis única o en dosis repetidas. La realización actualmente más preferida implica una dosis única del oligonucleótido según la invención, administrada a una membrana mucosa, por ejemplo, administrada intranasalmente, por vía oral, rectalmente o intravaginalmente en una cantidad inferior a aproximadamente 2000 µg, preferentemente inferior a aproximadamente 500 µg, preferentemente aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal.

Otra realización actualmente preferida es la administración del oligonucleótido en dos o tres dosis, separadas en el tiempo aproximadamente 2, aproximadamente 6, aproximadamente 12, o aproximadamente 24 horas.

Según otra realización de la invención, el oligonucleótido se administra a un órgano designado para trasplante, tanto *in situ*, antes de la extracción del donante, *in transit*, antes de la implantación en el receptor, o *in vivo*, antes de o en el momento de restaurar la circulación sanguínea. Preferentemente, el oligonucleótido está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2000 µg/l en una disolución usada para acondicionar el trasplante antes de la extracción del donante. Alternativamente, o además, para esto, el oligonucleótido está presente en una concentración de 0,1 a aproximadamente 1000 µg/l en una disolución usada para transportar el trasplante. Alternativamente, o además, para esto, el oligonucleótido está presente en una concentración de 0,1 a aproximadamente 1000 µg/l en una disolución usada para acondicionar el trasplante antes de restaurar la circulación sanguínea.

Hay indicaciones de que el oligonucleótido puede administrarse no solo antes, sino también simultáneamente con, o incluso después de la restauración de la circulación sanguínea. En el contexto del Ejemplo 4 se trata la posibilidad de pre-acondicionar, además de post-acondicionar. Los resultados muestran sorprendentemente que el tratamiento con SEC ID N° 8 [IDX9059], también después de la inducción del accidente cerebrovascular, puede servir de post-acondicionamiento y proteger el cerebro contra lesión isquémica.

Las realizaciones anteriores son mutuamente inclusivas, que significa que diferentes dosis, modos de administración e intervalos de tiempo pueden combinarse libremente dentro de las realizaciones enumeradas, además de con otras realizaciones que son evidentes para un experto.

Las realizaciones anteriores ofrecen muchas ventajas que serán evidentes para un experto tras el estudio de la descripción y ejemplos. Una ventaja es que el uso de los oligonucleótidos ofrece la posibilidad de sustituir o de complementar fármacos actualmente usados, y reducir efectos adversos asociados a los fármacos y tratamientos actuales.

## 45 Ejemplos

### **1. Administración nasal de sustancia de prueba de oligonucleótido inmunomodulador en un modelo murino de inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA**

#### Materiales y procedimientos

##### Animales

50 En el experimento se usaron ratones BALB/c hembra (8 semanas), obtenidos de B&K Sollentuna, Estocolmo, Suecia. Los ratones se alimentaron con una dieta para roedores completa de gránulos, R36 (Laktamin AB, Estocolmo, Suecia) y agua de calidad potable doméstica a voluntad. Los animales se mantuvieron en habitaciones para animales a 21 °C ± 3 °C y con una humedad relativa del 55 % ± 15 %. El sistema de ventilación se diseñó para dar 10 cambios de aire por hora. La habitación se iluminó para dar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La luz se enciende de 07:00 h a 19:00 h. Los ratones se mantuvieron en jaulas de policarbonato

transparentes (Macrolone tipo III) (área del suelo: 820 cm<sup>2</sup>), 5 en cada jaula. La cama en las jaulas fue cama 4HV Aspen (Tapvei, Finlandia). Cada jaula se identificó por una tarjeta en la jaula marcada con el número del estudio, número de grupo, sexo y números de animales.

#### Sensibilización y exposición a aerosol

- 5 Los ratones se sensibilizaron intraperitonealmente con 200 µl de OVA/gel de hidróxido de aluminio (1:3) en el día 0 y 12 (Fig. 1a). Se disolvió OVA (albúmina de huevo de pollo calidad V, Sigma, St. Louis, MO) en solución salina y se mezcló con gel de hidróxido de aluminio a una concentración de 50 µg/ml por rotación a 4 °C durante 3 h. En los días 23, 26, 30 y 33 (véase la Fig. 1 a), los ratones se expusieron en los pulmones por inhalación de OVA aerosolizada durante 30 minutos usando una cámara de exposición de Batelle. Los aerosoles se generaron por un nebulizador de aire comprimido (Collison 6 chorros) a flujo de aire 7,4 l/min usando una concentración de nebulizador de 10 mg/ml de OVA disuelta en PBS (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). El grupo de control con animales no sensibilizados no recibió otro tratamiento distinto de OVA aerosolizado en el día 23, 26, 30 y 33. También hubo un grupo de control de ratones sensibilizados que no recibieron exposición a aerosol.

#### Oligonucleótido

- 15 En este modelo de OVA (Fig. 1a) se probó un oligonucleótido seleccionado, IDX9059 (SEC ID N° 8, Tabla 1). Los oligonucleótidos se sintetizaron por biomers.net GmbH, Ulm, Alemania y se guardaron congelados a -20 °C.

#### Formulación

El oligonucleótido inmunomodulador se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Fluka Biochemika Ultra, Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

- 20 Tratamiento de inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA

En este experimento se administró instilación intranasal de IDX9059 (1,247 µg/µl) en el día 16 y 21 en un entorno

profiláctico (Fig. 1a). La sustancia se administró en 40 ml de PBS dando una dosis de ~50 µg/ratón (49,88 µg/ratón).

Los dos grupos de tratamiento de referencia sensibilizados se instilaron con PBS, el mismo volumen total que para el compuesto de prueba en el día 16 y 21.

- 25 Análisis de los parámetros de inflamación de las vías respiratorias

- Se sacrificaron ratones por dislocación cervical 42 h después de la última exposición al aerosol de OVA. La tráquea se canuló con tubo de polietileno (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.) y se realizó lavado broncoalveolar (BAL) usando 4 alícuotas x 1 ml de disolución salina equilibrada con Hank fría en hielo (HBSS) (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). El líquido BAL se centrifugó (400 g, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante se recuperó y se congeló para análisis posteriores. Las células se resuspendieron en 0,4 ml de PBS y el número total de leucocitos se contó usando exclusión con azul de tripano en una cámara de Bürker. Preparaciones de Cytospin (Cytospin 3, Shandon, Runcorn, RU) por duplicado de células del líquido BAL se tiñeron con tinción de May Grünwald Giemsa para los recuentos diferenciales, usando criterios morfológicos convencionales.

#### Análisis estadístico

- 35 Se realizaron comparaciones estadísticas usando análisis unilateral de la varianza (ANOVA) usando la corrección a posteriori de Dunnett para comparar con control sensibilizado de ratones tratados con PBS (GraphPad Prism 4). Los datos se muestran como media ± desviación estándar. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró significativo.

#### Resultados

- 40 El modelo de asma alérgico inducido por albúmina de huevo es un modelo ampliamente usado para reproducir la eosinofilia de las vías respiratorias, inflamación pulmonar y niveles elevados de IgE encontrados durante asma. El análisis de este modelo se basa en indicadores generales de asma tales como análisis de BAL en el que el tipo y cantidad de células inflamatorias infiltrantes se identifican y se cuentan respectivamente.

- 45 Por consiguiente, las células del líquido BAL derivadas de cada ratón se contaron como se ha descrito y los valores se representaron como un histograma combinado que proporciona valores medios para los diferentes grupos (Fig. 1b).

En términos generales, el nivel de inflamación inducida de las vías respiratorias fue alto como se indica por una gran entrada de los 4 tipos analizados de células en los pulmones de los animales (grupo PBS). Los grupos de control no demostraron signos de inflamación inducida, confirmando que los animales no presentaron una respuesta alérgica

natural a la proteína albúmina de huevo del aerosol y que la proteína albúmina de huevo usada no se contaminó con, por ejemplo, LPS.

La ausencia completa de cualquier signo de inflamación en los grupos de control de "no aerosol" confirmó que el procedimiento experimental de inmunización con OVA no induce por sí mismo inflamación pulmonar.

- 5 Tras el tratamiento nasal, la sustancia de prueba de SEC ID N° 8 [IDX9059] tuvo un efecto reductor sobre células inflamatorias, es decir, leucocitos ( $P < 0,001$ ), eosinófilos ( $P < 0,001$ ) y linfocitos ( $P < 0,05$ ).

En este modelo *in vivo* de asma alérgica, el leucocito, es decir, PMN, principalmente eosinófilo, desempeña una función importante en la inflamación pulmonar. Se observó una reducción estadísticamente significativa en el número de leucocitos, eosinófilos y linfocitos que infiltran el líquido BAL en animales cuando se trataron con el compuesto inventivo de SEC ID N° 8 [IDX9059]. Esto indica que el compuesto inventivo puede prevenir la inflamación mediante inhibición de la infiltración de PMN.

## **2. Pleuritis inducida por tioglicolato en ratones C57/Bl6**

### Materiales y procedimientos

- 15 Se estableció un modelo animal para estudiar el efecto de oligonucleótidos según una realización de la presente invención sobre la migración de células y permeabilidad vascular.

Se anestesiaron ratones por una inyección intraperitoneal de 0,15-0,20 ml de una mezcla de ketamina (Ketalar® Parke-Davis; 25 mg/ml) y xilazina (Narcoxyll vet.® Veterinaria AG; 5 mg/ml).

20 La vena yugular izquierda se canuló con tubo de polietileno (PE10) para administración intravenosa (i.v.). Se hizo una incisión en la piel en el lado derecho del pecho. Tras la desecación del músculo subyacente se indujo pleuritis (inflamación del saco pulmonar) por una única inyección intrapleurales de 100 de tioglicolato (Sigma). Se usó PBS estéril como control negativo. Se inyectó dextrano conjugado con FITC en PBS (100  $\mu$ l, 30 mg/ml) i.v. Después de 4 h, los animales se sacrificaron con una sobredosis de anestesia, el pecho se abrió cuidadosamente y el exudado se eliminó por aspiración y se anotó el volumen. Entonces, el tórax se aclaró con 1 ml de EDTA 3 mM frío en hielo en PBS. Se desechó el exudado que estaba contaminado con glóbulos rojos.

25 El exudado y el material de aclarado se centrifugación a 1500 g durante 5 min y el sobrenadante se usó para la medición de la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro (Fluoroskan Acsent, LabSystems) y se calculó el volumen de eliminación de FITC-dextrano. El sedimento se resuspendió en PBS con 0,1 % de BSA durante 15 min para bloquear la unión de anticuerpo no específica. Se usaron 10  $\mu$ l de suspensión de células para recuento diferencial de WBC en una cámara de Bürker.

30 Las células del exudado se tiñeron con anticuerpos específicos para neutrófilos y macrófagos y se analizaron por citometría de flujo (software FACSort y CellQuest, BD). El análisis incluyó número de leucocitos total, basado en sus aspectos típicos en la dispersión directa y lateral. PMN y macrófagos se identificaron adicionalmente por su expresión de Ly6G y F4/80, respectivamente.

35 Con el fin de probar el efecto antiinflamatorio de oligonucleótidos que reducen la migración de PMN según realizaciones de la presente invención, los compuestos a probar se administraron intraperitonealmente, a una dosis de 100  $\mu$ l, es decir, 50  $\mu$ g/ratón, aproximadamente 20 minutos antes de la inducción de pleuritis. En este estudio se probaron IDX9010, IDX9054, IDX9059 (SEC ID N° 2, 7 y 8, respectivamente, Tabla 1) y IDX 0150 (SEC ID N° 13).

### Resultados

40 El modelo de pleuritis inducido por tioglicolato es uno de los modelos de elección para el cribado práctico de nuevos fármacos en desarrollo, aunque es técnicamente complicado y puede mostrar valores dispares individuales ocasionales. Sin embargo, este modelo está limitado en el número de animales que pueden probarse simultáneamente.

Los resultados mostraron que los animales respondieron al agente inductor de la inflamación, tioglicolato, por una alta inmigración de PMN en la cavidad pleural, y la acumulación de edema pleural.

45 Los ratones (n=4) que recibieron IDX9010 mostraron un número reducido de PMN del 68,2 % (Fig 2a), pero ninguna reducción en el edema (datos no mostrados). Los ratones administrados con IDX9054 (n=4) no mostraron reducción en los números de PMN, pero pudieron reducir el edema el 36 % (datos no mostrados). IDX9059 mostró reducción en tanto la acumulación de PMN (25,1 %, Fig. 2b) como edema (31 %) (datos no mostrados) en un grupo de 7 animales. Los ratones (n=5) administrados con IDX0150 mostraron 40,9 % de reducción en números de PMN, y 68,2 % de reducción en edema (datos no mostrados). Los resultados representan media  $\pm$  DE.

50 Los experimentos usando un anticuerpo anti-PMN mostraron que el Ab anti-PMN podría reducir igualmente PMN y edema a niveles similares a los compuestos inventivos (datos no mostrados). La administración profiláctica de

compuestos inventivos en pleuritis inducida por tioglicolato condujo a la reducción de la migración de PMN en la cavidad pleural.

### **3. Microscopía intravital en un modelo murino de inflamación vascular**

5 Se investigó el efecto antiinflamatorio *in vivo* del oligonucleótido IDX9059 (SEC ID N° 8, Tabla 1) sobre la extravasación de leucocitos en ratones. En respuesta a un estímulo quimiotáctico, células inflamatorias transmigran las paredes de vasos sanguíneos hacia un gradiente de estímulo. Para transmigrar, las células deben primero adherirse intermitentemente a las paredes internas del vaso, es decir, rodamiento (R), después empezar a adherirse más firmemente, adherencia (A), y luego migrar fuera al tejido circundante, trans migración (T). Se usó el factor de activación de plaquetas (PAF) para inducir este proceso inflamatorio. En receptores normales sin estimular, el orden de estos eventos fue R>A>T. Después de la exposición a PAF, este orden se invirtió, T>A>R, mostrando que las células empezaron a adherirse y a transmigrar.

#### Introducción

15 La movilización de leucocitos es un requisito previo para una respuesta inflamatoria. En vasos sanguíneos, una serie de eventos entre glóbulos blancos y endotelio conducen a la acumulación de células inflamatorias en un sitio de lesión o inflamación (Lindbom, 1983). Una célula importante en esta cascada de eventos es la célula polimorfonuclear (PMN). Las PMN son transportadas en la corriente sanguínea. La corriente sanguínea tiene una mayor velocidad en el centro del vaso sanguíneo y una menor velocidad hacia el margen que permite el contacto entre la PMN y la pared del vaso sanguíneo. Los mecanismos moleculares facilitan la adherencia de PMN al endotelio (Penberthy y col., 1997). Un grupo de tales moléculas se llaman selectinas. Al principio, esta interacción es solo parcial haciendo que las PMN rueden a lo largo del endotelio. Estimuladas por moléculas pro-inflamatorias, esta adherencia se vuelve más firme, haciendo que las PMN se adhieran al endotelio, un fenómeno llamado adherencia. La adherencia permite que las PMN trans migren activamente a la capa endotelial y posteriormente entren en el tejido conjuntivo y se dirijan adicionalmente por un gradiente de factores inflamatorios hacia el epicentro de la inflamación.

25 Todos estos eventos pueden estudiarse *in vivo* por microscopia intravital. La microscopia intravital permite el estudio de células en vaso pequeño, y en el tejido conjuntivo circundante.

Se han estudiado vénulas adecuadas, por ejemplo, en el músculo tenuissimus en conejos, y en el músculo cremáster de ratones.

30 Este ejemplo trata de microscopía intravital en el músculo cremáster de ratones. El músculo cremáster es el músculo que controla la temperatura de los testículos en el escroto. La vasculatura de este músculo puede exponerse fácilmente bajo un objetivo de inmersión en agua, superfusado con solución salina tamponada a temperatura corporal. Las sustancias quimiotácticas o pro-inflamatorias pueden añadirse al tampón de superfusado y pueden añadirse sustancias farmacológicas al superfusado o en el animal.

35 El rodamiento, adherencia y trans migración pueden además estudiarse por ayuda de grabaciones de vídeo de lapso de tiempo y las grabaciones pueden después usarse para la cuantificación de células o mediciones de distancias atravesadas.

El objetivo de este estudio era estudiar efectos del compuesto inventivo IDX9059 sobre la migración de células inflamatorias en vénulas después de la estimulación de PAF en el ratón.

#### Materiales y procedimientos

40 Material animal y condiciones: Ratones C57BL/6 SPF de Scanbur AB, Sollentuna, Suecia, se mantuvieron en una habitación para animales con temperatura controlada ( $21 \pm 2$  °C), ciclos de luz-oscuridad de 12 h cada uno, y se les dejó libre acceso a comida y agua.

45 Compuesto de prueba: El oligonucleótido SEC ID N° 8 [IDX9059] se sintetizó por biomers.net GmbH, Ulm, Alemania, bajo condiciones no GMP y se proporcionó en disolución de PBS. El oligonucleótido se almacenó a -20 °C como disoluciones madre y se preparó 2-3 días antes del inicio del experimento.

Formulación: El oligonucleótido se diluyó adicionalmente en PBS (Fluka<sup>™</sup>, Sigma) a temperatura ambiente. La concentración se ajustó por ayuda de espectrofotometría de UV (SmartSpec<sup>™</sup> 3000, BIO-RAD, Hercules, EE.UU.) al 95 % de exactitud, hasta que se alcanzó la concentración deseada.

50 Tratamiento de inflamación inducida por PAF: Los animales se administraron con IDX9059 s.c., 50 µg/100 µl/ratón, aproximadamente 20 minutos antes de la inducción de la inflamación.

Microscopía intravital del reclutamiento de leucocitos: Se usaron grupos de 4 ratones. Los ratones se anestesiaron por una inyección intraperitoneal de 0,15-0,20 ml de una mezcla de ketamina (Ketalar®; Pfizer AB, Sollentuna, Suecia; 25 mg/ml) y xilazina (Narcoxyl vet.®; Intervet International B.V., Los Países Bajos; 5 mg/ml). La vena yugular izquierda se canuló con tubo de polietileno (PE10) para administración continua de anestesia. Se hizo una incisión

ventral en el escroto izquierdo y se extrajo un testículo. El músculo cremáster se diseccionó sin fascia, se cortó y se sujetó plano sobre un pedestal transparente para permitir la trans-iluminación. El testículo se sujetó luego al lado. La preparación se mantuvo húmeda y caliente por superfusión continua de un tampón de bicarbonato controlado a 37 °C de temperatura, manteniendo niveles fisiológicos de temperatura, pH y tensiones de gas. La extravasación de leucocitos se indujo mediante la adición de factor de activación de plaquetas (PAF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 100 nM) a la disolución de superfusión durante 60 min. Las mediciones de rodamiento, adhesión y trans migración se hicieron antes y después de la estimulación. Las grabaciones de vídeo se obtuvieron de vénulas bien definidas de 20-50 µm de ancho. El rodamiento se determinó como el número de leucocitos que pasan una línea de referencia perpendicular a la circulación sanguínea durante 30 segundos. Las células dentro del vaso se clasificaron como adherentes si permanecieron estacionarias durante más de 30 segundos. Las células transmigradas se contaron en el tejido extravascular dentro de una distancia de 70 µm del vaso estudiado.

Todas las observaciones microscópicas se hicieron usando un microscopio intravital Leitz Orthoplan con un objetivo de inmersión en agua Leitz SW25 (Leitz Wetslar GMBH, Alemania). Las imágenes se televisaron y se grabaron usando una videocámara Panasonic WV-1550/G (Panasonic, Japón).

#### 15 Resultados

Para transmigrar, las células empiezan a rodar, después empiezan a adherirse más firmemente, y luego migran fuera al tejido circundante. El factor de activación de plaquetas (PAF) se usó para inducir este proceso inflamatorio y en vasos sin estimular normales el orden de estos eventos fue R>A>T. En ausencia de quimioatrayente (PAF), SEC ID N° 8 [IDX9059] pudo reducir el rodamiento el 81,4 % y la adherencia el 41,9 % (Fig. 3a).

20 Después de la exposición a PAF, el orden de eventos (rodamiento, adhesión y trans migración) se invirtió, T>A>R, mostrando que las células empezaron a adherirse y a transmigrar. De acuerdo con esto, el resultado muestra que cuando PAF se añadió, las células transmigrantes desde un nivel basal de 1,7 células/campo (antes de añadir PAF, Fig. 3a), alcanzaron 20,66 (después de añadir PAF, Fig. 3b). Hubo una reducción de células de rodamiento de 22,3 células/campo (antes de añadir PAF, Fig. 3a) a 7,7 (después de añadir PAF, Fig. 3b), y las células adherentes permanecieron a aproximadamente 14 células/campo. En esta condición, SEC ID N° 8 [IDX9059] redujo el rodamiento, adherencia y trans migración después de la exposición a PAF. La reducción fue para células de rodamiento 48,4 %, células adherentes 28,5 % y célula transmigrante 54,4 %, que muestran que SEC ID N° 8 tiene propiedades antiinflamatorias que podrían ser eficaces en diferentes niveles de inflamación y que actúan sobre diferentes mediadores inflamatorios.

30 Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran los efectos antiinflamatorios de SEC ID N° 8 [IDX9059]. Sorprendentemente, SEC ID N° 8 mostró efectos reductores sobre los valores de rodamiento y adherencia en ausencia de agente quimiotáctico. Esto es una indicación de que esta secuencia tiene posibilidad de usarse en situaciones clínicas en las que se prefiere la inhibición de la infiltración de PMN.

#### 35 4. Estudio del efecto inhibitor de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre la lesión isquémica cerebral en un modelo de rata experimental

El objetivo del estudio fue investigar el efecto inhibitor sobre lesión cerebral isquémica por oligonucleótidos inmunomoduladores en un modelo experimental de rata de isquemia cerebral. El estudio animal se realizó en las instalaciones de la División de Investigación Vascular Experimental, Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Lund, Lund, Suecia.

#### 40 Introducción

Se ha mostrado que la tolerancia contra la lesión isquémica puede inducirse por LPS mediante TLR4 en diversos órganos tales como corazón, cerebro y riñón (Heemann y col. 2000, Rowland y col., 1997; Tasaki y col., 1997). Aunque el mecanismo de protección no se entiende muy bien, el paradigma es que una pequeña respuesta inflamatoria precondicionando LPS mitiga el posterior daño de la respuesta inflamatoria asociada a un estímulo secundario más poderoso. Hay tanto similitudes como diferencias entre las rutas de señalización de TLR conocidas y tanto TLR4 como TLR9 se expresan por algunas células del sistema inmunitario y sistema nervioso central (McKimmie y Fazakerley 2005; Tang y col., 2007). Por consiguiente, se cree que los oligodesoxinucleótidos CpG provocan la activación de TLR9 dentro de poblaciones de células seleccionadas para promover la inmunidad innata e inducir inmunidad adaptativa sesgada en Th1.

50 Un objetivo de este estudio fue investigar si los compuestos específicos identificados por los presentes inventores también podrían disminuir o no la lesión isquémica en el cerebro similar a la tolerancia inducida por LPS a lesión cerebral isquémica.

#### Materiales y procedimientos

55 Material animal y condiciones: Las ratas usadas fueron ratas Wistar Hannover puras obtenidas de Harlan Horst, Los Países Bajos. El peso de cada rata fue aproximadamente 350-400 gramos. Las ratas se mantuvieron en jaulas abiertas convencionales del tipo Macrolon 3. Las jaulas se alojaron en rejillas abiertas bajo flujo de aire continuo

detrás de cortinas de plástico. La cama convencional se compró de Scanbur-BK, Sollentuna, Suecia. La cama se cambió una vez a la semana. La temperatura en las habitaciones para animales fue 18 °C - 22 °C y se controló mediante el sistema de ventilación ambiental en el laboratorio. El ciclo de luz fue oscuridad de 12 horas y luz de 12 horas (las luces se encienden a las 06:00).

- 5 Las ratas se administraron con dieta para ratas normal comprada de Scanbur-BK, Sollentuna, Suecia. Se rellenaron botellas de agua cuando fuera necesario durante la aclimatación y experimentación. La dieta y el agua se administraron a voluntad.

Las ratas tuvieron estado de SPF de FELASA y el sistema de alojamiento y de cambio se diseñó para asegurar que el estado de SPF se preservara durante el estudio. Personal instruido manipuló las ratas. Expertos veterinarios estuvieron disponibles en poco tiempo del Departamento de Veterinaria en LU. Los registros diarios y las decisiones se hicieron con referencia al bienestar animal.

Compuestos de prueba: IDX9010, IDX9054, IDX9059 e IDX9074 (SEC ID N° 2 y 7-9, respectivamente, en la Tabla 1) se probaron para su eficacia *in vivo* de reducir la lesión cerebral en un modelo de rata experimental de isquemia cerebral. Además, un inhibidor de proteínas cinasas activadas por mitógeno [1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofiniltio)butadieno; C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>S<sub>2</sub>] (U0126, Sigma-Aldrich) y PBS (Invitrogen) sirvieron de controles positivo y negativo, respectivamente. También se usó un tratamiento de combinación de IDX9059 y U0126 en una etapa posterior en el estudio. Todas las sustancias IDX se sintetizaron por Biomers.net GmbH, Ulm, Alemania bajo condiciones no GMP y se proporcionaron en disolución de PBS. Los compuestos de prueba se almacenaron a -20 °C como disoluciones madre. Con excepción de U0126, y la terapia de combinación (U0126+IDX9059), todas las otras sustancias de prueba se administraron de un modo ciego.

Formulación: Antes del inicio de un experimento, la concentración de trabajo (1 µg/µl) se preparó por dilución adicional de los compuestos en PBS a temperatura ambiente. La concentración se ajustó por ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec™ 300, Bio-Rad, Hercules, EE.UU.) al 95 % de exactitud.

Experimentos animales y dosificación: Las ratas se anestesiaron por isoflurano (4,5 %) mezclado con NO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> (70 %: 30 %). Se usó láser Doppler para monitorizar la circulación sanguínea cortical de la arteria cerebral media (ACM). Se introdujo un filamento en la arteria carótida interna, se siguió hacia adelante hasta que ocluyó la circulación sanguínea en la ACM derecha; una reducción superior al 80 % en la señal del láser Doppler (circulación sanguínea cortical) confirmó la oclusión.

La tensión arterial, gases de la sangre y glucosa en sangre se controlaron durante la operación. Después de 90 minutos de oclusión, el filamento se retiró y la circulación de sangre continuó en la ACM y se restituyó la circulación sanguínea cortical (reperfusión). Solo los animales que tuvieron más del 80 % de disminución en la circulación sanguínea tras la oclusión y alta recirculación de la circulación sanguínea cortical se incluyeron en el estudio.

La temperatura corporal y el comportamiento neurológico (puntuación) se controlaron bajo la operación y 0, 1, 2, 24, 48 horas después de la recirculación. 100 µl de los compuestos de prueba junto con 200 µl de PBS se inyectaron intraperitonealmente a las ratas 0 y 24 horas después de la recirculación. Los animales se sacrificaron 48 horas después del final de la operación, y el cerebro se extrajo rápidamente y se enfrió en disolución de tampón bicarbonato. Se prepararon rebanadas coronales de dos mm de espesor (6 rebanadas) del cerebro y se tiñeron con 1 % de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; Sigma Aldrich) disuelto en solución salina. El volumen de infarto se calculó por integración numérica del área isquémica de cada rebanada usando la regla del trapecio y se expresó como porcentaje de volumen cerebral total en las rebanadas usando el programa de software Brain Damage Calculator 1.1 (MB Teknikkonsult, Lund, Suecia).

Estadística: Los análisis estadísticos se realizaron usando Prism (Graphpad versión 4.03, San Diego, CA, EE.UU.). Se usó prueba de la t de Mann-Whitney no paramétrica para calcular la significancia estadística. El valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo (\*).

#### 45 Resultados

La inducción de tolerancia a muerte celular isquémica por oligonucleótidos específicos se investigó en un modelo de isquemia cerebral *in vivo* en rata Wistar Hannover.

En total hubo 7 grupos diferentes en el estudio. Se usaron un total de aproximadamente 60 ratas en el estudio con 30 % de mortalidad debido a la operación. Los datos se recogieron durante los experimentos, tanto conjuntamente con la operación como en el periodo de seguimiento.

Tras la tinción con TTC, el tejido cerebral intacto era rojo brillante mientras que las regiones de lesión eran pálidas-blancas (Fig. 4a). Los cerebros se seccionaron y cada sección se fotografió y se analizó con un programa de imágenes (véase Procedimientos). Las figuras describen diversos aspectos del infarto cerebral; área de infarto total (Fig. 4b), el área de penumbra o la necrosis nerviosa selectiva (NNS) (Fig. 4c), y el centro isquémico (el área blanca como se muestra en la Fig. 4a, interpretada como el núcleo) (Fig. 4d).

El estudio se realizó de un modo ciego para IDX9010 (sustancia A), IDX9074 (sustancia B), IDX9054 (sustancia C), IDX9059 (sustancia D) y PBS (sustancia E), pero no para U0126 o el tratamiento de combinación. Como puede apreciarse en las Figuras 4b y 4d, hubo una marcada reducción (35-40 %) en el volumen de infarto por la sustancia D (IDX9059) y la sustancia de control U0126. No hubo diferencia significativa en la reducción de NNS con diferentes sustancias (Fig 4c). Después de desenmascarar el estudio, el último grupo introducido en el estudio fue la combinación de IDX9059 y U0126. La reducción no fue aditiva como era de esperar, sino inferior a la observada por cada una de las sustancias solas.

Se registraron los parámetros fisiológicos durante el experimento y el resultado de una evaluación neurológica. No hubo diferencia en los parámetros fisiológicos entre los grupos (datos no mostrados). Sin embargo, la evaluación de neurología se correlacionó bien con mejoras por SEC ID N° 8 [IDX9059].

Los resultados muestran que el tratamiento con SEC ID N° 8 [IDX9059] después de la inducción del accidente cerebrovascular puede servir de post-acondicionamiento y proteger al cerebro de lesión isquémica.

Se ha mostrado previamente que el inhibidor de MEK1/2 (U0126) puede reducir el 30-40 % el tamaño del infarto (Henriksson M, 2007, Wang ZQ, 2004). En el presente estudio, esta sustancia sirvió de control positivo y cuando se administró i.p. redujo el volumen de infarto el 33 %. También hubo un buen efecto sobre la evaluación de neurología con mejora por U0126 a las 48 horas; así, se confirma este experimento realizado según otros investigadores (Henriksson y col., 2007).

Recientemente, Stevens y col. (2008) mostraron que el preacondicionamiento con oligonucleótidos que contienen CpG puede inducir neuroprotección contra lesión isquémica y esta tolerancia es dependiente de TNF-alfa. Entre los 4 compuestos inventivos (IDX9010, IDX9074, IDX9054 y IDX9059) usados en este estudio, IDX9059 y IDX9074 mostraron un mejor efecto neuroprotector. Sin embargo, cuatro oligonucleótidos se han usado previamente en estudios de esplenocitos de ratas Wistar para evaluar la expresión de TNF alfa usando PCR cuantitativa. Los resultados mostraron que IDX9054 e IDX9010 pudieron inducir la expresión de ARNm de TNF alfa, mientras que IDX9059 e IDX9074 dejaron de inducir TNF alfa. Así, puede sugerirse que hay otros factores requeridos, además de TNF alfa, que proporcionan conjuntamente neuroprotección. Además, en el estudio realizado por Steven y col. (2008), el efecto protector de oligonucleótidos que contienen CpG solo se observó cuando se administró profilácticamente 1-14 días antes de la inducción de accidente cerebrovascular. En el presente estudio, los fármacos inventivos se administraron terapéuticamente 90 min después de la inducción del accidente cerebrovascular, enfatizando la potencia de SEC ID N° 8 [IDX9059].

Después de desenmascarar el presente estudio, SEC ID N° 8 [IDX9059] demostró ser más eficaz en reducir la lesión isquémica en el cerebro. Como sustancia de control positivo, U0126 tuvo igualmente un efecto pronunciado en reducir la lesión isquémica, también se evaluó un tratamiento de combinación de U0126 y SEC ID N° 8 [IDX9059]. La reducción de lesión isquémica obtenida por el tratamiento de combinación no fue como era de esperar y el motivo de esto es desconocido. Sin embargo, podrían ser que las dos sustancias antagonizaran cada una otro efecto.

Así, este estudio *in vivo* demostró el efecto neuroprotector de los compuestos inventivos en el tratamiento de accidente cerebrovascular en un modelo de rata de isquemia cerebral.

### **5. Estudio del efecto inhibidor de oligonucleótido inmunomodulador sobre la lesión isquémica miocárdica en un modelo de corazón de rata perfundido aislado**

El objetivo de este estudio fue investigar el posible efecto inhibidor de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre la lesión isquémica de corazón en un modelo de corazones de rata perfundidos aislados. El estudio animal se realizó en el departamento de animales, en el Hospital universitario de Ullevål, Oslo, Noruega.

#### Introducción

La capacidad para reducir el tamaño del infarto de miocardio interrumpiendo la reperusión miocárdica con episodios efímeros de re-oclusión coronaria ha ganado interés en la fase de reperusión como diana para la cardioprotección, un fenómeno llamado post-acondicionamiento isquémico (IPost). El mecanismo de protección inducida por post-acondicionamiento isquémico no se entiende completamente, pero se ha mostrado que el procedimiento elige como diana importantes mediadores de la lesión letal por reperusión reduciendo el estrés oxidativo, disminuyendo la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  intracelular, mejorando la función endotelial y atenuando la muerte apoptótica de cardiomiocitos (revisado en Yellon).

La intervención de preacondicionamiento isquémico (IPC) también se usa para reducir el tamaño del infarto de miocardio en el entorno experimental sometiendo el corazón a uno o más episodios de isquemia miocárdica no letal y reperusión antes de la oclusión sostenida de la arteria coronaria. Tal preacondicionamiento sería beneficioso como tratamiento profiláctico antes de la cirugía de derivación cardíaca (revisado en Yellon). Tanto el post- como el pre-acondicionamiento activa grupos similares de cascadas de señalización aguas abajo en la ruta RISK (ruta de la cinasa de rescate de lesión por reperusión) que median en la protección isquémica en el corazón o cerebro (Pignataro, 2008). Sin embargo, tanto IPC como IPost necesitan un tratamiento invasivo que se aplica directamente

al miocardio con el fin de lograr cardioprotección, que en algunos entornos clínicos puede ser poco práctico y perjudicial.

Una estrategia alternativa más flexible es aplicar el estímulo cardioprotector a un órgano o tejido remoto del corazón, un enfoque encapsulado por el fenómeno de precondicionamiento isquémico remoto (RIPC). El actual mecanismo mediante el cual un episodio de isquemia y reperfusión breve en un órgano o tejido ejerce protección contra un posterior ataque sostenido de isquemia-lesión por reperfusión en un órgano o tejido remoto es actualmente confuso.

Los oligodesoxinucleótidos provocan la activación del receptor 9 similar a Toll (TLR9) dentro de poblaciones de células seleccionadas para promover la inmunidad innata e inducir inmunidad adaptativa sesgada de Th1. Esta propiedad de los oligonucleótidos modula la inflamación y puede proporcionar protección contra enfermedades infecciosas y no infecciosas. La activación de TLR9 por oligonucleótidos también elige como diana una serie de proteínas cinasas en la ruta RISK (Sun-Hey Lee 2007) similar a IPost y IPC. En el ejemplo previo (Ejemplo 4), los inventores mostraron que el oligonucleótido IDX9059 puede reducir la isquemia-lesión por reperfusión en el cerebro. Por tanto, un objetivo de este estudio era investigar si los oligonucleótidos que se usaron para reducir la lesión cerebral en el estudio previo también podían ejercer o no efectos cardioprotectores durante la isquemia miocárdica-reperfusión.

#### Materiales y procedimientos

Material animal y condiciones: Ratas Wistar Hannover macho obtenidas de Scanbur AS, Nittedal, Noruega, se usaron en este experimento. Las ratas se mantuvieron en el establo de animales central del Hospital universitario de Ullevål. Personal apropiadamente autorizado e instruido manipuló las ratas. Los registros diarios se hicieron en lo referente al bienestar animal. El peso de cada rata fue aproximadamente 250-350 gramos. Las ratas se aleatorizaron en dos grupos experimentales (prueba y control, n= 8 en cada grupo).

Las ratas se mantuvieron en jaulas abiertas convencionales con cama convencional. La temperatura en las habitaciones para animales fue 18 °C - 22 °C y se controló mediante el sistema de ventilación ambiental en el laboratorio (humedad 55-60 %). El ciclo de luz fue oscuridad de 12 horas y luz de 12 horas (las luces se encienden a las 06:00).

Se suministró una dieta de gránulos completa RM3 (Scanbur BK AS, Nittedal, Noruega) a voluntad, y las ratas tuvieron acceso libre a botellas de agua potable fresca.

Compuestos de prueba: El oligonucleótido basado en ADN IDX9059 (SEC ID N° 8, Tabla 1) se sintetizó por Biomers.net GmbH, Ulm, Alemania (Apéndice 1) bajo condiciones no GMP. El compuesto se proporcionó en disolución de PBS y se guardó a -20 °C como disolución madre tras la llegada.

Formulación: Antes del inicio de un experimento, la concentración de trabajo (1 µg/µl) se preparó por dilución adicional de la disolución madre con PBS (Fluka, Sigma) a temperatura ambiente, según InDex SOPB015. La concentración se ajustó por ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec™ 300, Bio-Rad, Hercules, EE.UU.) al 95 % de exactitud. El compuesto de prueba se mantuvo a 4 °C hasta uso.

Experimentos animales y dosificación: Se administraron fármaco de prueba (1 µg/µl) o placebo (PBS, vehículo del fármaco de prueba) (100 µl) subcutáneamente 24 h antes del aislamiento del corazón. El experimento se realizó de un modo ciego.

Las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 5 % de pentobarbital sódico (60 - 80 mg kg<sup>-1</sup>) y heparinizado (500 UI i.p). El corazón se recogió y se perfundió durante 20 minutos para la estabilización a tensión constante de 70 mm de Hg (modo de Langendorff modificado a 37 °C) usando tampón de Krebs-Henseleit como perfusato (mmol/l: NaCl 118,5; NaHCO<sub>3</sub> 25; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O 1,2; glucosa/1 H<sub>2</sub>O 11,1; CaCl<sub>2</sub> 1,8). El tampón se gasificó con 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub> para proporcionar oxígeno y mantenerlo a un pH fisiológico. La temperatura del corazón se mantuvo constante durante el experimento por el tubo de vidrio de alrededor perfundido con agua de una cámara de calentamiento. Un globo de látex lleno de líquido (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten, Alemania) se insertó en el ventrículo izquierdo para medir las presiones ventriculares por un sistema Powerlab (AD Instruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW 2154, Australia). La presión diastólica final ventricular izquierda (LVEDP) se fijó a 5-10 mm de Hg, y se midieron cambios en LVEDP. Se calcularon la presión desarrollada ventricular izquierda (LVDevP = presión sistólica ventricular izquierda (LVSP) - LVEDP) y máximo y mínimo del desarrollo de presión ventricular izquierda (LVdp/dtmáx y LVdp/dtmin). Se midió el flujo coronario (CF) por recogidas cronometradas del efluente coronario. Se contaron las arritmias como una respuesta todo o nada (asistolia o fibrilación ventricular) durante los 30 primeros minutos de reperfusión y se evaluaron a partir de curvas de presión como frecuencia cardíaca (HR). La temperatura miocárdica se midió insertando una sonda de temperatura en el ventrículo derecho.

Corazones con LVSP ≤ 100 mm de Hg, CF ≤ 8 o ≥ 20 ml min<sup>-1</sup>, HR ≤ 220 latidos por minuto antes de la isquemia o arritmias irreversibles durante más de 30 minutos durante la reperfusión se excluyeron del estudio.

Al final de la reperfusión, los corazones se cortaron en cuatro rebanadas de un mm y tres rebanadas de dos mm (corazones fijados en matriz acrílica de cerebro de rata por AgnThor's AB, Lidingö, Suecia). Las rebanadas de dos mm se congelaron sujetas en nitrógeno líquido y se guardaron para posibles análisis posteriores (transferencia Western, PCR en real tiempo).

5 Las cuatro rebanadas ventriculares de un mm (5-8 mm desde la punta) se incubaron a 37 °C en 1 % de cloruro de trifeníltetrazolio (TTC) en PBS durante 15 minutos. Después de la incubación, las rebanadas se presionaron suavemente entre dos placas de vidrio y se fotografiaron (Nikon, Colorfix5400). El área de infarto se midió como porcentaje del área total y se calculó con Adobe Photoshop y ScionImage (Infarct Area Calculation Macro file, Copyright ©1998 Rob Bell, Instituto Hatter, UCL, RU).

10 Se evaluaron la extensión de necrosis (tamaño de infarto) como criterio principal de valoración y las funciones cardíacas (LVEDP, LVSP, LVDevP, LVdp/dtmáx, LVdp/dtmín, HR, arritmias, CF) como criterios secundarios de valoración.

Estadística: Para tamaño de infarto: prueba de la t de Student, para análisis de datos continuos de mediciones repetidas de la varianza.

### 15 Resultados

La inducción de tolerancia a muerte celular isquémica por IDX9059 se investigó en un modelo *ex vivo* de corazón de rata aislado. Los corazones se escindieron y se perfundieron en un modo de Longendorff y se sometieron a un episodio de isquemia y reperfusión como se describe en Material y Procedimientos. Tras la tinción con TTC, los corazones se seccionaron y cada sección se fotografió y se analizó con un programa de imágenes (véase 20 Procedimientos). La lesión del infarto del ventrículo izquierdo mostró el 35 % de reducción en las ratas tratadas con IDX9059 en comparación con ratas tratadas con PBS (control de vehículo) (Fig. 5). También se investigaron diversos aspectos de la función cardíaca durante la reperfusión, sin embargo no se ha observado diferencia significativa en los datos funcionales en animales tratados con IDX9059 frente a control (datos no mostrados). Los resultados muestran claramente que el pre-tratamiento subcutáneo de ratas con IDX9059 puede reducir 25 significativamente el grado de lesión isquémica global, aquí el 35 %.

Los inventores han observado previamente que el oligonucleótido IDX9059 redujo el núcleo isquémico en un modelo de rata de isquemia cerebral. En el presente estudio se encontró que el pre-tratamiento de ratas con IDX9059 en un modelo de corazones de rata aislados/perfundidos aumentaba la tolerancia y reducía el grado de lesión isquémica.

30 En el modelo de corazón aislado, muchos de los factores que pueden ser beneficiosos no están presentes, tales como el efecto mediante leucocitos. Por consiguiente, se espera que los estudios *in vivo* puedan producir un efecto más pronunciado.

En el corazón aislado, la protección observada de IDX9059 puede ser debida a mecanismos iniciados en el propio corazón. Es razonable creer que esto es debido a cambios moleculares en los cardiomiocitos mediante una estimulación similar a precondicionamiento en términos de señalización y efectos, tras el pre-tratamiento con 35 IDX9059. Esto podría mediarse por diferentes componentes tales como proteínas de choque térmico, factor kappa B nuclear, proteínas cinasas (Hausenloy y col., 2005, y 2007, Valen G 2003, y 2005).

El experimento mostró que el tratamiento con IDX9059 reduce la migración de PMN en diferentes ejemplos anteriores e indica que el compuesto probado también ejerce un efecto protector mediante otros mecanismos tales como precondicionamiento.

### 40 6. Inhibición de la acumulación de neutrófilos en isquemia mesentérica por oligonucleótidos inmunomoduladores

#### Resumen

Se indujo isquemia intestinal en ratones por oclusión de la arteria mesentérica. Después de la reperfusión se evaluó la lesión al intestino delgado y grueso, además de al pulmón.

45 El efecto antiinflamatorio de IDX0150 (SEC ID N° 13, Tabla 1) se investigó por histología, ensayo de MPO, reducción de tetrasolio y acumulación de líquido del intestino delgado.

El estudio mostró que IDX0150 demostró efecto de mejora significativo en comparación con animales de control administrados con vehículo solo cuando se administra 20 minutos antes de la inducción de isquemia.

Los resultados indican que IDX0150 podría ser valioso para la reducción de la lesión por reperfusión en isquemia.

### 50 Materiales y procedimientos

Compuestos de prueba

Todos los compuestos se almacenaron a -20 °C como disoluciones madre y se prepararon 2-3 días antes de la iniciación de un experimento.

#### Formulación

- 5 Los oligonucleótidos se diluyeron adicionalmente en PBS (Fluka Biochemika Ultra, Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.) a temperatura ambiente. La concentración se ajustó por ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec™ 3000, BIO-RAD, Hercules, EE.UU.) al 95 % de exactitud, hasta que se alcanzó la concentración deseada (InDex SOP B015).

#### *Experimentos animales*

##### Departamento animal

- 10 El departamento animal de MTC es monitorizado y supervisado por el Departamento de Veterinaria del Instituto Karolinska. El departamento animal ha fijado rutinas para mantener una instalación para animales de alta calidad. El estudio animal se llevó a cabo en un laboratorio de investigación académica acreditado no GLP.

##### Animales

- 15 Ratonos BALB/cJ SPF hembra, edad 10-30 semanas (originarios de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EE.UU., se mantuvieron en el departamento CFGR de MTC en el Instituto Karolinska, Estocolmo). Los animales se agruparon y se dejaron aclimatarse durante al menos una semana antes del inicio de un experimento. Los animales se mantuvieron junto con centinelas que se probaron según regulaciones de FELASA (5) como mínimo dos veces al año.

##### Alojamiento

- 20 Los animales se mantuvieron en habitaciones a  $21 \pm 3$  °C y con una humedad relativa del  $55 \pm 15$  %. El sistema de ventilación ha sido diseñado para dar 10 cambios de aire por hora. La habitación se iluminó para dar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La luz estaba encendida de 06:00 a 18:00 horas.

Los ratones se mantuvieron en jaulas de policarbonato transparente (Macrolone tipo III, Scanbur AB, Sollentuna, Suecia) (área del suelo: 810 cm<sup>2</sup>), 8 en cada jaula.

##### Cama

- 25 La cama en las jaulas fue cama de Scanbur (Scanbur AB, Sollentuna, Suecia).

##### Enriquecimiento ambiental

Para el enriquecimiento ambiental, a los animales se les administró suministro de Sizzle-nest o Happi-Mat, (Scanbur AB, Sollentuna, Suecia)

##### Dieta y agua potable

- 30 Se suministró una dieta completa para roedores en gránulos, R36 (Lantmännen, Kimstad, Suecia) a voluntad. Los animales tuvieron acceso libre a botellas de bebida para animales con agua potable de calidad doméstica.

##### Identificación de animales, agrupamiento y tratamiento

- 35 Cada jaula se identificó por una tarjeta en la jaula marcada con el número del estudio, número de grupo y sexo. Los animales se marcaron individualmente en la cola con líneas transversas correspondientes al número del animal, usando un marcador de tinta permanente.

#### Procedimiento de prueba

##### Inducción de isquemia y reperfusión

- 40 El ratón se anestesió con isoflurano (Forene®, Abbott Scandinavia AB, Solna, Suecia), luego se mantuvo en anestesia quirúrgica (unidad de anestesia Univentor 400, AgnTho's AB, Lidingö, Suecia) y se colocó en una almohadilla caliente, controlada por un termómetro con termopar (Pharmacia AB, Uppsala, Suecia) controlado por un termistor rectal que mantenía una temperatura del cuerpo de 37 °C. Con la ayuda de un estereomicroscopio quirúrgico de operación (Leitz Wild, Wetslar, Alemania) se hizo una incisión de 4-5 cm de longitud en el abdomen y se localizó la arteria mesentérica (superior) craneal. Una fuerza de cierre de la pinza de microvasos, Biemer-clip, 0,20-0,25 N, Aesculap-Werke AG, Tuttlingen, Alemania) se puso sobre la arteria para ocluir completamente la corriente sanguínea indicada por la falta de pulsación y palidez. El abdomen se cerró y se colocó una almohadilla de gasa empapada con solución salina (0,9 % en peso/volumen<sup>-1</sup> de NaCl) sobre el abdomen. La circulación sanguínea se reincorporó después de 15 minutos, indicada por una vuelta del pulso y rojez en el vaso. El abdomen se cerró con grapas o suturas quirúrgicas. El ratón se administró con 2 ml de solución salina estéril s.c. para mantener condiciones fisiológicas. Se administró buprenorfina (Temgesic®, Schering-Plough Corp., New Jersey, EE.UU.), 0,05

a 0,1 mg/kg para analgesia. Después de 3 horas, el animal se anestesió y se muestreó sangre del plexo orbital del ojo. Se tomaron muestras de los intestinos e hígado para histología y otros análisis.

#### Tratamiento farmacológico

- 5 Inyecciones subcutáneas (s.c.) de 50 µg/100 µl de IDX0150 se administraron en el cuello del animal aproximadamente 20 minutos antes de la inducción de isquemia o inmediatamente después de empezar la reperfusión.

#### Signos clínicos

Cada ratón se observó regularmente hasta que se sacrificó. Se registraron todos los signos de enfermedad, salud y cualquier cambio de comportamiento.

- 10 Parámetros clínicos

Los efectos inflamatorios se clasificaron usando un sistema de puntuación inflamatorio, rojez intestinal: normal 0, poco rojo 1, rojo 2, muy rojo 3; líquido intestinal: normal 0, poco 1, mucho 2; comportamiento del animal: alerta 0, letárgico 2.

#### Homogenización de tejido de pulmón e intestinal para medición de MPO

- 15 Se recogieron los pulmones y el intestino delgado (100-200 µg) de ratones tratados con IDX0150 y PBS sometidos a isquemia intestinal y lesión por reperfusión. Los tejidos se homogeneizaron durante 30 segundos sobre hielo usando Disperser T 10 (IKA®-Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Alemania) en 1 ml de tampón RIPA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) que contenía EDTA 5 mM (Sigma Aldrich) y mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich). Las muestras se incubaron luego sobre hielo durante 30 min, después de lo cual el residuo se eliminó de los
- 20 homogeneizados por dos rondas de centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se recogieron, se separaron en alícuotas y se congelaron a -70 °C para posteriores mediciones de mieloperoxidasa (MPO). La MPO se analizó en los homogeneizados usando un kit de ELISA de MPO (Hycult biotechnology, Uden, Holanda) según las instrucciones del fabricante.

#### Resultados

- 25 La isquemia indujo una profunda respuesta inflamatoria que se observó como letargo y erección apilada de la piel, tras la autopsia los intestinos se hincharon, que contenían líquido y se inflamaron (Fig 6a). En el animal tratado con IDX0150 el intestino se inflamó menos (Fig. 6b). Usando un sistema de puntuación los animales inflamados tuvieron una puntuación de 6,5 que contrastó por una menor puntuación en animales que recibieron tratamiento i.p. de IDX0150 (Fig. 6c).

- 30 La mieloperoxidasa (MPO) es una hemo-proteína que se expresa abundantemente en neutrófilos polimorfonucleares y se usa como marcador de infiltración y activación de neutrófilos (Lau y Baldus, 2006). Los neutrófilos son los principales leucocitos que infiltran el tejido isquémico y son un contribuyente importante a la inflamación inducida.

- En este estudio, el efecto del compuesto de oligonucleótido IDX0150 (SEC ID N° 13, Tabla 1) sobre la infiltración de neutrófilos en el intestino delgado y pulmón en un modelo de ratón de isquemia intestinal y lesión por reperfusión se
- 35 investigó midiendo MPO en tejido homogeneizado. Los niveles de MPO en tanto tejido intestinal (Figs. 6d y e) como de pulmón (Figs. 6f y g) se redujeron en ratones tratados con IDX0150 en comparación con controles tratados con PBS. Esta disminución en MPO se observó si el compuesto se administró antes de la inducción de isquemia (Fig. 6d y f), además de después de empezar la reperfusión (Fig. 6e y g). La reducción observada en MPO indica que hay una infiltración reducida de neutrófilos en el tejido isquémico en respuesta a los compuestos de oligonucleótidos de
- 40 la invención.

Estos resultados también se reflejaron en los resultados clínicos con una reducción en la puntuación inflamatoria.

### **7. El efecto de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre la expresión de receptores de quimiocinas en células polimorfonucleares**

#### Introducción

- 45 IL-8 es una potente citocina proinflamatoria que tiene una función clave en el reclutamiento y activación de neutrófilos durante la inflamación. IL-8 reacciona con neutrófilos mediante dos tipos distintos de receptores (CXCR1 y CXCR2). La quimiotaxia de neutrófilos para IL-8 está mediada predominantemente por CXCR1 (78 %) y el resto por CXCR2. Otro potente quimioatrayente para neutrófilos es el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), que se une con alta afinidad al receptor BLT1 expresado sobre la superficie de neutrófilos. El objetivo de este estudio era investigar si los
- 50 compuestos inventivos podían disminuir o no la expresión de CXCR1/2 y BLT1 y así reducir la infiltración de PMN.

Materiales y procedimientos

## Compuestos de prueba

5 IDX9005, IDX9010, IDX9022, IDX9030, IDX9031, IDX9045, IDX9052, IDX9054, IDX9059, IDX9074, IDX9092, IDX9095, IDX9096 e IDX0150 (SEC ID N° 1 a 14, Tabla 1) se investigaron para su efecto sobre la expresión superficial de CXCR1 y CXCR2 en células polimorfonucleares (PMN) sanas. Los compuestos inventivos IDX9022, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEC ID N° 3, 14, 7 y 8, Tabla 1) se investigaron adicionalmente para su efecto sobre la expresión superficial de BLT1 en PMN de voluntarios sanos. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron por Biomers.net (Ulm, Alemania), excepto IDX0150 que se pidió a Avecia (Manchester, Reino Unido).

## Formulación

10 Los oligonucleótidos se ajustaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar una concentración madre de 500  $\mu\text{M}$  por ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec® 3000, BIO-RAD, Hercules, EE.UU.) y se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se usó.

Preparación de células y estimulación *in vitro* con oligonucleótidos

15 Sangre completa de donantes de sangre sanos se usó para la preparación de PMN. Las PMN se aislaron por centrifugación de densidad usando Polymorphoprep™ (Axis-Schield, Oslo, Noruega). Entonces, las células se lavaron adicionalmente en PBS, y la viabilidad y el número de células se determinaron contando las células en azul de tripano (Sigma Aldrich, Estocolmo, Suecia). Después, las células se resuspendieron en medio completo de células que consiste en RPMI 1640 (Sigma Aldrich) complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (SBF, Invitrogen), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina, HEPES 10 mM (Sigma Aldrich) y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de gentamicina (Invitrogen). Las PMN se cultivaron en placas de cultivo tejido de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml con 0,5, 10  $\mu\text{M}$  o 25  $\mu\text{M}$  de los compuestos inventivos o con medio solo como control negativo en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$ /pocillo. Las células se incubaron durante 3 h, si no se ha establecido de otro modo, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una estufa de incubación de cultivo celular humidificada (Thermo Scientific, Waltham, MA) con 5 % de  $\text{CO}_2$ , después de lo cual las células se analizaron para expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 usando citometría de flujo como se describe más adelante.

25

## La evaluación cinética del efecto de los oligonucleótidos sobre la expresión superficial de CXCR1

PMN humanas de donante de sangre sano se estimularon con 10  $\mu\text{M}$  de IDX9059 (SEC ID N° 8, Tabla 1) o con medio solo durante diversos momentos de tiempo (15 min, 30 min, 1 h, 2 h y 3 h). Las células se recogieron posteriormente y se fijaron en cada momento de tiempo en 2 % de paraformaldehído, después de lo cual se analizaron para expresión de CXCR1 por citometría de flujo como se describe a continuación.

30

## Citometría de flujo

Las células incubadas con los compuestos inventivos se recogieron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS complementado con 2 % de SBF. Las células se tiñeron para el marcador de granulocitos CD66b junto con CXCR1 o CXCR2 o BLT1 usando anticuerpos monoclonales de ratón marcados con fluorocromo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.) durante 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los anticuerpos usados se compararon con controles del mismo isotipo (Becton Dickinson). Después de lavar en PBS, las células se analizaron por un citómetro de flujo FACSarray (Becton Dickinson) y los datos se analizaron usando el sistema de software FACSarray (Becton Dickinson). Se analizaron un mínimo de 15.000 PMN seleccionadas por muestra.

35

## Ensayo de cloroquina

40 PMN aisladas de donantes de sangre sanos se pretrataron con 0,5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cloroquina (Sigma Aldrich) durante 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de estimularse con 10  $\mu\text{M}$  de sustancias de prueba durante 3 h adicionales. Entonces se analizó la expresión superficial de CXCR1 y CXCR2 por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

## Ensayo de quimiotaxia

45 La quimiotaxia de PMN se investigó usando el ensayo de quimiotaxia colorimétrico de 24 pocillos QCM™ 3  $\mu\text{m}$  (Millipore, Temecula, CA) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepararon PMN a partir de sangre completa de donantes sanos y se resuspendieron en medio completo de células como se ha descrito anteriormente. Las PMN se preincubaron en placas de 48 pocillos (Becton Dickinson) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, usando 250  $\mu\text{l}$  de suspensión de células por pocillo, con 0,5, 10 ó 25  $\mu\text{M}$  de los compuestos inventivos durante 1 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una estufa de incubación de cultivo celular humidificada (Thermo Scientific) con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Entonces, las células se lavaron en medio completo de células y las células se transfirieron a los insertos superiores de un ensamblaje de placa de migración de células de 24 pocillos que tiene un tamaño de poro de 3  $\mu\text{m}$  (Millipore). A las cámaras inferiores se añadió medio completo de células que contenía 100 ng/ml de IL-8 humana recombinante (Invitrogen) o  $\text{LTB}_4$  500 nM (Sigma Aldrich). En un experimento que prueba IDX9045, las células no se lavaron antes de añadirse a los insertos superiores de la placa de quimiotaxia y en este caso se añadió IL-8 junto con IDX9045, a

50

la misma concentración que se usa para el inserto superior, a la cámara inferior, esto para eliminar el riesgo de crear un gradiente del compuesto. Entones, las células se dejaron migrar a través del filtro hacia el quimioatrayente durante 3 h a 37 °C en una estufa de incubación de cultivo celular humidificada (Thermo Scientific) con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después, las células de la cámara inferior, es decir, las células migradas, se detectaron por incubación con la tinción de viabilidad celular WST-1 durante 1 h seguido de cuantificación midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (Tecan, Männedorf, Suiza).

### Resultado y discusión

Las PMN son los principales leucocitos que se unen al tejido isquémico. Aquí, los neutrófilos se añaden a la lesión de tejido liberando radicales libres, enzimas proteolíticas tales como mieloperoxidasa y estimulando la liberación de citocinas de células locales que conducen a elevada inflamación. IL-8, por unión a sus receptores CXCR1 y CXCR2, y LTB<sub>4</sub>, por unión a su receptor BLT1 sobre la superficie celular de PMN, desempeñan una función clave en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inflamación (Kobayashi, 2008; Tager y Luster, 2003).

En este estudio se investigó el efecto de compuestos de oligonucleótidos sobre la expresión superficial de CXCR1, CXCR2 y BLT1 sobre PMN aisladas de donantes de sangre sanos. Después de 3 h de estimulación con sustancias de prueba, varios de los compuestos inventivos disminuyeron la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CXCR1, es decir, la cantidad de CXCR1 expresada por célula (Fig. 7a). La mayor reducción en la expresión de CXCR1 se indujo por IDX9052, IDX9054, IDX9005, IDX9030, IDX9059, IDX9022 e IDX9045 (SEC ID N° 14, 7, 1, 4, 8, 3 y 6, Tabla 1), por lo que la IMF disminuyó el 68 %, 62 %, 61 %, 60 %, 53 %, 52 % y el 30 %, respectivamente, cuando se usa a 25 μM. Además, hubo una pequeña disminución en el porcentaje de células CXCR1+ en PMN estimuladas con IDX9005, IDX9022, IDX9030, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEC ID N° 1, 3, 4, 14, 7 y 8, Tabla 1), sin embargo, la reducción no fue tan sustancial como para la IMF (Fig. 7b). CXCR2 también se reguló por disminución en respuesta a los compuestos de oligonucleótidos inventivos (Fig. 7c), especialmente cuando PMN se estimuló con IDX9052 e IDX9054 (SEC ID N° 14 y 7, Tabla 1), que indujeron una disminución en la IMF de CXCR2 del 50 y 36 %, respectivamente. IDX9052 e IDX9054 también indujeron una pequeña disminución en el porcentaje de PMN CXCR2+ (Fig. 7d). La reducción en la expresión de CXCR fue dependiente de la dosis con el mayor efecto observado a 25 μM de compuesto de oligonucleótido y con menos efecto observado a 10 y 0,5 μM (Fig. 7e). Además, en un experimento separado usando PMN de donantes de sangre sanos, IDX9074 (SEC ID N° 9, Tabla 1) pudo regular por disminución la expresión de CXCR1 (Fig. 7f).

Para investigar la cinética para la regulación por disminución de CXCR1, PMN humanas se estimularon con 10 μM de IDX9059 (SEC ID N° 8, Tabla 1) durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h y 3 h después de que la expresión de CXCR1 se investigara con citometría de flujo. Ya después de 15 min pudo observarse una pequeña disminución de la expresión superficial de CXCR1 y después de 2 h la regulación por disminución había alcanzado el máximo nivel sin observarse más disminución después de 3 h (Fig. 7g).

Los compuestos inventivos IDX9052, IDX9054, IDX9059, IDX9005 e IDX9045 (SEC ID N° 14, 7, 8, 1 y 6) fueron todos muy eficaces en reducir la expresión de CXCR1/2 y tienen en común que todos ellos contienen un flanco de G en su extremo 5' y/o 3', sugiriendo que este motivo estructural, junto con la secuencia del oligonucleótido, podría asociarse a una capacidad reductora de CXCR1/2 más eficaz por los oligonucleótidos. Para soportar adicionalmente esto, cuando PMN de donantes de sangre sanos se incubaron con los oligonucleótidos de control IDX0480 (T\*G\*C\*TGCTTCTGCCATGCTG\*C\*T\*T) e IDX9134 (G\*A\*T\*GCTCTG\*G\*G\*G), que tienen las mismas secuencias que IDX9022 e IDX9059, respectivamente, pero sin motivos de CpG, IDX0480 fue incapaz de reducir la expresión superficial de CXCR1 como se observa para IDX9022, mientras que IDX9134 fue igualmente de potente que IDX9059 en reducir la expresión superficial de CXCR1 (Fig. 7h). Sin desear ligarse a teoría alguna, los inventores contemplan que estos resultados indican que IDX9022, que no tiene un flanco de G, media en su efecto reductor de CXCR1 y CXCR2 principalmente mediante sus motivos de CpG, mientras que IDX9059 que contiene un flanco de G tiene efectos independientes de CpG.

Para investigar la función de TLR9 en la reducción de la expresión superficial de CXCR inducida por las sustancias de prueba, las PMN se pretrataron con cloroquina antes de estimularse con sustancias de prueba. La cloroquina es un fármaco de 4-aminoquinolina que bloquea la fusión y acidificación endosómica y previene la activación de TLR9 y rutas de señalización metabólicas aguas abajo. La cloroquina podría inhibir dependientemente de la dosis la reducción en la expresión superficial de CXCR1 inducida por IDX9059 e IDX9022 (SEC ID N° 8 y 3, Tabla 1) (Fig. 7i). 10 μg/ml de cloroquina casi bloquearon completamente la disminución en la expresión de CXCR1 inducida por estos dos compuestos (Fig. 7i). Sin embargo, la cloroquina no pudo bloquear la reducción en la expresión superficial de CXCR1 inducida por IDX9054 o IDX9052 (SEC ID N° 7 y 14, Tabla 1) (Fig. 7i). Estos resultados indican que algunos de los compuestos inventivos median en su efecto reductor de CXCR mediante la activación de TLR9 endosómica (es decir, IDX9022 e IDX9059), mientras que otros no (es decir, IDX9052 e IDX9054).

Una reducción dependiente de la dosis de BLT1, el receptor para el quimioatrayente LTB<sub>4</sub>, también podría demostrarse después de la incubación con diferentes concentraciones (0,5, 10 y 25 μM) de los compuestos inventivos (Fig. 7j). Se observó una reducción del 87 %, 80 %, 64 % y 57 % en la IMF con los compuestos inventivos IDX9052, IDX9054, IDX9059 e IDX9022, respectivamente (SEC ID N° 14, 7, 8 y 3, Tabla 1) cuando se usa a 25 μM (Fig. 7j). Además, IDX9052 e IDX9054 redujeron significativamente el porcentaje de PMN positivas para BLT1 (Fig.

7k). Como se muestra en la Fig. 7j, los compuestos inventivos que contienen un flanco de G en su extremo 5' y/o 3', es decir, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEC ID N° 14, 7 y 8, Tabla 1) fueron más eficaces en reducir la expresión superficial de BLT1, en comparación con IDX9022 que no tiene un flanco de G.

5 Para investigar si la reducción en la expresión superficial de CXCR1, CXCR2 y BLT1 inducida por los compuestos inventivos también conduce a reducir la migración de PMN hacia el ligando de CXCR1 y CXCR2 (IL-8) o el ligando de BLT1 (LTB<sub>4</sub>), PMN de donantes de sangre sanos se pre-incubaron durante 1 h con los compuestos de oligonucleótidos inventivos. Entonces, las células se dejaron migrar hacia IL-8 o LTB<sub>4</sub> en un ensayo de quimiotaxia durante 3 h. Se observó una reducción dependiente de la dosis en el número de PMN migradas después de la pre-incubación con tanto IDX9022, IDX9052, IDX9054 como IDX9059 (SEC ID N° 3, 14, 7 y 8, Tabla 1), siendo los compuestos más eficaces IDX9052, IDX9054 e IDX9059, que a 25 μM bloquearon completamente o casi completamente la migración de PMN hacia tanto IL-8 (Fig. 7i) como LTB<sub>4</sub> (Fig. 7n). Además, en un experimento separado usando PMN de dos donantes de sangre sanos, IDX9045 (SEC ID N° 6, Tabla 1) redujo dependientemente de la dosis la migración inducida por IL-8 de PMN (Fig. 7m).

15 La expresión superficial de CXCR1 y 2 se correlacionó con el número de PMN migradas en la quimiotaxia inducida por IL-8, como lo hizo la expresión superficial de BLT1 y el número de PMN migradas en la quimiotaxia inducida por LTB<sub>4</sub> (Fig. 7o-q). Esto indica que la reducción en la migración de PMN es debida a una menor expresión superficial de los receptores.

20 Los inventores demostraron una rápida reducción en la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 sobre PMN incubadas con compuestos de oligonucleótidos, que para CXCR1 se mostró que ya empezaba después de 15 min de estimulación. Esto es muy importante, ya que los neutrófilos son células terminalmente diferenciadas y, por tanto, de vida corta, por lo que se desea un efecto inmunomodulador rápidamente inducido. Hayashi y col., en 2003, demostraron una regulación por disminución de la expresión de CXCR1 en PMN por ADN de CpG solo en células pretratadas con GM-CSF (Hayashi y col., 2003), mientras que en este estudio, las sustancias de oligonucleótidos inventivos redujeron la expresión superficial de CXCR1 y 2 sin pretratamiento con citocina, subyaciendo sus potentes propiedades inmunomoduladoras.

25 Los inventores no solo demuestran una reducción en la expresión superficial de CXCR1, 2 y BLT1, sino que además demuestran una sensibilidad reducida de las células a los quimioatrayentes IL-8 y LTB<sub>4</sub>, produciendo menos migración. Hay motivos para predecir que estos resultados también reflejan un escenario *in vivo*, conduciendo por consiguiente a menos quimiotaxia de PMN en tejidos inflamados.

30 Se observó una disminuida expresión superficial de CXCR1, CXCR2 y BLT1, además de sensibilidad reducida de las células, a los quimioatrayentes IL-8 y LTB<sub>4</sub> en PMN sanas tratadas con los compuestos inventivos. Estas propiedades de los compuestos de oligonucleótidos muestran claramente la potencia de los compuestos inventivos para influir en las propiedades y comportamiento de PMN.

### 35 **8. El efecto de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre la expresión de receptores de quimiocinas en células polimorfonucleares de pacientes asmáticos y con EM**

#### Introducción

40 PMN participa en la patogénesis de no solo isquemia, sino también de muchos otros trastornos inflamatorios, y el bloquear las funciones de PMN sería, por tanto, beneficioso en muchas enfermedades inflamatorias. La inflamación celular de las vías respiratorias con PMN, es decir, eosinófilos y neutrófilos, es un rasgo característico del asma. También se ha descrito que PMN participa en la patogénesis de esclerosis múltiple (EM). El objetivo de este estudio era investigar si los compuestos inventivos podían disminuir o no la expresión de CXCR1/2 y BLT1 no solo en PMN de individuos sanos, sino también en PMN de pacientes con una afección inflamatoria, en este caso ejemplificada por asma y EM.

#### Materiales y procedimientos

45 Compuestos de prueba

IDX9022, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEC ID N° 3, 14, 7 y 8, Tabla 1) se investigaron para su efecto sobre la expresión superficial de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN de pacientes asmáticos y con EM. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron por Biomers.net (Ulm, Alemania).

#### Formulación

50 Los oligonucleótidos se ajustaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar una concentración madre de 500 μM por ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec® 3000, BIO-RAD, Hercules, EE.UU.) y se guardaron a -20 °C hasta que se usaron.

Preparación de células y estimulación *in vitro* con oligonucleótidos

Sangre completa de pacientes asmáticos y con EM se usó para la preparación de PMN. Las PMN se aislaron, se contaron y se resuspendieron en medio completo de células como se describe en Materiales y procedimientos bajo el Ejemplo 7. Las PMN se cultivaron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml con 0,5, 10  $\mu$ M o 25  $\mu$ M de oligonucleótidos o con medio solo como control negativo en un volumen total de 200  $\mu$ l/pocillo. Las células se incubaron durante 3 h a 37 °C en una estufa de incubación de cultivo celular humidificada (Thermo Scientific, Waltham, MA) con 5 % de CO<sub>2</sub>, después de lo cual las células se analizaron para expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 usando citometría de flujo.

#### Citometría de flujo

Las células incubadas con los oligonucleótidos se recogieron, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS complementado con 2 % de SBF. Las células se tiñeron para el marcador de granulocitos CD66b junto con CXCR1 o CXCR2 o BLT1 como se describe en Materiales y procedimientos bajo el Ejemplo 7. Entonces, las células se analizaron por un citómetro de flujo FACSarray (Becton Dickinson) y los datos se analizaron usando el sistema de software FACSarray (Becton Dickinson). Se analizaron un mínimo de 15.000 PMN seleccionadas por muestra.

#### Resultado y discusión

Las PMN son una de las principales células que median en la lesión de tejido durante una respuesta inflamatoria. Las PMN migran de la sangre a sitios de inflamación en respuesta a quimioatrayentes localmente producidos. Dos de los principales mediadores de migración de PMN son la quimiocina de CXCR1 y el leucotrieno LTB<sub>4</sub>. En este estudio, los inventores tienen la intención de investigar si los compuestos inventivos podrían regular por disminución los receptores para IL-8, es decir, CXCR1 y CXCR2, además del receptor para LTB<sub>4</sub>, es decir, BLT1, sobre la superficie de PMN derivadas de pacientes con una enfermedad inflamatoria.

Usando sangre de pacientes con EM se indicó una reducción dependiente de la dosis de CXCR1, CXCR2 y BLT1 sobre PMN después de estimulaciones con los compuestos inventivos (Fig. 8a-f). Se observaron resultados similares cuando se usó la sangre de un paciente asmático (Fig. 8g-i). La reducción se observó predominantemente para la IMF, es decir, la cantidad de receptores expresados por célula. IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEC ID N° 8, 7 y 14, Tabla 1) indujeron una reducción de la IMF para CXCR1 sobre PMN de pacientes con EM del 45 %, 56 % y 42 %, respectivamente, cuando se usa a 25  $\mu$ M (Fig. 8a). Además, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 redujeron la expresión superficial de CXCR2 el 76 %, 58 % y 39 % (Fig. 8c), y la expresión superficial de BLT1 el 50 %, 47 % y 26 %, respectivamente (Fig. 8e). Cuando se estimulan PMN de un paciente asmático con los compuestos inventivos, la reducción en IMF para CXCR1 fue del 56 %, 71 % y 62 % con IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (Fig. 8g), respectivamente. IDX9052, IDX9054 e IDX9059 también redujeron la IMF para CXCR2 sobre PMN de un paciente asmático el 69 %, 50 % y 37 % (Fig. 8h), y la IMF para BLT1 el 85 %, 77 % y 64 % (Fig. 8i), respectivamente. Como se observa con PMN de donantes sanos, los compuestos inventivos que contienen un secuencia de oligo-G flanqueante, es decir, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEC ID N° 14, 7 y 8, Tabla 1) fueron los más eficaces en reducir la expresión superficial de CXCR1, CXCR2 y BLT1, también en PMN derivadas de pacientes con EM y asma.

También se observó una disminución en la expresión superficial de CXCR1, CXCR2 y BLT1 cuando PMN derivadas de pacientes con un trastorno inflamatorio, es decir, pacientes asmáticos y con EM, se trataron con los compuestos inventivos. Estas propiedades de los compuestos de oligonucleótidos podrían ser útiles en reducir la infiltración de PMN en tejidos inflamados.

#### Referencias

- Cooper y col., Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47), Proc Natl Acad Sci USA, 1995 Apr 25, 92(9): 3978-82
- Entman ML, Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. Cardiovasc Res. 1994; 28(9):1301-11. Review.
- Hausenloy, D. J., A. Tsang and D. M. Yellon. The Reperfusion Injury Salvage Kinase Pathway: A Common Target for Both Ischemic Preconditioning and Postconditioning. Trends Card Med. 2005; 15: 69-75.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. Pharmacol Ther 2007;116:173-91.
- Hayashi F, Means TK, and Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood. 2003;102: 2660-2669.
- Heemann U, Szabo A, Hamar P, Müller V, Witzke O, Lutz J, Philipp T. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury: possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. Am J Pathol. 2000; 156:287-93.

- Henriksson M, Stenman E, Vikman P, Edvinsson L. MEK1/2 inhibition attenuates vascular ETA and ETB receptor alterations after cerebral ischaemia. *Exp Brain Res*. 2007; 178(4):470-6.
- Kobayashi, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*, 2008 Jan 1; 13, 2400-2407.
- 5 Lee SH, Lee JG, Kim JR, Baek SH. Toll-like receptor 9-mediated cytosolic phospholipase A2 activation regulates expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 28;364(4):996-1001.
- Lindberg et al., Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice, *Science*, 1996 Nov 1;274(5288): 795-8
- 10 Lindbom L. Microvascular blood flow distribution in skeletal muscle. An intravital microscopic study in the rabbit. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1983;525:1-40. McKimmie CS, Fazakerley JK. In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression. *J Neuroimmunol*. 2005; 169:116-25.
- Parkos y col., CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia, *J. Cell Biol.*, 1996 Feb; 132(3): 437-50
- 15 Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT. Leucocyte adhesion molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997 ;8(4) :380-388.
- Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordonez AN, Ashley MD, Xiong Z, Gala R, Simon RP. In vivo and in vitro characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(2):232-41. Epub 2007 Sep 19. Erratum in: *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(2):440. Gala, Rosaria [added].
- 20 Rowland RT, Meng X, Cleveland JC Jr, Meldrum DR, Harken AH, Brown JM. LPS-induced delayed myocardial adaptation enhances acute preconditioning to optimize postischemic cardiac function. *Am J Physiol*. 1997; 272:H2708-15.
- 25 Stevens SL, Ciesielski TM, Marsh BJ, Yang T, Homen DS, Boule JL, Lessov NS, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor 9: a new target of ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(5):1040-7.
- Tager AM, and Luster AD. (2003). BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003; 69: 123-134.
- 30 Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:13798-803.
- Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, Hallenbeck JM. Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*. 1997; 748:267-70.
- 35 Valen G. Cellular signaling mechanisms in adaptation to ischemia-induced myocardial damage. *Ann Med*. 2003;35:300-7.
- Valen G, Vaage J. Pre- and postconditioning in cardiac surgery. *Bas Res Cardiol* 2005;100:179-86.
- Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004; 15;61(3):481-97. Review.
- 40 Wang ZQ, Chen XC, Yang GY, Zhou LF. U0126 prevents ERK pathway phosphorylation and interleukin-1 beta mRNA production after cerebral ischemia. *Chin Med Sci J*. 2004 Dec;19(4):270-5.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007; 13;357(11):1121-35.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> INDEX PHARMACEUTICALS AB ZARGARI, Arezou AXELSSON, Lars-Göran ADMYRE, Charlotte VON STEIN, Oliver  
 <120> Compuestos y procedimientos para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares  
 <130> 59797PC  
 10 <150> US 61/111,284  
 <151> 04-11-2008  
 <150> SE 0802338-4  
 <151> 04-11-2008  
 15 <160> 16  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 20 <210> 1  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Artificial  
 <400> 1  
 30 tcgtccatgg tcaggtccc ggggg 25  
 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Artificial  
 40 <400> 2  
 tccaagagt cgccagg 18  
 <210> 3  
 <211> 22  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Artificial  
 50 <400> 3  
 tcgtcgttct gccatcgtcg tt 22  
 <210> 4  
 55 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Artificial  
 <400> 4  
 tcgtctgcca tggcggccgc c 21  
 65 <210> 5

ES 2 464 731 T3

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Artificial  
  
 <400> 5  
 tcgtcgattc gtctgccatg g 21  
  
 10 <210> 6  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 6  
 20 gggtcgcagc tgg 13  
  
 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 7  
 30 ggggtcgtct gcggg 15  
  
 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 8  
 40 gatcgtccgg gg 12  
  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
  
 <400> 9  
 50 tcgttcgtct ttcgtctgc 19  
  
 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 10  
 60 ttcgtctgc ttcggttcg ttt 23  
  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

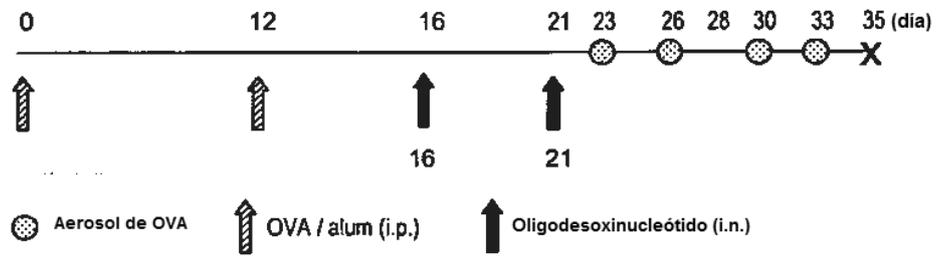
ES 2 464 731 T3

<220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 11  
 5 tcgtctgctt tcgtctgc 18  
  
 <210> 12  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 12  
 15 gatcgctccga tcgtcc 16  
  
 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 13  
 25 ggaacagttc gtccatggc 19  
  
 <210> 14  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 14  
 35 ggggtcgtct gcgg 14  
  
 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 15  
 50 tgctgcttct gccatgctgc tt 22  
  
 <210> 16  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Artificial  
  
 <400> 16  
 60 gatgctctgg gg 12

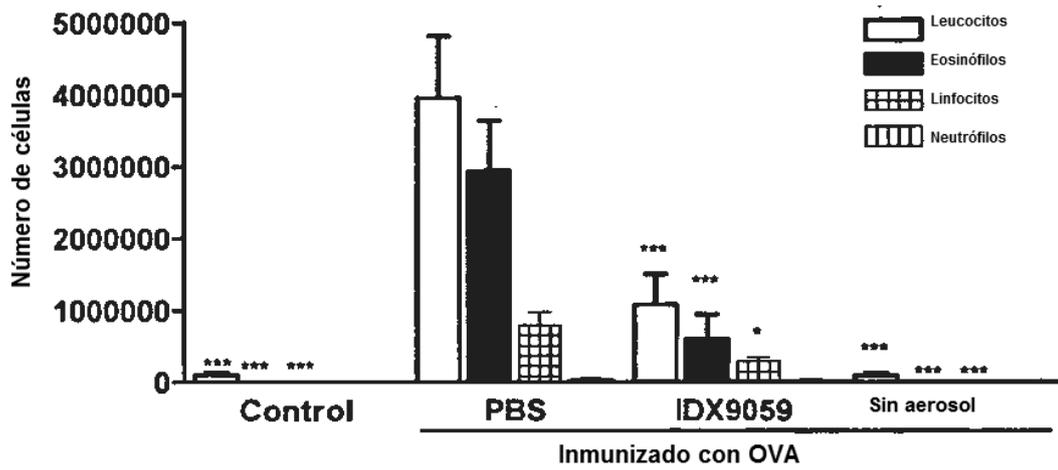
**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido aislado y purificado como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059].
2. El oligonucleótido según la reivindicación 1, en el que al menos un nucleótido tiene una modificación del esqueleto de fosfato.
- 5 3. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2.
4. El uso de un oligonucleótido para la producción de una preparación farmacéutica para reducir el reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación, en el que el oligonucleótido es como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059].
- 10 5. El uso según la reivindicación 4, en el que dicho reclutamiento reducido y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación es un resultado de una regulación por disminución de al menos uno de los receptores CXCR1 y CXCR2.
6. El uso según la reivindicación 4, en el que dicho reclutamiento reducido y/o migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación es un resultado de una regulación por disminución del receptor BLT1.
- 15 7. El uso según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido se administra mediante una de las siguientes vías de administración: administración subcutánea, intraperitoneal, mucosa, intestinal, oral, intravenosa, gástrica, esofágica, bucal, nasal y pulmonar.
8. El uso según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido se administra como una etapa en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
- 20 9. El uso según la reivindicación 5, en el que el oligonucleótido se administra a un paciente que ha padecido, o se sospecha que ha padecido, un infarto de miocardio.
10. El uso según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido se administra a un paciente que ha padecido, o se sospecha que ha padecido, un accidente cerebrovascular.
- 25 11. El uso según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido se administra a un paciente que ha padecido traumatismo o quemadura, o que tiene programado someterse a cirugía.
12. El uso según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido se administra a un paciente que tiene una embolia antes, después de o simultáneamente con la eliminación de la embolia; o antes o después de la administración de un agente trombolítico.
- 30 13. El uso según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido se administra a un órgano designado para trasplante, tanto *in situ*, antes de la extracción del donante, *in transit*, antes de la implantación en el receptor, o *in vivo*, antes de o en el momento de restaurar la circulación sanguínea.
14. Una disolución técnica para el almacenamiento y/o transporte de trasplantes, en la que dicha disolución comprende un oligonucleótido que puede influir en las propiedades y comportamiento de células polimorfonucleares, por ejemplo, suprimir la adhesión endotelial y reclutamiento y/o migración de células polimorfonucleares, en una cantidad suficiente para la prevención y/o alivio de lesión isquémica, y dicho oligonucleótido es como se define en SEC ID N° 8 [IDX9059].
- 35

**Protocolo profiláctico**



**Fig. 1a**



**Fig. 1b**

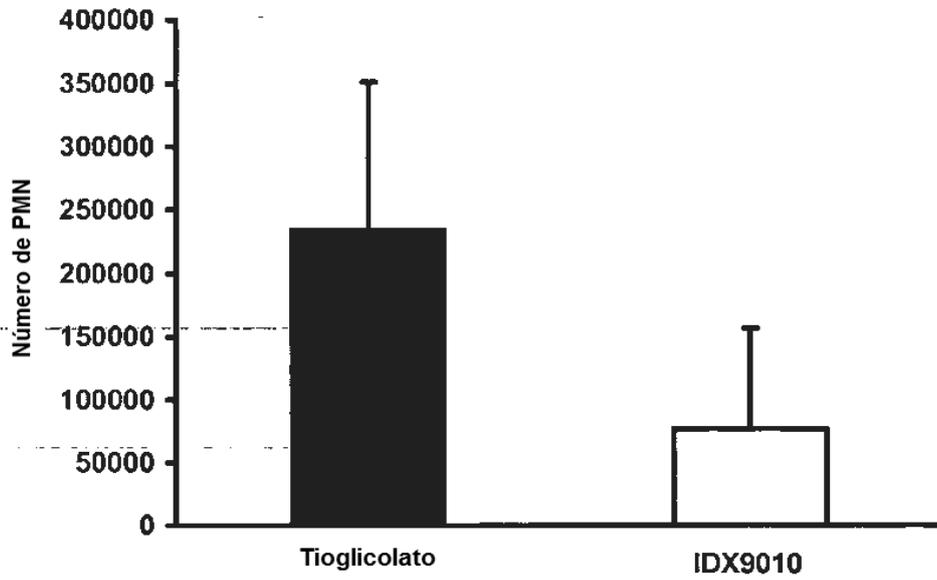


Fig. 2a

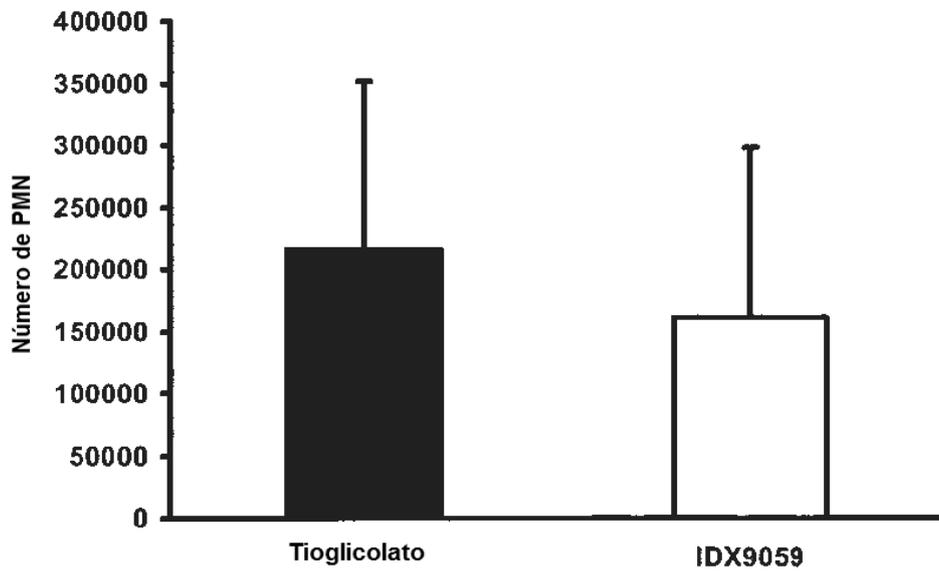


Fig. 2b

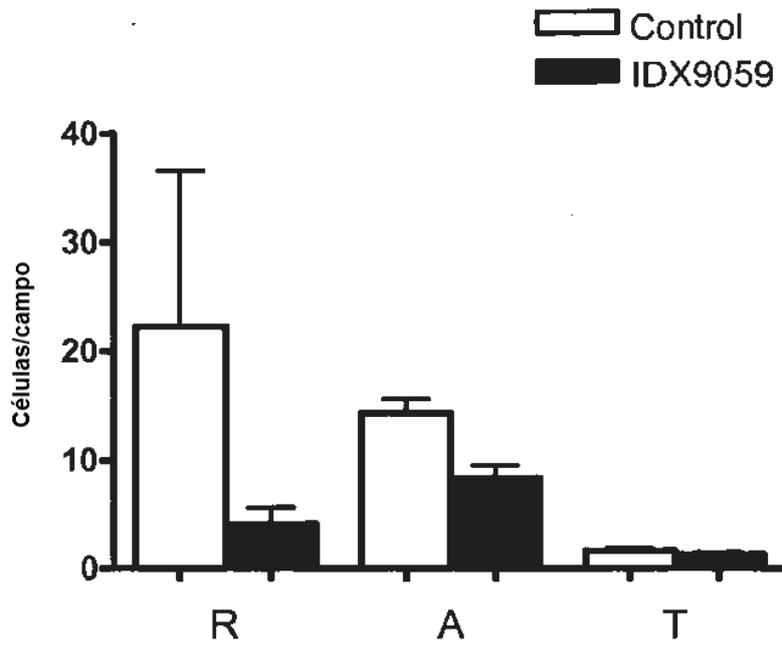


Fig. 3a

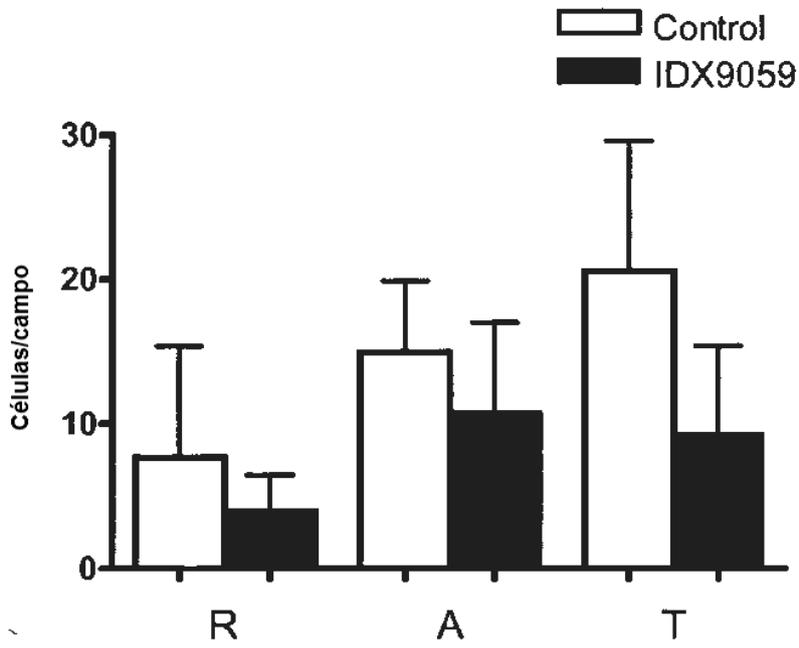


Fig. 3b

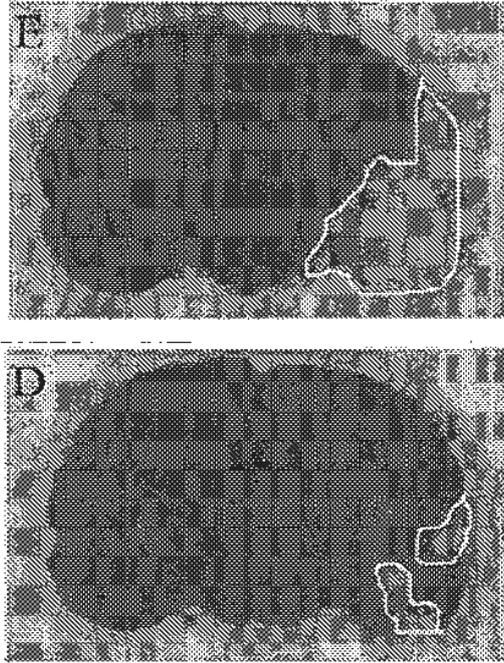


Fig. 4a

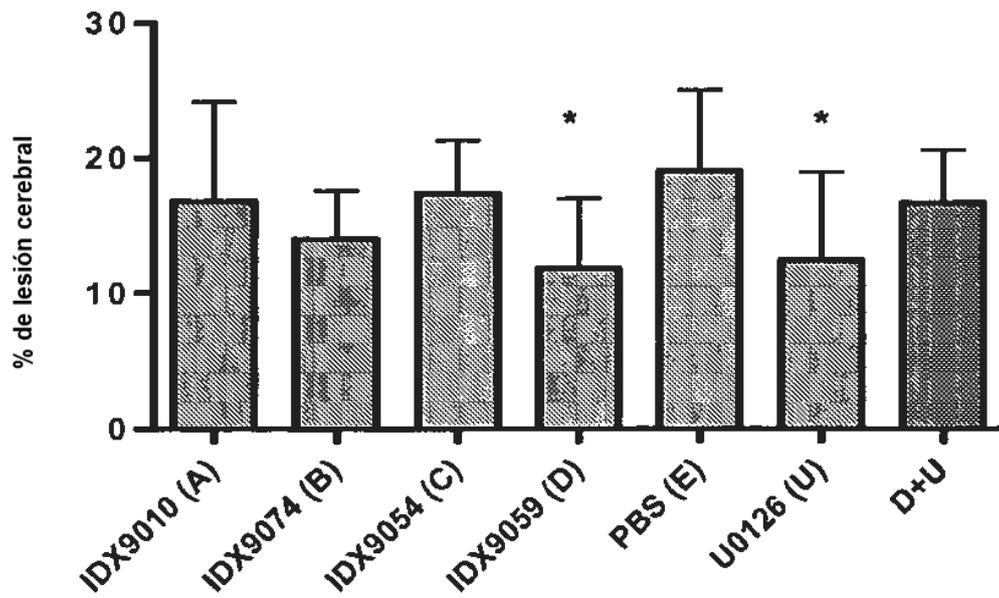


Fig. 4b

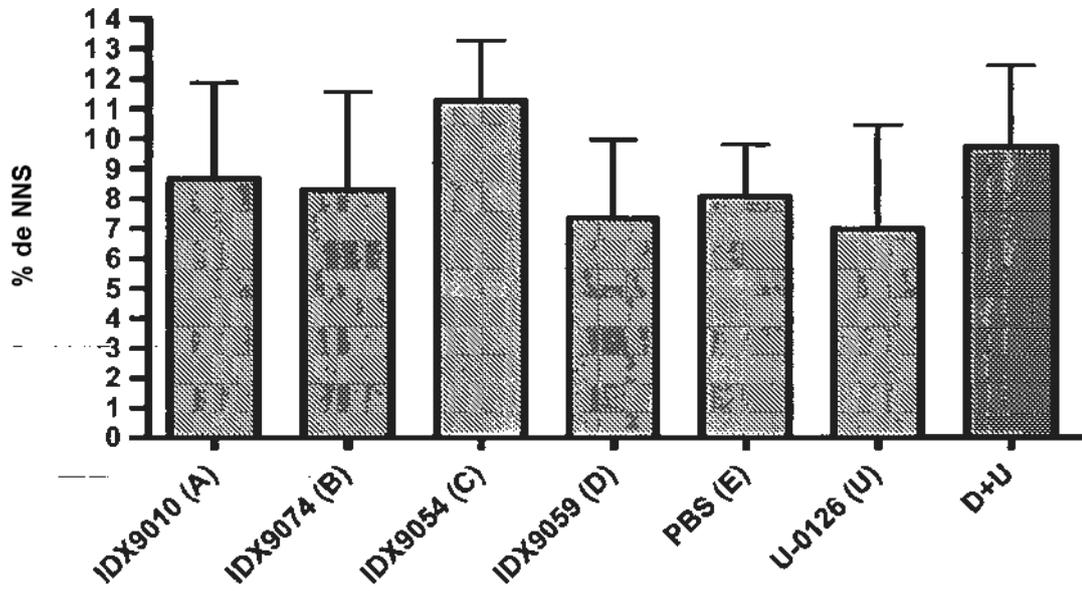


Fig. 4c

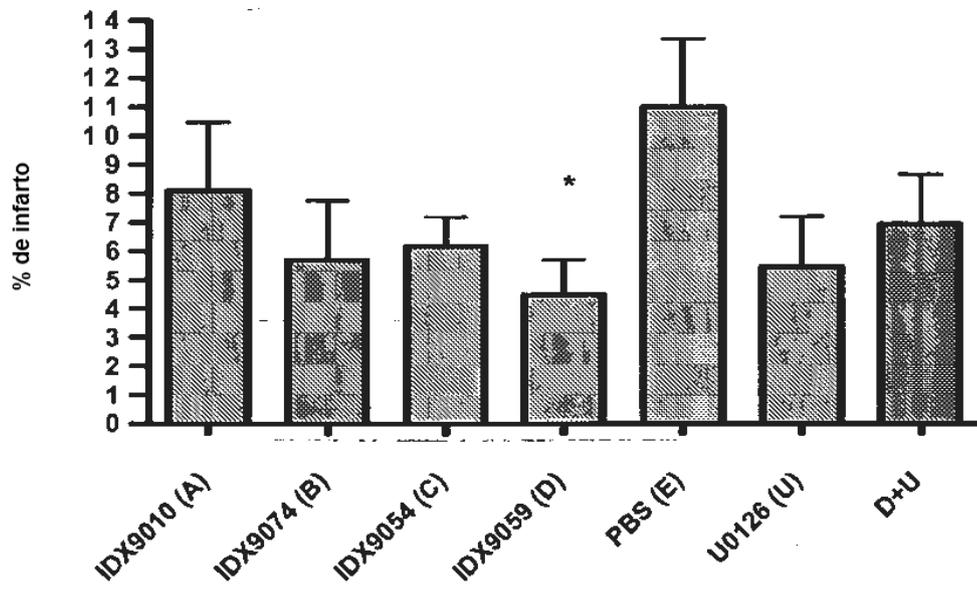


Fig. 4d

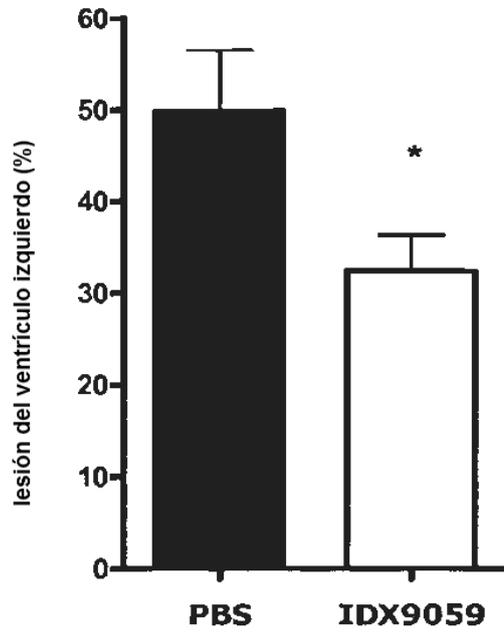
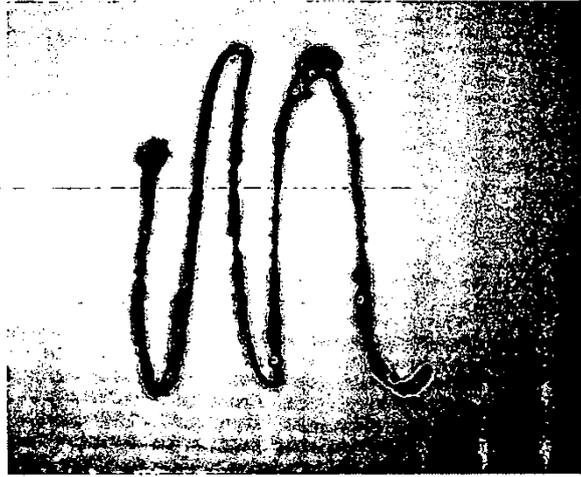
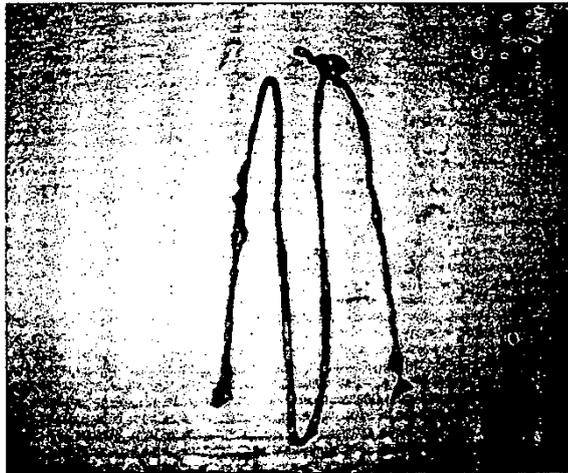


Fig. 5



**Fig. 6a**



**Fig. 6b**

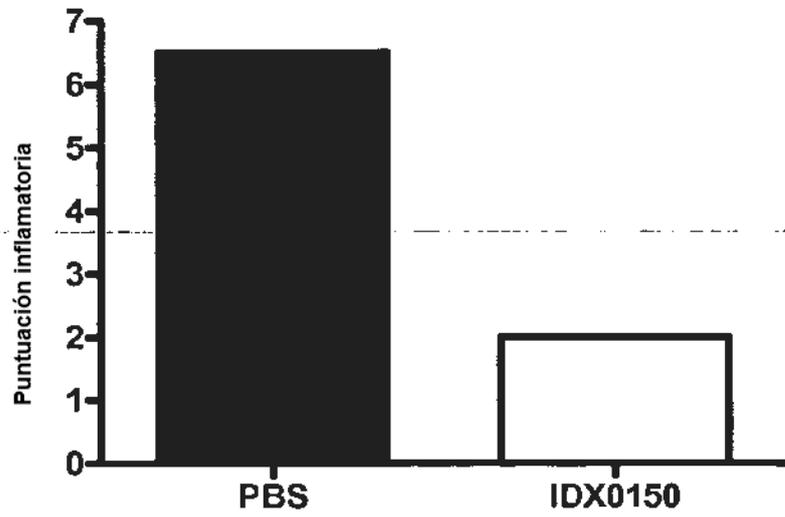


Fig. 6c

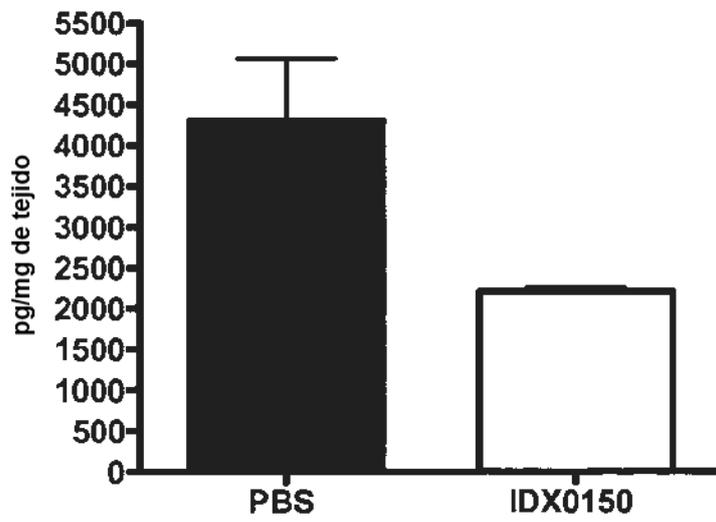


Fig. 6d

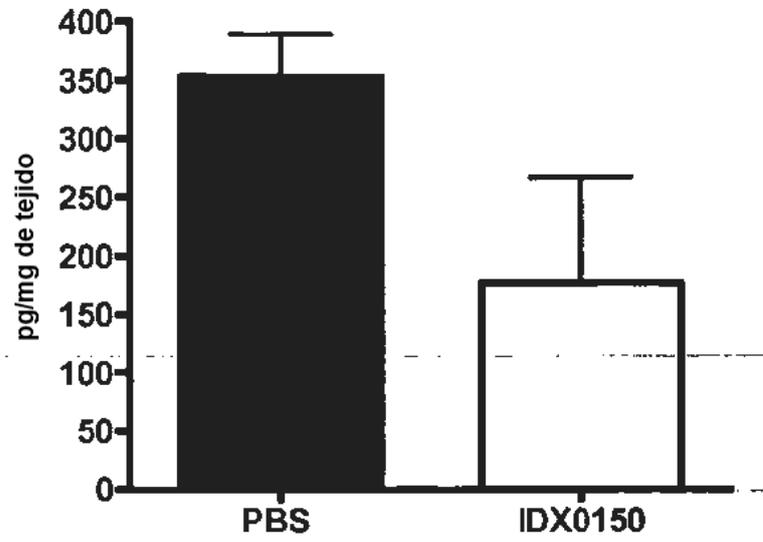


Fig. 6e

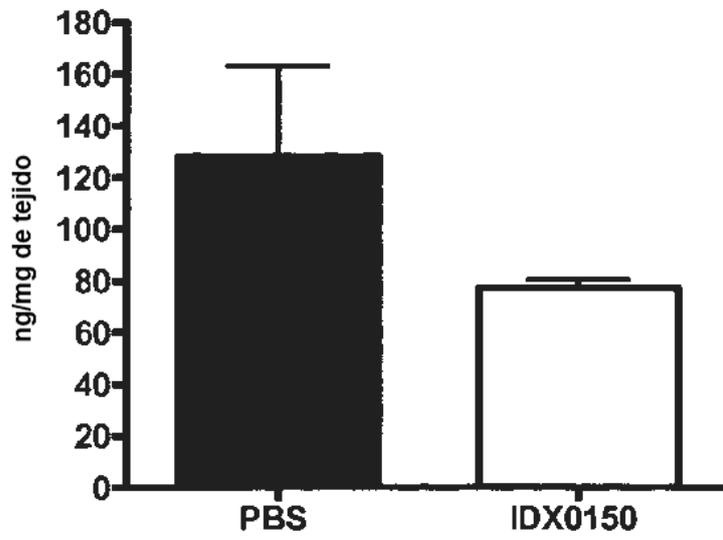


Fig. 6f

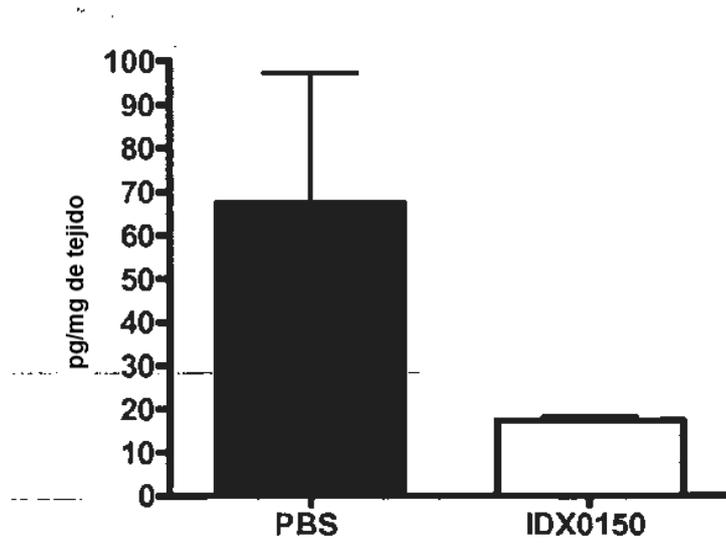


Fig. 6g

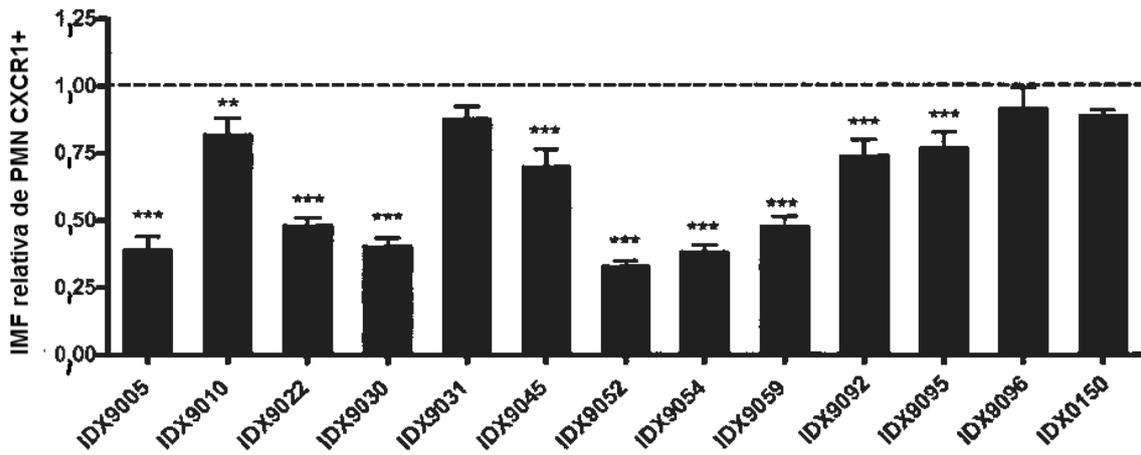


Fig. 7a

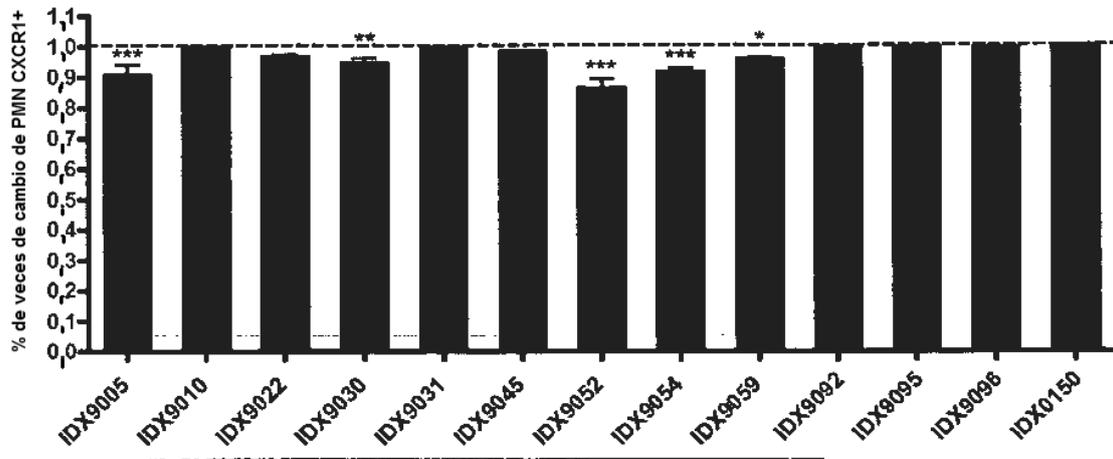


Fig. 7b

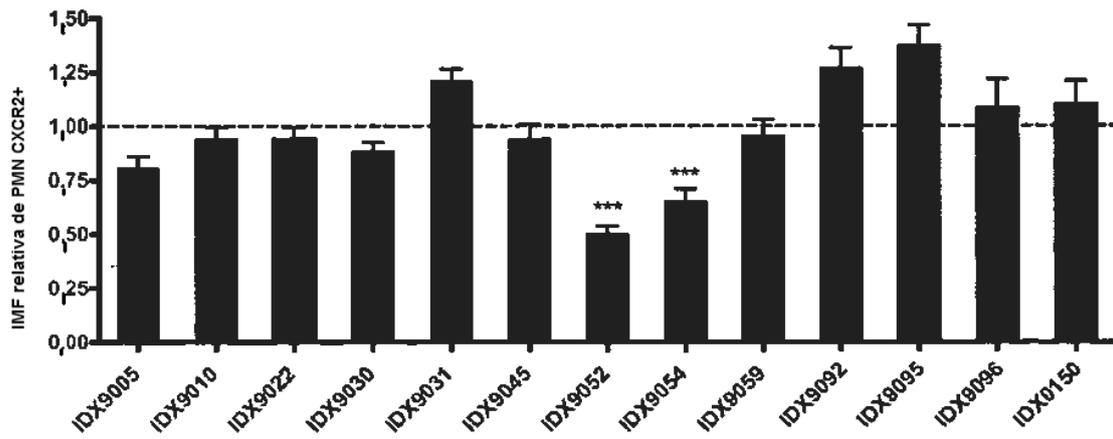


Fig. 7c

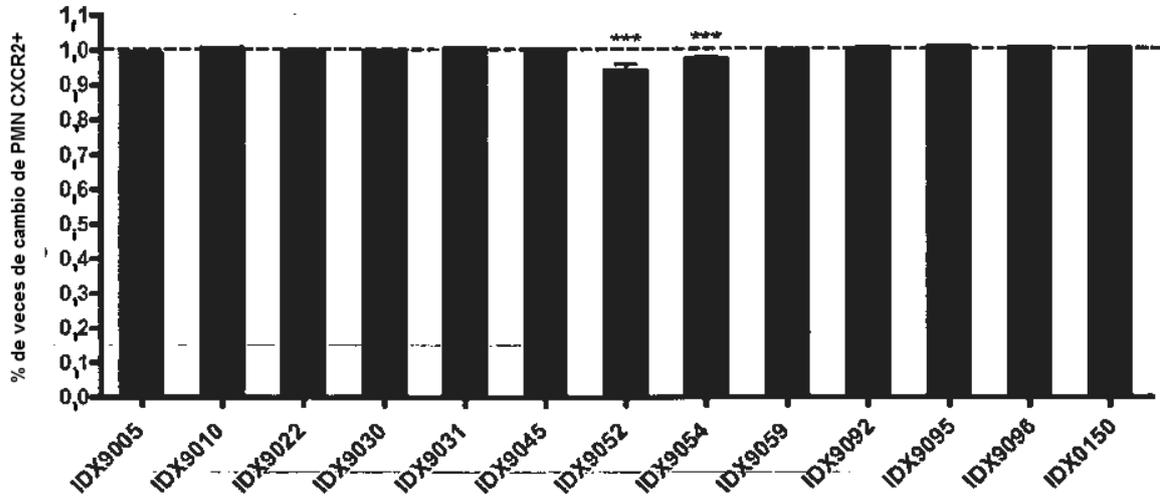


Fig. 7d

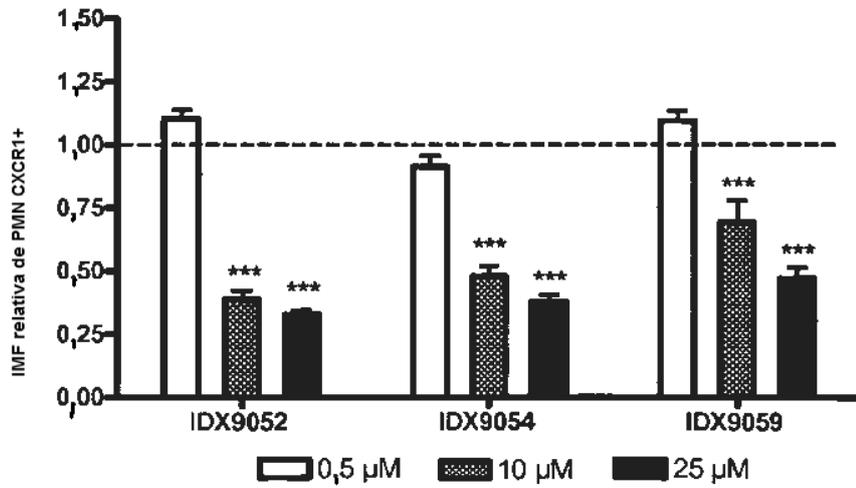


Fig. 7e

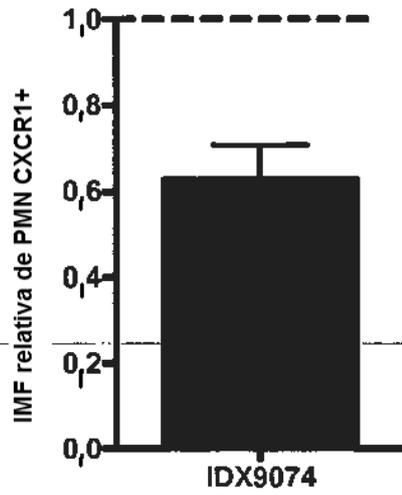


Fig. 7f

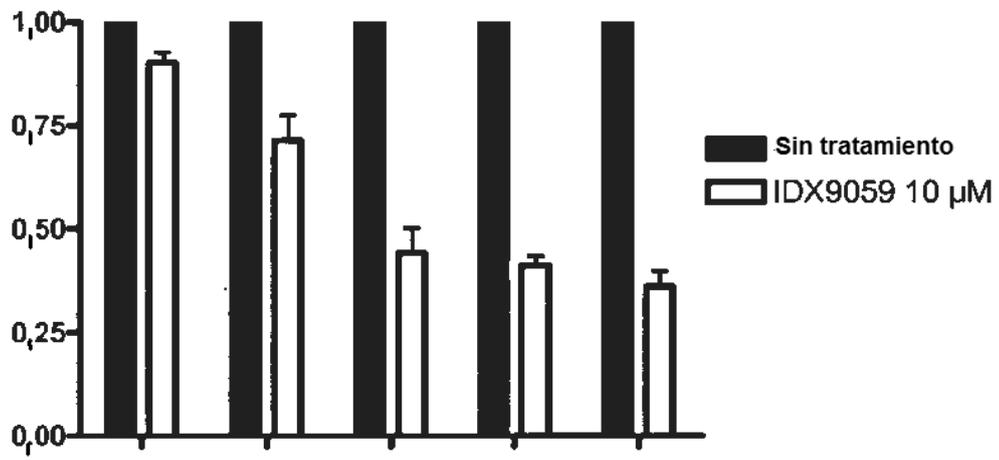


Fig. 7g

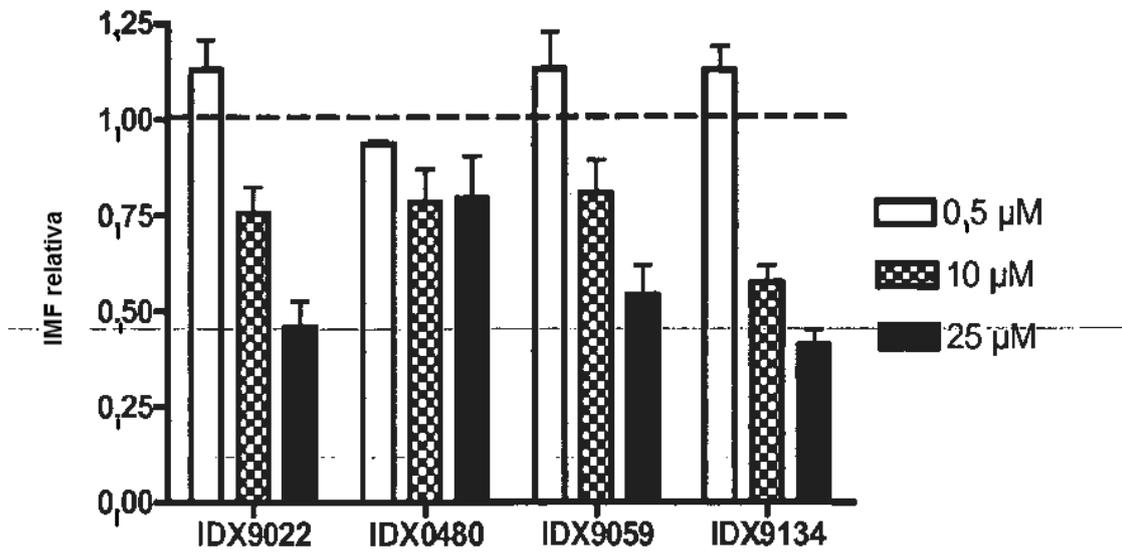


Fig. 7h

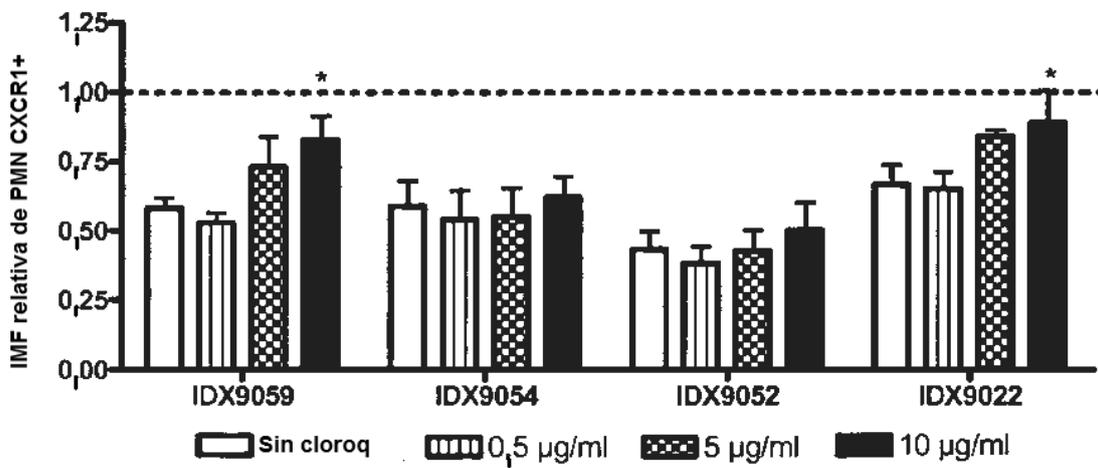


Fig.7i

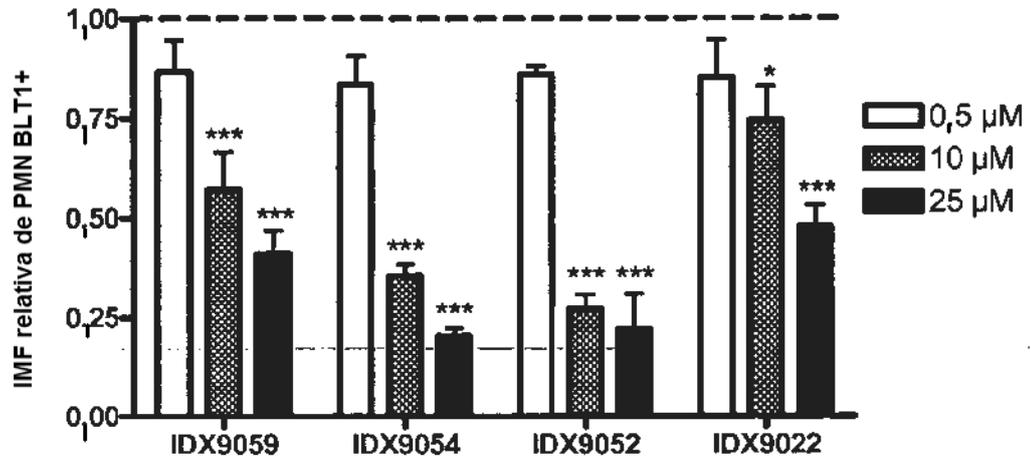


Fig. 7j

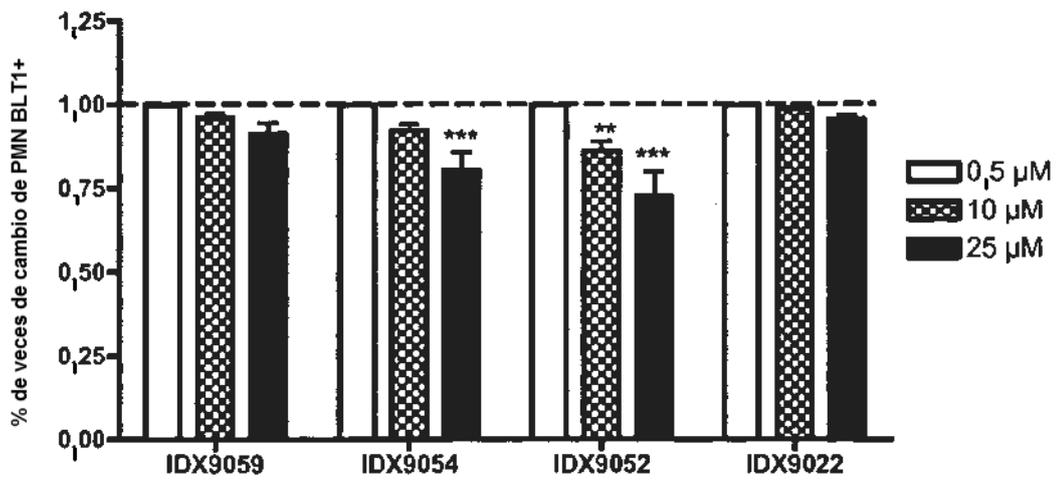


Fig. 7k

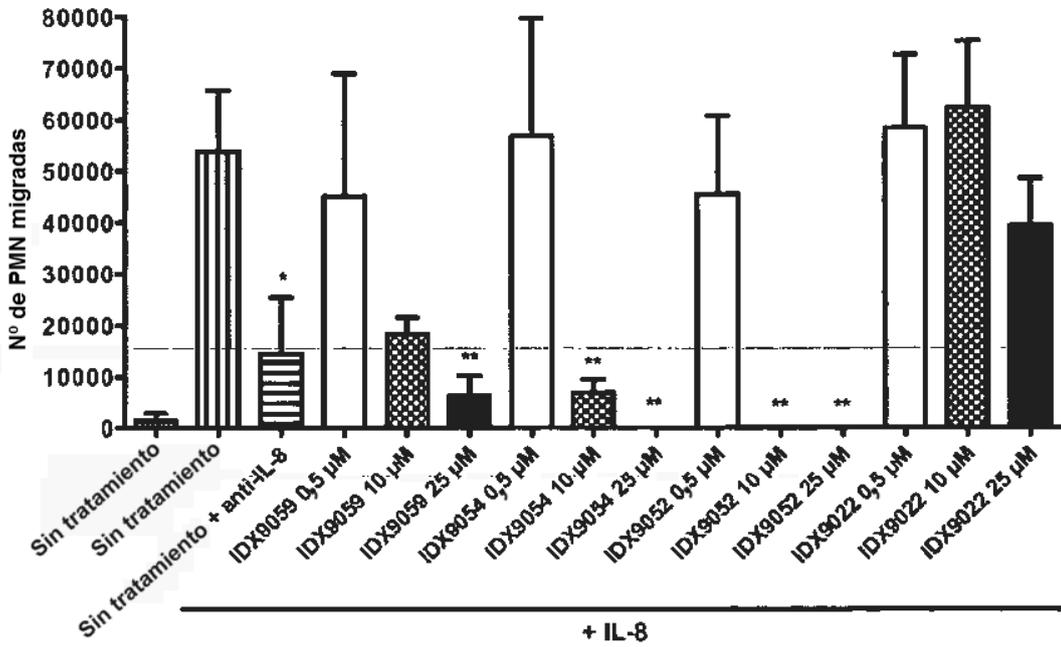


Fig. 7l

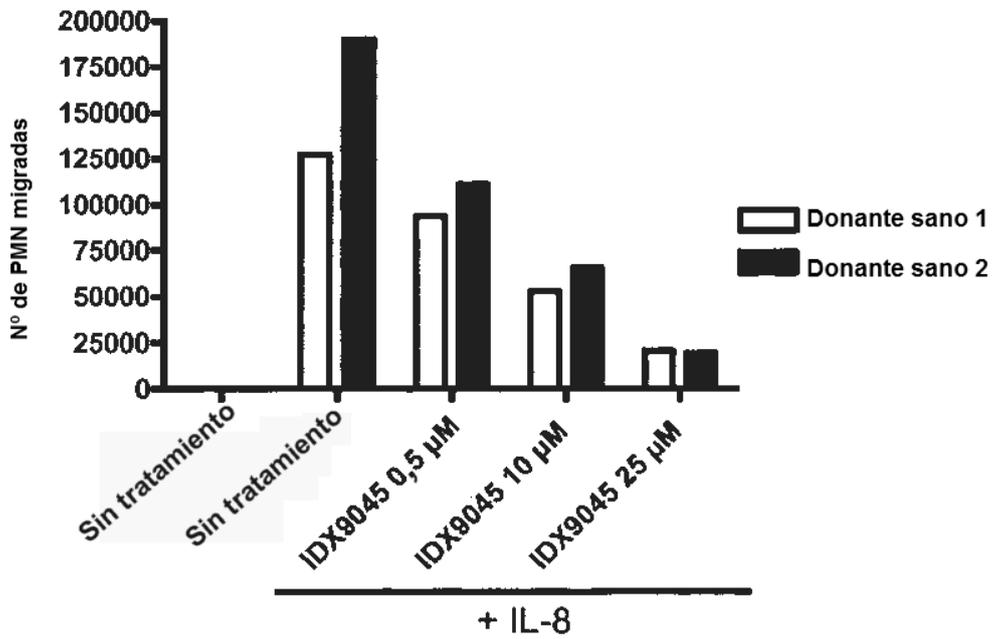


Fig. 7m

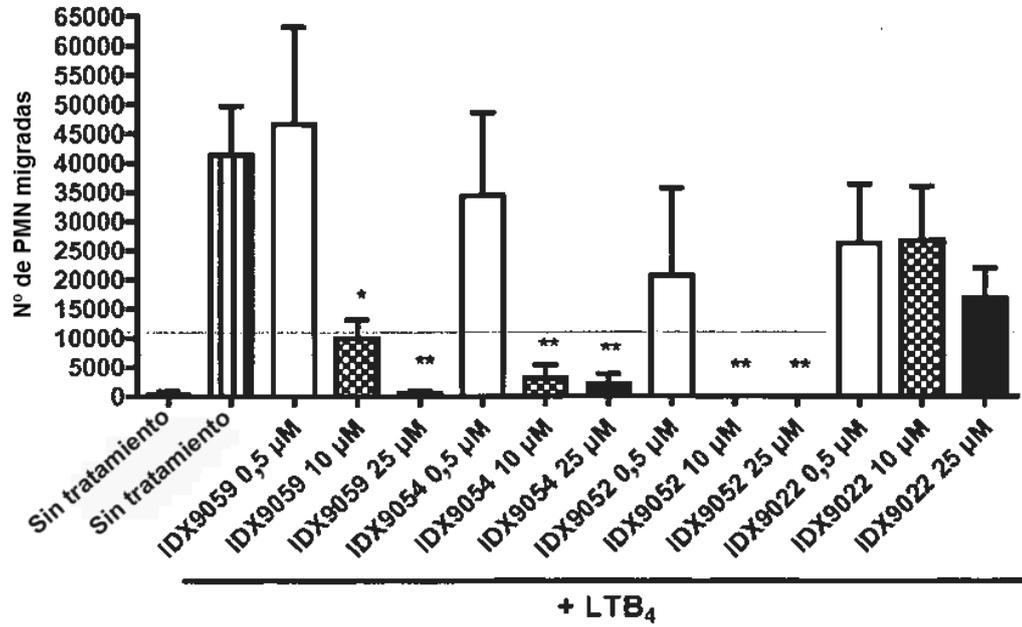


Fig. 7n

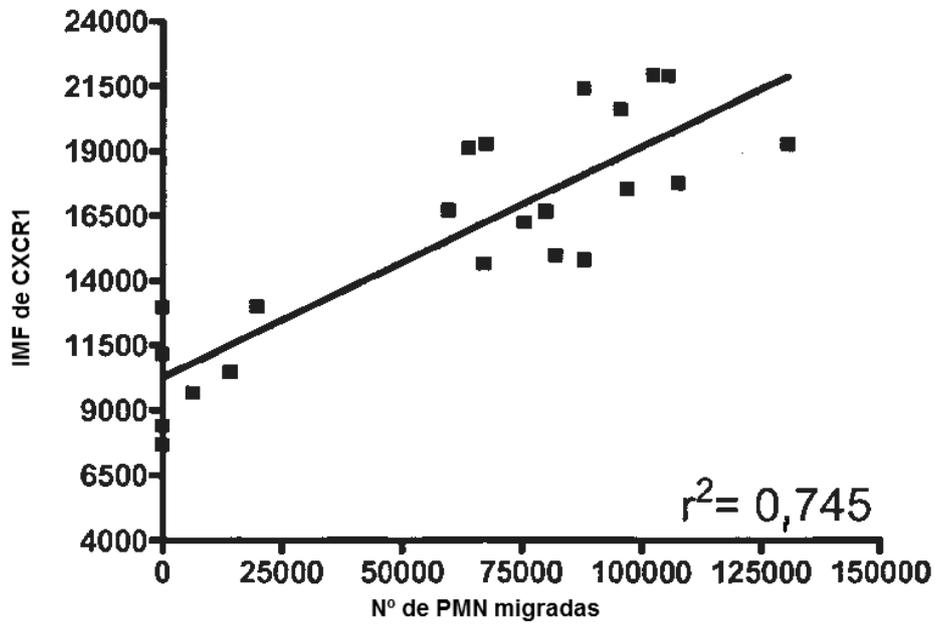


Fig. 7o

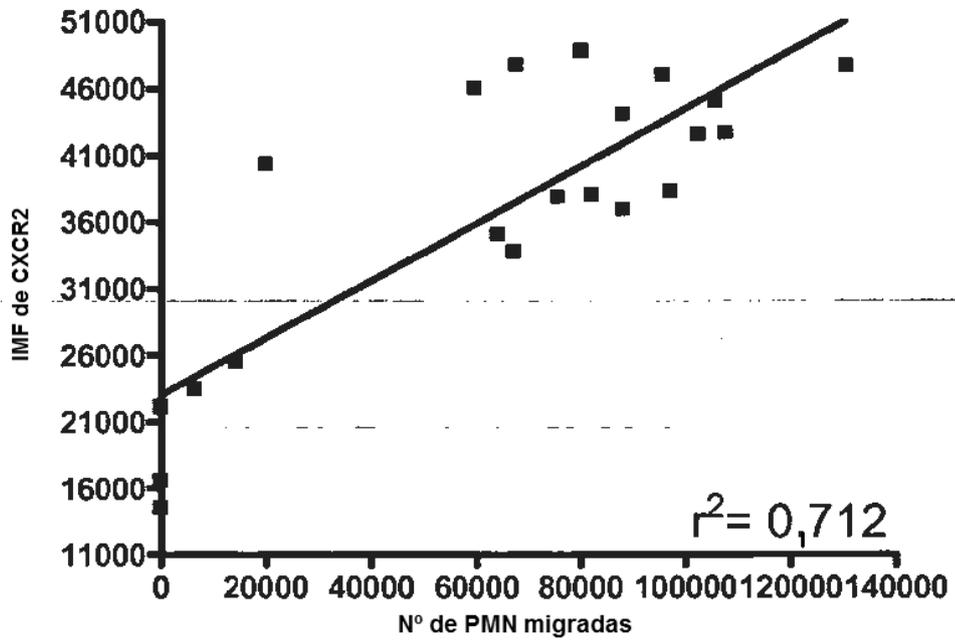
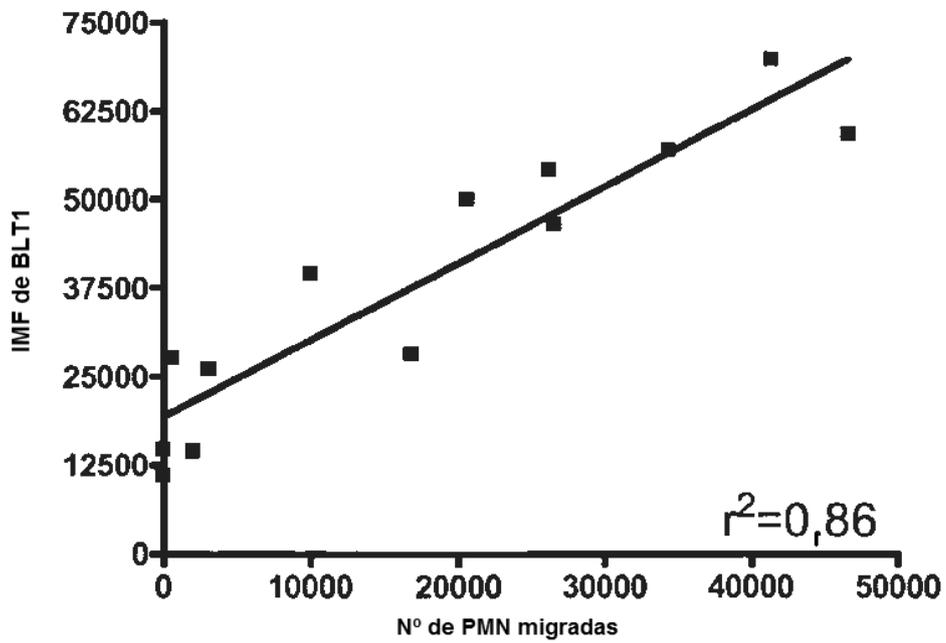


Fig. 7p



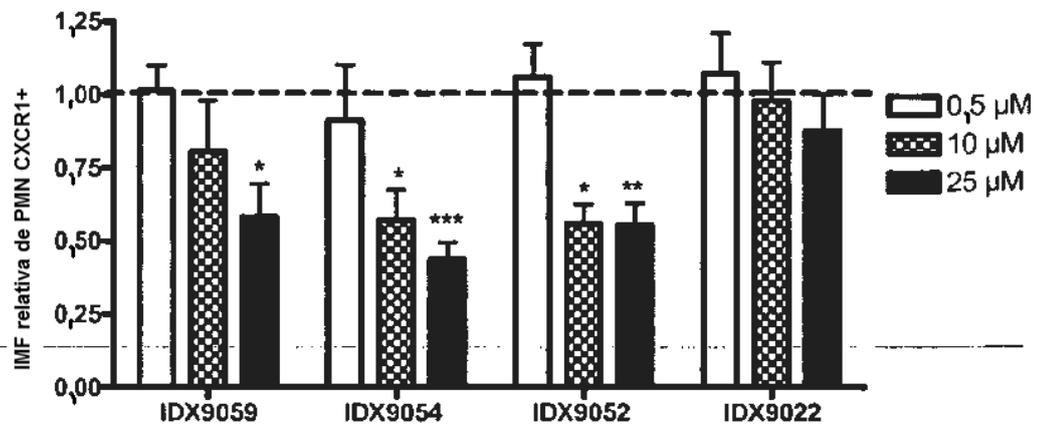


Fig. 8a

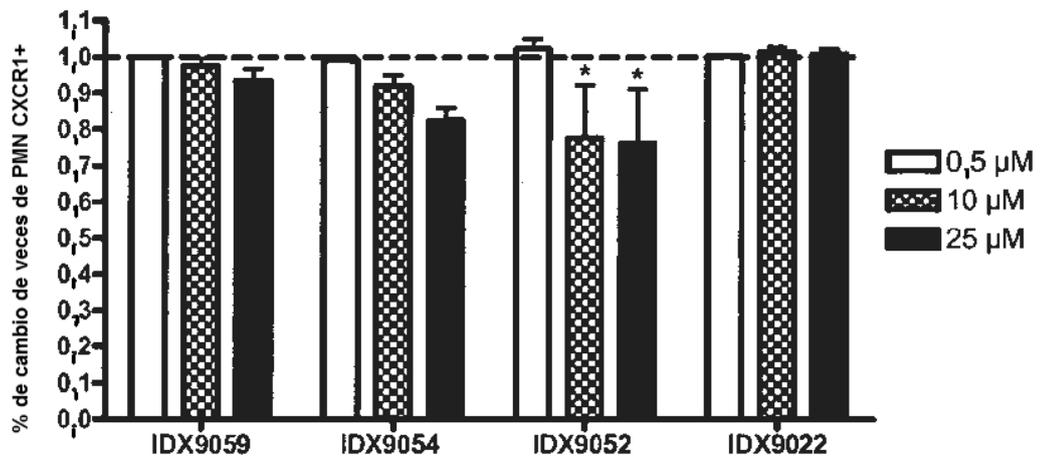


Fig. 8b

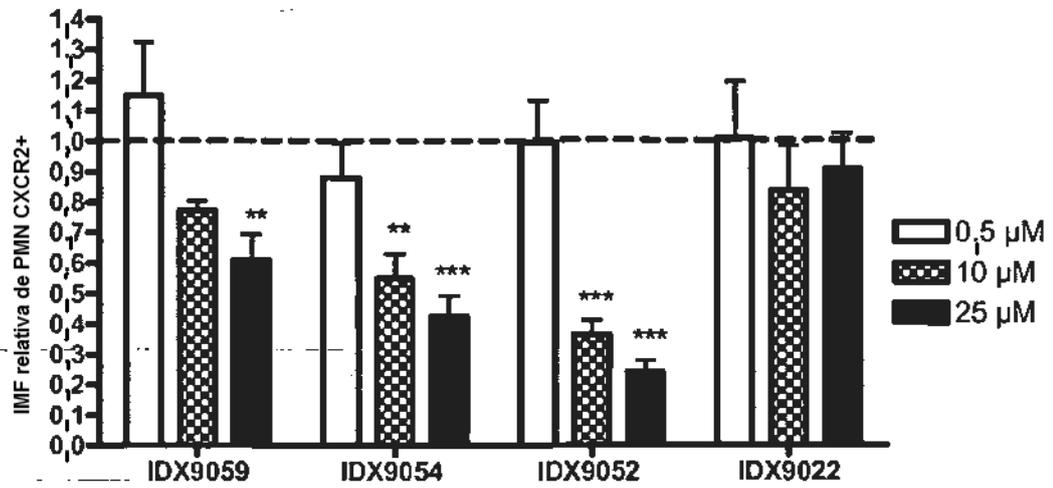


Fig. 8c

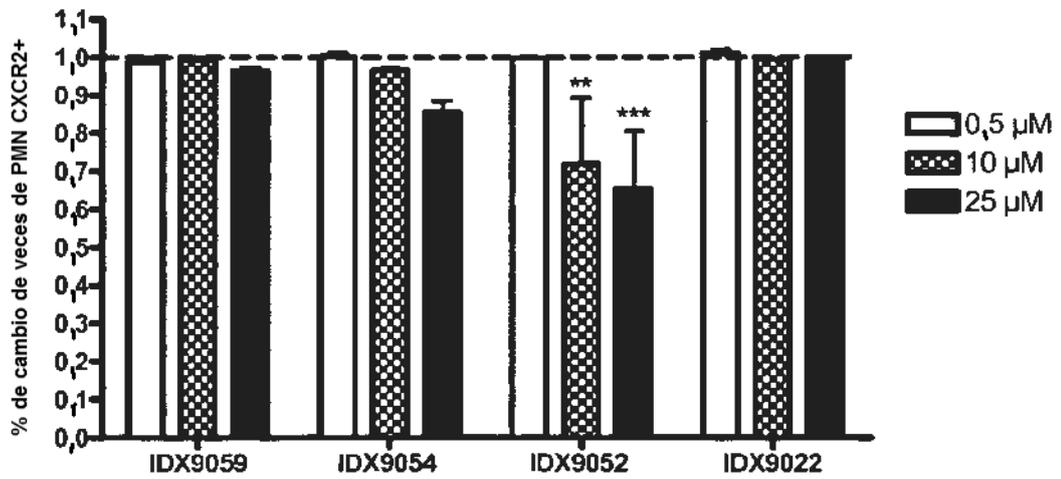


Fig. 8d

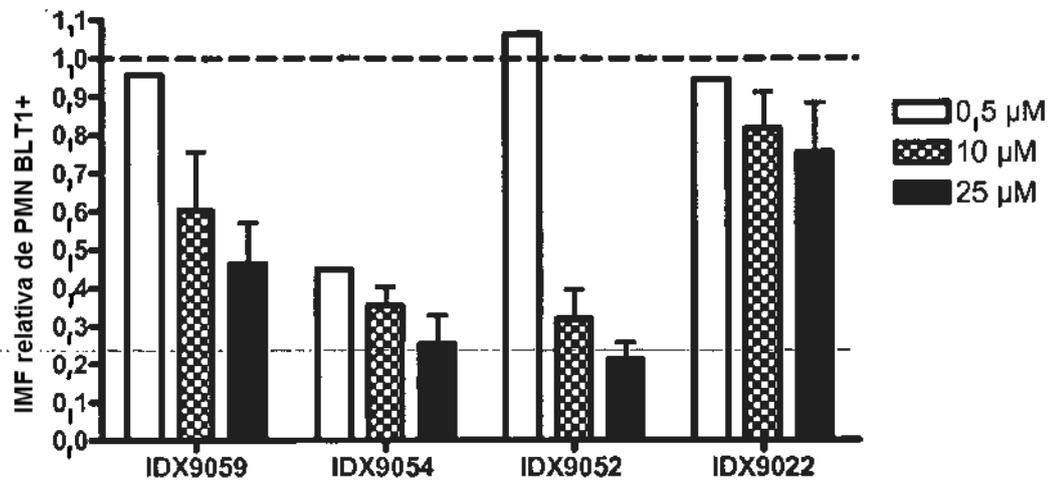


Fig. 8e

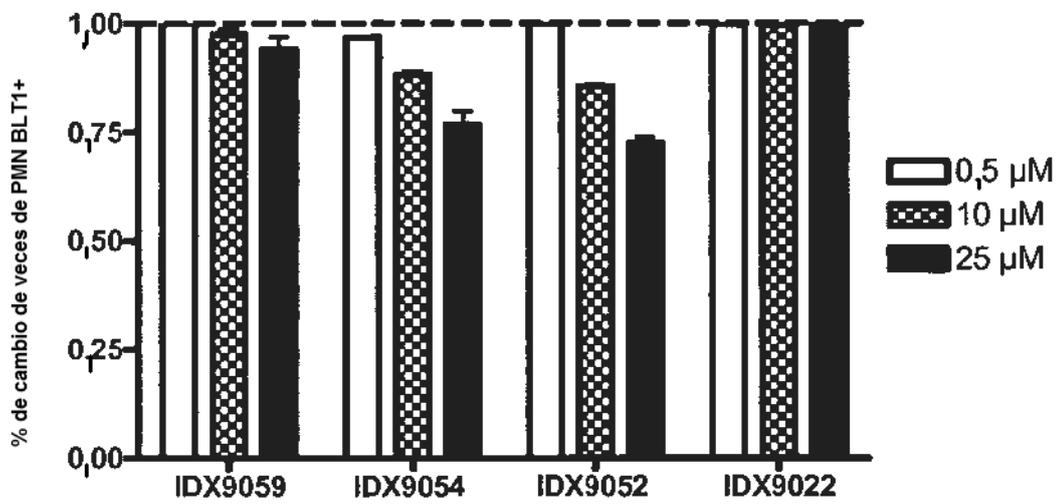


Fig. 8f

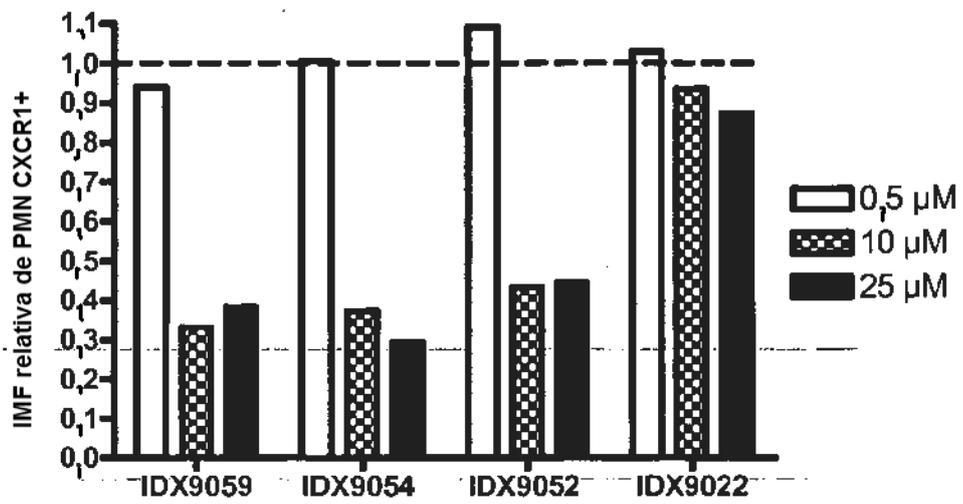


Fig. 8g

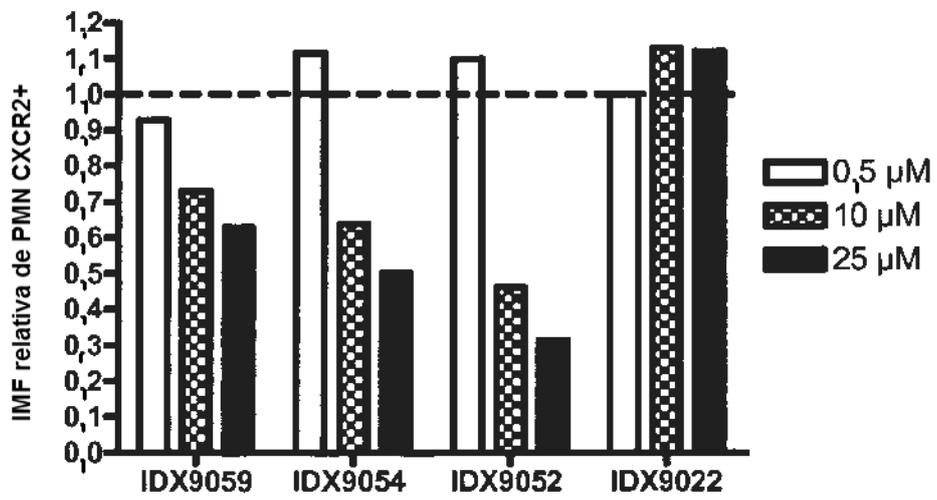


Fig. 8h

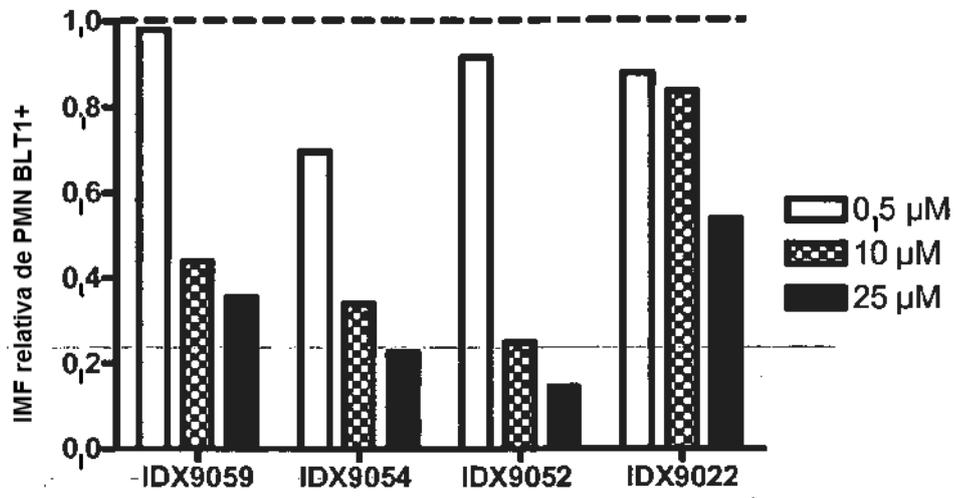


Fig. 8i