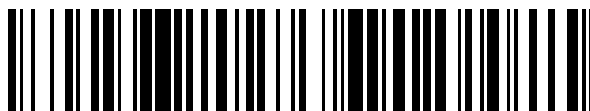


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 751**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2009** **E 14154643 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** **EP 2806028**

54 Título: **Compuestos y métodos para reducir el reclutamiento y/o la 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:
13.11.2017

73 Titular/es:

INDEX PHARMACEUTICALS AB (100.0%)
Tomtebodavägen 23 A
171 77 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

ADMYRE, CHARLOTTE;
AXELSSON, LARS-GÖRAN;
VON STEIN, OLIVER y
ZARGARI, AREZOU

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 641 751 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 métodos para reducir el reclutamiento y/o la migración de células polimorfonucleares

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos y a compuestos para reducir el reclutamiento y/o la migración de células polimorfonucleares, y en particular a compuestos y a métodos para la prevención, el tratamiento o el alivio de diversos estados en los que las propiedades y el comportamiento de células polimorfonucleares juegan un papel en la patogénesis.

Antecedentes

15 Inflamación es un término general para el mecanismo por el cual el cuerpo reacciona a una infección, irritación y otra lesión, movilizándolo componentes del sistema inmunitario. Las células polimorfonucleares se reclutan en las fases tempranas de la inflamación, y migran al sitio de inflamación. Las quimiocinas y sus receptores, junto con otros factores quimiotácticos, son mediadores clave para la migración de PMN. Ejemplos de factores quimiotácticos son IL-8 y LTB₄, que al unirse a sus receptores CXCR1/CXCR2 y BLT1, respectivamente, juegan un papel crucial en el reclutamiento de PMN al sitio de inflamación. De manera importante, la inflamación juega un papel en numerosos estados, no sólo en enfermedades clasificadas normalmente como enfermedades inflamatorias.

25 La isquemia es una escasez absoluta o relativa del riego sanguíneo a un órgano que da como resultado daño tisular debido a la falta de oxígeno y nutrientes. El corazón, el cerebro y los riñones están entre los órganos que son más sensibles a un riego sanguíneo inadecuado. Se usan diferentes estrategias de tratamiento según los órganos implicados y la causa de isquemia. Un ejemplo es, tras una isquemia cardíaca aguda (infarto de miocardio), ha de usarse o bien una terapia trombolítica o bien intervención coronaria percutánea primaria para restaurar el flujo sanguíneo (reperusión miocárdica) en la arteria coronaria relacionada con infarto. Sin embargo, la restauración de la sangre tras un episodio isquémico provoca la muerte de miocitos cardíacos que eran viables inmediatamente antes de la reperusión miocárdica. Esta lesión de miocardio se denomina lesión de reperusión mortal que aumenta la magnitud final de infarto de miocardio. Se cree que la isquemia de miocardio y la lesión de reperusión están asociadas con reacciones inflamatorias que implican diversos tipos de células y citocinas (Entman y Smith 1994).

35 Otro ejemplo es el accidente cerebrovascular, y en particular accidente cerebrovascular isquémico. En un accidente cerebrovascular isquémico, se disminuye el riego sanguíneo a una o más partes del cerebro, conduciendo a disfunción y necrosis del tejido del cerebro en esas partes. Hay varias causas subyacentes para 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 otra parte del cuerpo), hipoperfusión sistémica (descenso general en el riego sanguíneo, por ejemplo como consecuencia de choque) y trombosis venosa.

40 La embolia es un estado grave que puede conducir a riego sanguíneo limitado a órganos o tejidos, aguas abajo del émbolo. Se sabe que la embolia, mencionada anteriormente como factor causante en el accidente cerebrovascular, provoca obstrucción en otros órganos, frecuentemente en los pulmones, riñones o hígado, pero también en las extremidades inferiores. Un émbolo puede formarse de manera espontánea, por ejemplo, cuando una placa se desprende de las paredes de un vaso sanguíneo y se desplaza en el torrente circulatorio. 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, puesto que pueden formarse tanto trombos como émbolos de grasa durante la intervención quirúrgica. También la inmovilidad, la obesidad y el cáncer son factores de riesgo, que se sabe que están asociados con la embolia.

55 La isquemia mesentérica es un estado médico en el que la inflamación y lesión del intestino delgado son el resultado de un riego sanguíneo inadecuado. Las causas del flujo sanguíneo reducido pueden incluir cambios en la circulación sistémica (por ejemplo, presión sanguínea baja) o factores locales tales como opresión de vasos sanguíneos o un coágulo de sangre. Otros trastornos y estados intestinales que conducen potencialmente a isquemia incluyen íleo, distensión, invaginación, y volvulus, en los que la orientación anómala de los intestinos, interrupción del movimiento peristáltico, y otros estados pueden conducir a flujo sanguíneo reducido, inflamación, y finalmente isquemia. Por ejemplo, el íleo puede aumentar la formación de adhesión, porque los segmentos intestinales están en contacto prolongado, permitiendo que se formen adhesiones fibrosas, y la distensión intestinal puede provocar lesión serosa e isquemia. Tales trastornos pueden surgir como resultado de intervención quirúrgica, o bien durante la cirugía o bien durante la recuperación, como resultado de traumatismo, quemaduras, choque o diversas causas etc y pueden conducir a insuficiencia multiorgánica.

65 Las células polimorfonucleares (PMN), en particular neutrófilos polimorfonucleares, que constituyen la mayor parte de los leucocitos sanguíneos, se arrastran a la zona de infarto mediante factores quimiotácticos durante las primeras 6 horas de reperusión miocárdica, y durante las siguientes 24 horas migran al tejido de miocardio. Este

procedimiento se facilita por moléculas de adhesión celular. Los neutrófilos provocan obstrucción vascular y liberan enzimas degradantes y especies de oxígeno reactivas (Vinten-Johansen J, 2004). Por tanto, los neutrófilos son el objetivo primario para el fin del tratamiento o prevención de la inflamación. Diversas intervenciones se dirigieron a reducir los neutrófilos de la zona de infarto durante reperfusión miocárdica, por ejemplo, sangre desleucocitada, anticuerpos frente a moléculas de adhesión celular, e inhibidores farmacológicos de activación complementaria. Sin embargo, los correspondientes estudios clínicos no han mostrado ningún efecto cardioprotector significativo de tales intervenciones (revisado en Yellon, 2007).

La acumulación y activación de PMN ha demostrado jugar un papel central en la patogénesis de una amplia variedad de estados de enfermedad tan diversos como artritis reumatoide, aterosclerosis, colitis ulcerativa, psoriasis, y daño isquémico. Por tanto, la elucidación de mecanismos reguladores endógenos que pueden controlar las funciones de neutrófilos es de considerable interés terapéutico. Se han realizado extensos esfuerzos sobre la identificación de candidatos de fármaco, y se representa un enfoque mediante el uso de compuestos de péptido, que se unen al dominio de integrina I α M e inhiben su formación de complejo con proMMP-9, evitando así la migración de neutrófilos (véase, por ejemplo, el documento WO2004/110477).

Otro enfoque es el uso de lipoxina y derivados de lipoxina, pequeños compuestos lipófilos que se ha demostrado que inhiben el reclutamiento de leucocitos y la infiltración de PMN en modelos animales de inflamación (véase, por ejemplo, el documento WO20001055109).

Aún otro enfoque es el uso de anticuerpos. A principios de los años 90, se identificó un potente anticuerpo específico para CD47 (Ac), 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 β 2 (Parkos, *et al.*, 1996). Al mismo tiempo, se demostró que anti-CD47 también inhibía la migración de PMN a través de las monocapas endoteliales (Cooper, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 92: 3978, 1995). Posteriores estudios con ratones con CD47 suprimido han confirmado la importancia de CD47 en la migración de PMN *in vivo* lo que sugiere que CD47 juega un papel en la regulación de la tasa de reclutamiento de PMN a sitios de infección. (Lindberg *et al.*, 1996).

El trasplante es otra aplicación en la que deben considerarse las consecuencias de isquemia de reperfusión. Trasplante significa la transferencia de células, tejidos o partes de órganos u órganos enteros de una ubicación a otra. Los trasplantes pueden ser autólogos, denominados autoinjertos, en los que se toman principalmente células de un individuo y se devuelven al mismo individuo. Más frecuentemente, el término trasplante se usa para células, tejidos u órganos tomados de una persona, el donante, y dados a otra persona, el receptor. Los trasplantes de riñón son los realizados con más frecuencia. Los trasplantes de corazón, hígado y pulmones también se llevan a cabo regularmente. Según avanza la medicina, otros órganos vitales, incluyendo el páncreas y el intestino delgado, también se están usando en trasplantes. También puede donarse tejido tal como córneas, válvulas cardíacas, piel y hueso.

Por motivos prácticos, un trasplante necesita almacenarse fuera del cuerpo durante un periodo de tiempo, para permitir el transporte, pruebas funcionales determinación del tejido y concordancia del donante y el receptor. Desde la aparición de los trasplantes, los órganos que van a trasplantarse se han conservado en almacenamiento isquémico frío. Aunque este método se destinó a ayudar a reducir el grado de daño a los órganos durante el transporte, todavía se produce un daño significativo. Cuanto más tiempo pase, más grave será el daño. Se han propuesto diferentes soluciones técnicas y químicas. Sin embargo, puesto que el número de personas que necesitan un trasplante supera en mucho al número de donantes, y dado que el procedimiento es muy complicado, costoso y estresante para todas las partes, sigue existiendo la necesidad de mejoras que aumenten la posibilidad de un trasplante satisfactorio. El minimizar el daño a los órganos durante el almacenamiento y transporte es un asunto importante.

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

El documento WO 2007/030580 se refiere a métodos de protección de células frente a ataque citotóxico, que implica la administración de una composición que incluye un agente que se une a, y activa un receptor de tipo Toll a un sujeto, opcionalmente en combinación con la administración de un inhibidor ASIC. Se declara que los métodos son aplicables a la protección de células neuronales y no neuronales. Por ejemplo, se proporcionan métodos de protección de una célula neuronal frente a lesión cerebral excitotóxica. También se proporcionan métodos 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 anterior WO 2007/030580, que se centra en la administración de un oligonucleótido CpG para proteger las células frente a ataque citotóxico.

Sumario

Los presentes inventores han demostrado sorprendentemente que compuestos de oligonucleótidos específicos influyen en las propiedades y el comportamiento de células polimorfonucleares, en particular en el reclutamiento y/o en la migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación, y que, a través de este mecanismo, son útiles en la prevención, el tratamiento y/o el alivio de diversas enfermedades.

Los inventores proporcionan oligonucleótidos y métodos para su uso en terapia, así como en la fabricación de composiciones farmacéuticas para este fin. Las situaciones clínicas en las que es deseable prevenir o reducir el reclutamiento y/o la 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 de reperfusión relacionada con trasplantes de tejidos u órganos; y lesión de reperfusión relacionada con intervención quirúrgica, embolia, cicatrización y traumatismo.

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

Breve descripción de los dibujos

La invención se dará a conocer en más detalle a continuación, en la descripción, los ejemplos no limitativos y las 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 de fármaco prueba o vehículo en el día 16 y 21. Los ratones se expusieron entonces cuatro exposiciones de aerosol. El experimento se terminó en el día 35.

La figura 1b es un histograma que muestra valores medios de fluido BAL derivado de células tras tratamiento según la figura 1 a. El tratamiento con IDX9059 dio como resultado la reducción de los leucocitos, principalmente eosinófilos y linfocitos. La barra indica media \pm DE. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ mediante ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni a posteriori frente a control con PBS.

La figura 2 muestra la reducción de acumulación de PMN tras el tratamiento con compuestos de la invención en un modelo de pleuritis inducida con tioglicolato en ratones. 2a) Se administró IDX9010 20 minutos antes de la inducción de pleuritis y dio como resultado una reducción de PMN que migran en la cavidad pleural del 68,2%. 2b) Se administró IDX9059 20 minutos antes de la inducción de pleuritis y dio como resultado una reducción de PMN que migran en la cavidad pleural del 25,1%. Las barras indican media \pm DE.

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 en rodamiento, A = células de adhesión y T = células transmigradas. $n=4$, media \pm DE. Las células sin estimular revelaron una actividad celular del orden de $R > A > T$. El tratamiento con IDX9059 mostró efectos de regulación por reducción en el rodamiento y la adhesión de células PMN sin estimular.

La figura 3b es un histograma de células por campo de microscopio tras la adición de factor activador de plaquetas quimiotáctico (PAF) en un modelo de microscopía intravital de vénulas en el músculo cremáster en ratones. R = células en rodamiento, A = células de adhesión y T = células transmigradas. En células estimuladas, (tras PAF) el orden de actividad se invirtió, $T > A > R$. El tratamiento con IDX9059 mostró efectos de regulación por reducción en el rodamiento y la adhesión de y transmigración de células PMN. $n=4$, media \pm DE.

Las figuras 4a - c muestran el efecto del tratamiento con fármaco y vehículo de la invención (PBS) tras la inducción de isquemia cerebral en un modelo de rata de isquemia focal.

4a) consiste en dos fotografías que muestran una comparación del grado de daño isquémico en animales no tratados a los que se les administró PBS (portaobjetos E) frente a IDX9059 (portaobjetos D). La oclusión transitoria de la arteria cerebral media se usó para inducir daño cerebral isquémico en ratas Wistar Hannover macho. Se usó láser Doppler para mostrar la circulación sanguínea cortical de la arteria cerebral media (MCA). Tras 90 minutos de oclusión, se retiró el filamento y la circulación de sangre continuó en la MCA y la circulación sanguínea cortical se restituyó. Se inyectaron las sustancias por vía intraperitoneal a las 0 y 24 horas tras la recirculación. Los animales se sacrificaron tras 48 horas de operación y se extirpó el cerebro y se cortó para dar porciones de 2 mm de espesor. Se incubaron entonces las porciones en cloruro de trifenetilretazolol al 0,8% (TTC) en tampón fosfato para distinguir las células cerebrales viables (rojo) de las necrosadas (claro). Se fotografiaron los portaobjetos y se evaluó el daño cerebral evaluado por análisis informático.

4b) es un diagrama de barras que muestra el porcentaje de daño cerebral total.

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

5 4d) es un diagrama de barras que muestra el porcentaje de la región de infarto (núcleo isquémico). Los datos se muestran como media \pm DE (n=4-8). Media indicada con barra. *P<0,05 obtenido mediante prueba de la T con datos no aparados en grupo tratado frente a control con PBS.

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

20 Las figuras 6 a - c muestran el resultado del tratamiento con IDX0150 y vehículo (PBS) en un modelo de ratón de isquemia-reperfusión intestinal. La isquemia se indujo mediante 15 minutos de ligación de la arteria mesentérica seguido por 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 de ratón (estómago, izquierda; intestino delgado; ciego y colon) tras 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.

25 Las figuras 6d - g muestran los niveles de mieloperoxidasa (MPO) en tejido intestinal y pulmonar en el modelo de ratón de isquemia intestinal y lesión de reperfusión. Se administró IDX0150 o PBS por vía subcutánea 20 min antes de la inducción de isquemia (6d, y 6f) o inmediatamente después del inicio de la reperfusión (6e, y 6g). Tras 3 h de reperfusión, se homogeneizaron el intestino delgado (6d, y 6e) y los pulmones (6f, y 6g) y los niveles de MPO se analizaron con ELISA. Los resultados se presentan como valores medios con desviaciones estándar.

30 Las figuras 7a-f muestran los resultados de la expresión de CXCR1 y CXCR2 en PMN periféricas humanas tras la estimulación con diferentes sustancias de prueba. Se estimularon PMN humanas de 5 donantes de sangre sanos con 25 μ M de compuestos de prueba o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Posteriormente se recogieron y se analizaron las células para determinar la expresión de CXCR1 y CXCR2 mediante citometría de flujo. Los cambios en veces en la intensidad de fluorescencia media (MFI) 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 MFI o el % de PMN positivo de células sin tratar a 1 (línea de puntos negra). 7e) ilustra la MFI relativa de PMN CXCR1+ tras la estimulación con 0,5, 10 y 25 μ M de IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (n=5). 7f) muestra la MFI relativa de PMN CXCR1+ tras la estimulación con IDX9074 10 μ 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 mediante ANOVA de dos factores con corrección de Bonferroni a posteriori frente a células sin tratar.

45 La figura 7g ilustra la expresión de CXCR1 en PMN humana estimulada con IDX9059 durante diversos puntos de tiempo. Se estimularon PMN humanas de 3 donantes de sangre sanos con 10 μ M de IDX9059 durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h o 3 h. Posteriormente, se recogieron y se fijaron las células en cada punto de tiempo y se analizaron para determinar la expresión de CXCR1 mediante citometría de flujo. Los cambios en veces en la MFI de CXCR1 de PMN positivo a CD66b en células tratadas con IDX9059 se calcularon normalizando la MFI de células sin tratar a 1. Los resultados se presentan como valores medios \pm EEM.

50 La figura 7h muestra la importancia de oligonucleótidos CpG y oligo-G sobre la expresión en superficie de CXCR1. Se incubaron PMN humanas de 3 donantes de sangre sanos durante 3 h con 0,5, 10 ó 25 μ M de IDX9022 e IDX9059 así como los oligonucleótidos de control modificados IDX0480 e IDX9134, que tienen las mismas secuencias que IDX9022 e IDX9059, respectivamente, pero sin motivos CpG. Posteriormente se recogieron y se analizaron las células para determinar la expresión de CXCR1 mediante citometría de flujo. Los cambios en veces en la MFI de PMN CD66b+ CXCR1+ se calcularon normalizando la MFI de células sin tratar a 1 (línea de puntos negra). Los resultados se presentan como media \pm EEM.

60 La figura 7i demuestra el efecto de cloroquina sobre la regulación por disminución de la expresión en superficie de CXCR1 tras el tratamiento con compuestos de la invención. Se preincubaron PMN humanas de 4 donantes de sangre sanos durante 30 min con 0,5, 5 ó 10 μ g/ml de cloroquina antes de estimularse con 10 μ M de compuestos de prueba durante 3 h. Posteriormente se recogieron y se analizaron las células para determinar la expresión de CXCR1 mediante citometría de flujo. Los cambios en veces en la MFI se calcularon normalizando la MFI de células sin tratar a 1 (línea de puntos negra). Los resultados se presentan como media \pm EEM. Se calculó *P<0,05 mediante

ANOVA de dos factores con corrección de Bonferroni a posteriori frente a células sin tratar.

Las figuras 7j-k muestran los resultados de la expresión en superficie de BLT1 en PMN humanas tras la estimulación con diferentes sustancias de prueba. Se estimularon PMN humanas de 5 donantes de sangre sanos con 0,5, 10 ó 25 μM de compuestos de la invención o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Posteriormente se recogieron y se analizaron las células para determinar la expresión de BLT1 mediante citometría de flujo. El cambio en veces en la MFI (7j) o el % de PMN BLT1+ positivas para CD66b (7k) se calcularon normalizando la MFI o el % de células sin tratar a 1 (línea de puntos negra). Los resultados se presentan como media y EEM. Se calcularon * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ mediante ANOVA de dos factores con corrección de Bonferroni a posteriori frente a células sin tratar.

Las figuras 7l-n muestran el efecto de los compuestos de la invención sobre la quimiotaxia de PMN inducida por IL-8 y LTB₄. Se preincubaron PMN humanas de 5 (7l) o 4-6 (7n) donantes de sangre sanos con 0,5, 10 ó 25 μM de compuestos de la invención durante 1 h tras lo cual se eliminó el compuesto libre mediante lavado y se investigaron las células para determinar su capacidad para migrar hacia IL-8 (7l) o LTB₄ (7n) en un ensayo de quimiotaxia durante 3 h. Los resultados se presentan como el número medio de PMN migradas \pm EEM. Se calcularon * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ mediante ANOVA de un factor con corrección de Dunnett a posteriori frente a células sin tratar incubadas con IL-8/LTB₄. 7m) muestra un experimento separado en el que se preincubaron PMN de 2 donantes de sangre sanos con 0,5, 10 ó 25 μM de IDX9045 durante 1 h, tras lo cual se investigaron las células para determinar su capacidad para migrar hacia IL-8 en presencia de compuesto libre en un ensayo de quimiotaxia durante 3 h.

Las figuras 7o-q demuestran la correlación entre la expresión en superficie de CXCR1, CXCR2 y BLT1 y la migración de PMN tras la estimulación con los compuestos de la invención. Se trazó gráficamente la MFI de CXCR1 (7o), CXCR2 (7p) y BLT1 (7q) de PMN tras la estimulación con compuestos de la invención frente al número de PMN que migraron hacia IL-8 (7o y 7p) o LTB₄ (7q) en el ensayo de quimiotaxia. El ajuste de la curva (r^2) se especifica en las figuras.

Las figuras 8a-f muestran los resultados de la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN periféricas humanas aisladas a partir de pacientes con EM tras la estimulación con diferentes sustancias de prueba. Se estimularon PMN humanas de pacientes con EM con 0,5, 10 y 25 μM de compuestos de prueba o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Posteriormente se recogieron y se analizaron las células para determinar la expresión de CXCR1 (n=4), CXCR2 (n=4) y BLT1 (n=2) mediante citometría de flujo. Los cambios en veces en la intensidad de fluorescencia media (MFI) 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 MFI o el % de PMN positivo de células sin tratar a 1 (línea de puntos negra). Los resultados se presentan como media \pm EEM. Se calcularon * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ mediante ANOVA de dos factores con corrección de Bonferroni a posteriori frente a células sin tratar.

Las figuras 8g-i ilustran los resultados de la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN periféricas humanas derivadas de un paciente asmático tras la estimulación con los compuestos de la invención. Se estimularon PMN humanas de un paciente asmático con 0,5, 10 y 25 μM de compuestos de prueba o con medio solo (sin tratar) durante 3 h. Posteriormente se recogieron y se analizaron las células para determinar la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 mediante citometría de flujo. Los cambios en veces en la intensidad de fluorescencia media (MFI) para PMN CD66b+ CXCR1 (8g), CXCR2 (8h) y BLT1 (8i) se calcularon normalizando la MFI de células sin tratar a 1 (línea de puntos negra).

45 Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la terminología empleada en el presente documento se usa únicamente con el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitativa, dado que el alcance de la presente invención sólo se limitará por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Debe indicarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Además, el término "aproximadamente" se usa para indicar una desviación de +/-2% del valor dado, preferiblemente +/- 5%, y lo más preferiblemente +/- 10% de los valores numéricos, cuando sea aplicable.

Además de lo anterior, se usarán los siguientes términos:

Los términos "homología" y "grado de homología" significan la similitud o identidad entre dos secuencias, en los que una homología del 100% significa que las secuencias son idénticas, y una homología inferior indica la presencia de variaciones. Por ejemplo, para una secuencia que consiste en 20 nucleobases, otra secuencia es homóloga al 90% si 18 bases son las mismas.

"Homólogo funcional" significa secuencias que tienen quizás una homología estructural inferior con respecto a la secuencia dada a conocer, pero que muestran función homóloga *in vivo*, o bien en el organismo sano o bien en el

enfermo, por ejemplo codificando para proteínas iguales o altamente similares con funciones celulares similares.

Los términos "tratamiento", "terapia", "uso terapéutico", "medicamento" y "uso médico" abarcan aplicaciones tanto en seres humanos como en animales o veterinarias.

5 Los presentes inventores han encontrado que oligonucleótidos específicos pueden influir sobre las propiedades y el comportamiento de células polimorfonucleares, por ejemplo su adhesión endotelial y trans migración, y que estos compuestos a través de estos y otros mecanismos son útiles en la prevención y/o el alivio de enfermedades de origen diferente. Estos hallazgos se han confirmado en experimentos con animales y en pruebas *in vitro* realizadas
10 con PMN aisladas de sangre de donante.

Tabla 1. Ejemplos de secuencias de oligonucleótidos

| SEQ ID NO | N.º IDX | Sec. 5'-3' |
|-----------|---------|---------------------------------|
| 1 | IDX9005 | T*C*G*TCCATGGTCA GGGTCCC GG*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*TCTGCCATGGCGCC*G*C*C |
| 5 | IDX9031 | T*C*G*TCGATTCTGCTGCCA*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*TTTCGTCTTTTCGTCT*G*C |
| 10 | IDX9092 | T*T*T*CGTCTGCTTTTCGTCT*G*G |
| 11 | IDX9095 | T*C*G*TCTGCTTTTCGTCT*G*G |
| 12 | IDX9096 | G*A*T*CGTCCGATCG*T*C*C |
| 13 | IDX0150 | G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*G |
| 14 | IDX9052 | G*G*G*GTCGTCTG*G*G*G |
| 15 | IDX0480 | T*G*C*TGCTTCTGCCATGCTG*C*T*T |
| 16 | IDX9134 | G*A*T*GCTCTG*G*G*G |

15 Una realización de la invención es el uso de un oligonucleótido para la producción de una preparación farmacéutica para reducir el reclutamiento y/o la migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación, en el que el oligonucleótido es SEQ ID NO 13 [IDX0150].

20 Preferiblemente, según los resultados actualmente disponibles para los inventores, dicho reclutamiento y/o migración reducidos de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación es el 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 En el uso anterior, el oligonucleótido se administra preferiblemente a través de una de las siguientes vías de administración: administración subcutánea, intraperitoneal, mucosa, intestinal, oral, gástrica, esofágica, bucal, nasal y pulmonar.

30 Según una realización preferida, que puede combinarse libremente con las anteriores, el oligonucleótido se administra como una etapa en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

Según otra realización preferida, que puede combinarse libremente con las anteriores, el oligonucleótido se administra a un paciente que ha experimentado, o se sospecha que ha experimentado, un infarto de miocardio.

35 Según otra realización preferida, que puede combinarse libremente con las anteriores, el oligonucleótido se administra a un paciente que ha experimentado, o se sospecha que ha experimentado, un accidente cerebrovascular.

40 Según otra realización preferida, que puede combinarse libremente con las anteriores, el oligonucleótido se administra a un paciente que ha experimentado traumatismo o quemaduras, o programado para someterse a cirugía.

45 Según otra realización preferida, que puede combinarse libremente con las anteriores, el oligonucleótido se administra a un paciente que tiene una embolia antes de la embolectomía o antes de la administración de un agente trombolítico. Dado que se ha mostrado que los compuestos también tienen un efecto de post-acondicionamiento, se contempla que también se administren tras la embolectomía o administración de un agente trombolítico, algo que aumenta significativamente su utilidad en un entorno de cuidados intensivos.

Según otra realización preferida, que puede combinarse libremente con las anteriores, el oligonucleótido se

administra a un órgano designado para trasplante, o bien *in situ*, antes de la extracción del donante, en tránsito antes de la implantación en el receptor, o bien *in vivo*, antes o en el momento de restablecer el flujo sanguíneo.

5 Otra realización de la invención es una disolución técnica para el almacenamiento y/o transporte de trasplantes, en la que dicha disolución comprende un oligonucleótido que puede influir sobre las propiedades y el comportamiento de células polimorfonucleares, por ejemplo suprimir la adhesión endotelial y el reclutamiento y/o la migración de células polimorfonucleares, en una cantidad suficiente para la prevención y/o el alivio de daño isquémico, y dicho oligonucleótido es SEQ ID NO 13 [IDX0150].

10 En los métodos de uso anteriores, el oligonucleótido se administra en una dosis terapéuticamente eficaz. La definición de una "dosis terapéuticamente eficaz" depende de la enfermedad y el entorno de tratamiento, siendo una "dosis terapéuticamente eficaz" una dosis que, sola o en combinación con otros tratamientos, da como resultado una mejora medible del estado del paciente. Un experto puede determinar una dosis terapéuticamente eficaz o bien de manera empírica o bien basándose en experimentos de laboratorio, realizados sin carga excesiva. El médico
15 encargado también puede determinar una dosis adecuada, basándose en su experiencia y teniendo en cuenta la naturaleza e intensidad de la enfermedad, así como el estado del paciente.

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

25 El oligonucleótido puede administrarse en una única dosis o en dosis repetidas. La realización actualmente más preferida conlleva una única dosis del oligonucleótido según la invención, administrada a una membrana mucosa, por ejemplo administrada por vía intranasal, oral, rectal o intravaginal en una cantidad de menos de aproximadamente 2000 µg, preferiblemente menos de aproximadamente 500 µg, preferiblemente de aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal.

30 Otra realización actualmente preferida es la administración del oligonucleótido en dos o tres dosis, separadas en el tiempo en 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, o bien *in situ*, antes de la extracción del donante, en tránsito antes de la implantación en el receptor, o bien *in vivo*,
35 antes o en el momento de restablecer el flujo sanguíneo. Preferiblemente el oligonucleótido está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2000 µg/l en una disolución usada para el acondicionamiento del trasplante antes de la extracción del donante. Alternativamente, o además de ello, el oligonucleótido está presente en una concentración de 0,1 a aproximadamente 1000 µg/l en a disolución usada para transportar el trasplante. Alternativamente, o además de ello, el oligonucleótido está presente en una concentración de 0,1 a aproximadamente 1000 µg/l en una disolución usada para el acondicionamiento del trasplante antes de
40 restablecer el flujo sanguíneo.

Hay indicaciones de que el oligonucleótido puede administrarse no sólo antes del, sino también simultáneamente con el, o incluso después del, restablecimiento del flujo sanguíneo. En el contexto del ejemplo 4 se comenta la
45 posibilidad del pre-acondicionamiento, así como del post-acondicionamiento. Los resultados muestran sorprendentemente que tratamiento con SEQ ID NO 8 [IDX9059], también tras la inducción del accidente cerebrovascular, pueden servir como post-acondicionamiento y proteger al cerebro frente a lesión isquémica.

Las realizaciones anteriores son mutuamente incluyentes, lo que significa que diferentes dosis, modos de
50 administración e intervalos de tiempo pueden combinarse libremente dentro de las realizaciones indicadas, así como con otras realizaciones que resulten evidentes para un experto.

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

Ejemplos

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

Materiales y métodos

65 Animales

Se usaron ratones Balb/c hembra (8 semanas), obtenidos de B&K Sollentuna, Estocolmo, Suecia, en el experimento. Se alimentaron los ratones con una dieta de pienso para roedores completa, R36 (Laktamin AB, Estocolmo, Suecia) y agua potable del grifo a voluntad. Se mantuvieron los animales en salas para animales a 21°C, 63°C, y con una humedad relativa del 55% ± 15%. El sistema de ventilación estaba diseñado para producir 10 cambios de aire por hora. La sala se iluminó para producir un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La luz estaba encendida desde las 07:00 h hasta las 19:00 h. Se mantuvieron los ratones en jaulas de policarbonato transparente (Macrolone tipo III) (área de suelo: 820 cm²), 5 en cada jaula. El lecho en las jaulas fue lecho 4HV Aspen (Tapvei, Finlandia). Se identificó cada jaula mediante una tarjeta de jaula marcada con el número de estudio, el número de grupo, el sexo y el número de animales.

Sensibilización y exposición a aerosol

Se sensibilizó a los ratones por vía intraperitoneal con 200 µl de OVA/gel de hidróxido de aluminio (1:3) en los días 0 y 12 (figura 1a). Se disolvió OVA (albúmina de huevo de pollo de calidad V, Sigma, St. Louis, MO) en solución salina y se mezcló con gel de hidróxido de aluminio hasta una concentración de 50 µg/ml mediante rotación a 4°C durante 3 h. En los días 23, 26, 30 y 33 (véase la figura 1a), se expusieron los pulmones de los ratones a inhalación de OVA en aerosol durante 30 minutos usando una cámara de exposición Batelle. Los aerosoles se generaron mediante un nebulizador de aire comprimido (Collison 6 chorros) a un flujo de aire de 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 sin sensibilizar no recibió otro tratamiento aparte de OVA en aerosol en los días 23, 26, 30 y 33. También hubo un grupo de control de ratones sensibilizados que no recibió exposición a aerosol.

Oligonucleótido

En este modelo de OVA (figura 1a) se sometió a prueba un oligonucleótido seleccionado, IDX9059, (SEQ ID NO 8, tabla 1). Los oligonucleótidos se sintetizaron en biomers.net GmbH, Ulm, Alemania y se almacenaron congelados a -20°C.

Formulación

Se disolvieron los oligonucleótidos inmunomoduladores en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Fluka Biochemika Ultra, Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Tratamiento de la inflamación de las vías respiratorias inducida por OVA

En este experimento, se administró instilación intranasal de IDX9059 (1,247 µg/µl) en los días 16 y 21 en un entorno profiláctico (figura 1a). Se administró la sustancia en 40 µl de PBS suministrando una dosis de ~50 µg/ratón (49,88 µg/ratón). Se instiló PBS en los dos grupos de tratamiento con sensibilización simulada, el mismo volumen total que para el compuesto de prueba en los días 16 y 21.

Análisis de los parámetros de inflamación de las vías respiratorias

Se sacrificó a los ratones mediante dislocación cervical 42 h tras la última exposición a aerosol con OVA. Se canuló la tráquea con tubos de polietileno (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.) y se realizó lavado broncoalveolar (BAL) usando alícuotas de 4 x 1 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) helada (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). Se centrifugó el líquido de BAL (400 g, 10 min, 4°C) y se recuperó y se congeló el sobrenadante para análisis posteriores. Se resuspendieron las células en 0,4 ml de PBS y se contó el número total de leucocitos usando exclusión con azul trípango en una cámara de Burkner. Se tiñeron preparaciones de Cytospin (Cytospin 3, Shandon, Runcorn, RU) por duplicado de células de líquido de BAL con tinción de May Grünwald-Giemsa para recuentos diferenciales, usando criterios morfológicos convencionales.

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones estadísticas usando análisis de varianza unidireccional (ANOVA) usando la corrección de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett para comparar con ratones de control sensibilizados tratados con PBS (GraphPad Prism 4). Los datos se muestran como la media ± desviación estándar. Se consideró significativo un valor de P inferior a 0,05.

Resultados

El modelo de asma alérgica inducida por ovoalbúmina es un modelo usado ampliamente para reproducir la eosinofilia de las vías respiratorias, la inflamación pulmonar y los niveles de IgE elevados encontrados durante el asma. El análisis de este modelo se basa en indicadores de asma generales tales como análisis de BAL donde se identifican y se cuentan, respectivamente, el tipo y la cantidad de células inflamatorias infiltrantes.

Por consiguiente, se contaron las células con líquido de BAL derivadas de cada ratón tal como se describe y se representaron los valores como un histograma combinado proporcionando valores medios para los diferentes grupos (figura 1 b).

5 En términos generales, el nivel de inflamación de las vías respiratorias inducida fue alto tal como se indica por el gran flujo de los 4 tipos de células analizadas en los pulmones de los animales (grupo con PBS). Los grupos de control no demostraron signos de inflamación inducida lo que confirma que los animales no presentaron una respuesta alérgica natural a la proteína ovoalbúmina en aerosol y que la proteína ovoalbúmina usada no estaba contaminada, por ejemplo, con LPS.

10 La ausencia completa de cualquier signo de inflamación en los grupos de control "sin aerosol" confirmó que el procedimiento experimental de inmunización con OVA por sí mismo no indujo inflamación del pulmón.

15 Tras el tratamiento nasal, la sustancia de prueba SEQ ID NO 8 [IDX9059] tuvo un efecto reductor sobre las células inflamatorias, es decir, los leucocitos ($P < 0,001$), eosinófilos ($P < 0,001$) y linfocitos ($P < 0,05$).

20 En este modelo *in vivo* de asma alérgica, los leucocitos, es decir los eosinófilos principalmente PMN, desempeñan un papel importante en la inflamación pulmonar. Se observó una reducción estadísticamente significativa en el número de leucocitos, eosinófilos y linfocitos infiltrantes en el líquido de BAL en los animales cuando se trataron con el compuesto inventivo SEQ ID NO 8 [IDX9059]. Esto indica que el compuesto inventivo puede impedir la inflamación a través de la inhibición de la infiltración de PMN.

2. Pleuritis inducida por tioglicolato en ratones C57/Bl6

25 Materiales y métodos

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

30 Se anestesió a los ratones mediante una inyección intraperitoneal de 0,15-0,20 ml de una mezcla de ketamina (Ketalar® Parke- Davis; 25 mg/ml) y xilazina (Narcoxilo vet.® Veterinaria AG; 5 mg/ml).

35 Se canuló la vena yugular izquierda con tubos de polietileno (PE10) para la administración intravenosa (i.v.). Se practicó una incisión en la piel en el lado derecho del tórax. Tras la disección del músculo subyacente, se indujo pleuritis (inflamación del saco pulmonar) mediante una única inyección intrapleural de 100 µl de tioglicolato (Sigma). Se usó PBS estéril como control negativo. Se inyectó i.v. dextrano conjugado con FITC en PBS (100 µl, 30 mg/ml). Tras 4 h, se sacrificó a los animales con una sobredosis de anestesia, se abrió cuidadosamente el tórax y se retiró el exudado por aspiración y se anotó el volumen. Entonces se lavó el tórax con 1 ml de EDTA 3 mM helado en PBS. Se desechó el exudado que estaba contaminado con glóbulos rojos.

40 Se centrifugó el exudado y el material lavado a 1500 g durante 5 min y se usó el sobrenadante para la medición de la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro (Fluoroskan Acsent, LabSystems) y se calculó el volumen de aclaramiento de FITC-dextrano. Se resuspendió el sedimento en PBS con BSA al 0,1% durante 15 min para bloquear la unión de anticuerpo no específico. Se usaron 10 µl de suspensión celular para el recuento diferencial de WBC en una cámara de Bürker.

45 Se tiñeron las células del exudado con anticuerpos específicos para neutrófilos y macrófagos y se analizaron mediante citometría de flujo (software FACSort y CellQuest, BD). El análisis incluyó el recuento de glóbulos blancos totales, basándose en las apariciones típicas en la dispersión hacia delante y lateral. Las PMN y los macrófagos se identificaron adicionalmente por su expresión de Ly6G y F4/80, respectivamente.

50 Con el fin de someter a prueba el efecto antiinflamatorio de los oligonucleótidos reduciendo la migración de PMN según las realizaciones de la presente invención, los compuestos que iban a someterse a prueba se administraron por vía intraperitoneal, a una dosis de 100 µl, es decir 50 µg/ratón, aproximadamente 20 minutos antes de la inducción de pleuritis. En este estudio se sometieron a prueba IDX9010, IDX9054, IDX9059, (SEQ ID NO 2, 7, y 8, respectivamente, tabla 1) e IDX 0150 (SEQ ID NO 13).

Resultados

60 El modelo de pleuritis inducida por tioglicolato es uno de los modelos de elección para el examen 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 someterse a prueba simultáneamente.

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

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

Los experimentos usando un anticuerpo anti-PMN mostraron que el anticuerpo anti-PMN podía reducir igualmente PMN y edema a niveles similar que los compuestos inventivos (datos no mostrados). La administración profiláctica de compuestos inventivos en pleuritis inducida por tioglicolato condujo a reducción de migración de PMN a la cavidad pleural.

3. Microscopía intravital en un modelo murino de inflamación vascular

Se investigó el efecto antiinflamatorio *in vivo* del oligonucleótido IDX9059 (SEQ ID NO 8, tabla 1) sobre la extravasación de leucocitos en ratones. En respuesta a un estímulo quimiotáctico, las células inflamatorias transmigran a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia un gradiente de estímulo. Para transmigrar, las células deben adherirse en primer lugar de manera intermitente a las paredes interiores del vaso, es decir rodamiento (R), después comienzan a adherirse más firmemente, adherencia (A), y luego migran hacia el tejido circundante, trans migración (T). Se usó el factor activador de plaquetas (PAF) para inducir este proceso inflamatorio. En los vasos sin estimular normales el orden de estos acontecimientos era R>A>T. Tras la exposición a PAF se invirtió este orden, T>A>R, mostrando que las células comenzaban a adherirse y a transmigrar.

Introducción

La movilización de leucocitos es un requisito previo para una respuesta inflamatoria. En vasos sanguíneos, una serie de acontecimientos entre los glóbulos blancos y el endotelio condujo a acumulación de células inflamatorias a un sitio de lesión o inflamación (Lindbom, 1983). Una célula importante en esta cascada de acontecimientos es la célula polimorfonuclear (PMN). Las PMN se transportan en el torrente circulatorio. El torrente circulatorio tiene una velocidad mayor en el centro del vaso sanguíneo y una velocidad menor hacia el borde, lo que permite el contacto entre las PMN y la pared del vaso sanguíneo. Mecanismos moleculares facilitan la adherencia de las PMN al endotelio (Penberthy *et al.*, 1997). Un grupo de tales moléculas se denominan selectinas. Al principio, esta interacción sólo es parcial haciendo que las PMN rueden a lo largo del endotelio. Con la estimulación de moléculas proinflamatorias, esta adherencia se vuelve más firme haciendo que las PMN se adhieran al endotelio, un fenómeno denominado adhesión. La adhesión permite que las PMN trans migren activamente a la capa endotelial y que entren posteriormente en el tejido conjuntivo y que se dirijan mediante un gradiente de factores inflamatorios hacia el epicentro de la inflamación.

Todos estos casos pueden estudiarse *in vivo* mediante microscopía intravital. La microscopía intravital permite el estudio de las células en vasos pequeños 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.

Este ejemplo aborda con microscopía intravital el músculo cremáster de ratones. El músculo cremáster es el músculo que controla la temperatura del testículo en el escroto. La vasculatura de este músculo puede exponerse fácilmente bajo un objetivo de inmersión en agua y superfundirse con solución salina tamponada a temperatura corporal. Pueden añadirse sustancias quimiotácticas o proinflamatorias al tampón de superfusión y pueden añadirse sustancias farmacológicas al superfundido o al animal.

El rodamiento, la adhesión y la trans migración pueden estudiarse después mediante la ayuda de grabación en vídeo a intervalos de tiempo y las grabaciones pueden usarse después para la cuantificación de células o para mediciones de las distancias recorridas.

El objetivo de este estudio fue estudiar los efectos del compuesto inventivo IDX9059 sobre la migración de células inflamatorias en vénulas tras la estimulación con PAF en el ratón.

Materiales y métodos

Material animal y condiciones: Se mantuvieron ratones C57BL/6 SPF de Scanbur AB, Sollentuna, Suecia, en una sala para animales con temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclos de luz-oscuridad de 12 h cada uno, y se les permitió acceso libre a comida y agua.

Compuesto de prueba: El oligonucleótido DEQ ID NO 8 [IDX9059] se sintetizó en biomers.net GmbH, Ulm, Alemania

en condiciones distintas a las BPF y se proporcionó en disolución de PBS. Se almacenó el oligonucleótido a -20°C como disoluciones madre y se prepararon 2-3 días antes del inicio del experimento.

5 Formulación: Se diluyó adicionalmente el oligonucleótido en PBS (Fluka, Sigma) a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración mediante la ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec™ 3000, BIO-RAD, Hercules, EE.UU.) a una precisión del 95%, hasta que se alcanzó la concentración deseada.

10 Tratamiento de la inflamación inducida por PAF: Se administró a los animales IDX9059 s.c., 50 µg/100 µl/ratón, aproximadamente 20 minutos antes de la inducción de inflamación.

15 Microscopía intravital de reclutamiento de leucocitos: Se usaron grupos de 4 ratones. Se anestesió a los ratones mediante una inyección intraperitoneal de 0,15-0,20 ml de una mezcla de ketamina (Ketalar®; Pfizer AB, Sollentuna, Suecia; 25 mg/ml) y xilazina (Narcoxilo vet.®; Intervet International B.V., Países Bajos; 5 mg/ml). Se canuló la vena yugular izquierda con tubos de polietileno (PE10) para la administración continua de anestesia. Se practicó una incisión ventral en el escroto derecho y se extirpó un testículo. Se disecó el músculo cremáster liberándolo de la fascia, se practicó una incisión y se sujetó dejándolo plano sobre una base transparente para permitir la transiluminación. Entonces se sujetó el testículo por el lado. Se mantuvo la preparación húmeda y caliente mediante la superfusión continua de un tampón de bicarbonato con control de temperatura a 37°C, manteniendo los niveles fisiológicos de temperatura, pH y tensiones de gas. Se indujo extravasación de leucocitos mediante la adición del factor activador de plaquetas (PAF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.; 100 nM) a la disolución de superfusión durante 60 min. Se realizaron mediciones de rodamiento, adhesión y transmigración antes y tras la estimulación. Se obtuvieron grabaciones en vídeo de vénulas bien definidas de 20 -50 µm de ancho. Se determinó el rodamiento como el número de leucocitos que pasan una línea de referencia perpendicular al flujo sanguíneo durante 30 segundos. Las células dentro del vaso se clasificaron como adherentes si permanecían estacionarias durante más de 30 segundos. Se contaron las células que transmigraron en el tejido extravascular dentro de una distancia de 70 µm del vaso estudiado.

25 Todas las observaciones microscópicas se realizaron 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 cámara de vídeo Panasonic WV-1550/G (Panasonic, Japón).

Resultados

35 Para transmigrar, las células comienzan a rodar, después empiezan a adherirse más firmemente y luego migran hacia el tejido circundante. Se usó el factor activador de plaquetas (PAF) para inducir este proceso inflamatorio y en vasos sin estimular normales el orden de estos acontecimientos fue R>A>T. En ausencia de factor quimiotáctico (PAF) SEQ ID NO 8 [IDX9059] pudo reducir el rodamiento en un 81,4% y la adherencia en un 41,9% (figura 3a).

40 Tras la exposición a PAF, se invirtió el orden de acontecimientos (rodamiento, adhesión y transmigración), T>A>R, lo que demuestra que las células comenzaron a adherirse y transmigrar. De acuerdo con esto, el resultado muestra que cuando se añadió PAF, las células en transmigración desde un nivel basal de 1,7 células/campo (antes de añadir PAF, figura 3a), alcanzaron 20,66 (tras añadir PAF, figura 3b). Hubo una reducción de células en rodamiento desde 22,3 células/campo (antes de añadir PAF, figura 3a) hasta 7,7 (tras añadir PAF, figura 3b), y las células en adherencia permanecieron a aproximadamente 14 células/campo. En estas condiciones, SEQ ID NO 8 [IDX9059] redujo el rodamiento, la adherencia y la transmigración tras la exposición a PAF. La reducción fue para las células en rodamiento del 48,4%, para las células adherentes del 28,5% y para las células en transmigración del 54,4%, lo que demuestra que SEQ ID NO 8 tiene propiedades antiinflamatorias que podrían ser eficaces en diferentes niveles de inflamación y que actúan sobre diferentes mediadores inflamatorios.

50 Tomados juntos, estos resultados demuestran los efectos antiinflamatorios de SEQ ID NO 8 [IDX9059]. Sorprendentemente, SEQ ID NO 8 mostró efectos reductores sobre los valores de rodamiento y adherencia en ausencia del agente quimiotáctico. Esta es una indicación de que esta secuencia tiene potencial para usarse en situaciones clínicas en las que se prefiere la inhibición de infiltración de PMN.

4. Estudio del efecto inhibitor de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre el daño isquémico cerebral en un modelo de rata experimental

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

Introducción

65 Se ha demostrado que puede inducirse tolerancia contra la lesión isquémica mediante LPS a través de TLR4 en diversos órganos tales como el corazón, el cerebro y el riñón (Heemann *et al* 2000, Rowland *et al*, 1997; Tasaki *et al*,

1997). Aunque el mecanismo de protección no se entiende bien, el paradigma es que una pequeña respuesta inflamatoria mediante precondicionamiento con LPS mitiga el daño posterior de la respuesta inflamatoria asociada con estímulos secundarios más potentes. Hay tanto similitudes como diferencias entre las rutas de señalización de TLR conocidas y tanto TLR4 como TLR9 se expresan en algunas células del sistema inmunitario y el sistema nervioso central (McKimmie y Fazakerley 2005; Tang *et al*, 2007). Por consiguiente, se cree que los oligodesoxinucleótidos CpG desencadenan la activación del TLR9 dentro de poblaciones celulares seleccionadas para promover la inmunidad innata e inducir inmunidad adaptativa sesgada de Th1.

Un objetivo de este estudio fue investigar si los compuestos específicos identificados por los presentes inventores también podrían disminuir la lesión isquémica en el cerebro de manera similar a la tolerancia inducida por LPS a la lesión cerebral isquémica.

Materiales y métodos

Material animal y condiciones: Las ratas usadas fueron Wistar Hannover consanguíneas obtenidas de Harlan Horst, los Países Bajos. El peso de cada rata fue de aproximadamente 350-400 gramos. Se mantuvieron las ratas en jaulas abiertas convencionales de tipo Macrolon 3. Se alojaron las jaulas en estanterías abiertas con flujo de aire continuo tras cortinas de plástico. Se adquirieron lechos convencionales de Scanbur - BK, Sollentuna, Suecia. Se cambiaron los lechos una vez a la semana. La temperatura en las salas para animales fue de 18°C - 22°C y se controló a través del sistema de ventilación ambiental en el laboratorio. El ciclo de luz fue de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz (luces encendidas a las 06:00).

Se facilitó a las ratas una dieta para ratas normal adquirida de Scanbur- BK, Sollentuna, Suecia. Se rellenaron las botellas de agua cuando fue necesario durante la aclimatación y la experimentación. La comida y el agua se administraron a voluntad.

Las ratas tenían el estado SPF de FELASA y el alojamiento y el sistema de cambio se diseñaron para garantizar que se conservaría el estado de SPF durante el estudio. Personal formado manejó a las ratas. Se dispuso de conocimientos veterinarios a corto plazo del Departamento de Veterinaria en LU. Se tomaron registros y decisiones diarios con respecto al bienestar de los animales.

Se sometieron a prueba los compuestos de prueba: IDX9010, IDX9054, IDX9059 e IDX9074 (SEQ ID NO 2 y 7-9, respectivamente, en la tabla 1) para determinar su eficacia *in vivo* para reducir el daño cerebral en un modelo de rata experimental de isquemia cerebral. Además, un inhibidor de proteína cinasa activada por mitógeno [1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofiniltio)butadieno; C₁₈H₁₆N₆S₂] (U0126, Sigma-Aldrich) y PBS (Invitrogen) sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente. También se usó un tratamiento de combinación de IDX9059 y U0126 en una fase posterior en el estudio. Todas las sustancias IDX se sintetizaron en Biomers.net GmbH, Ulm, Alemania en condiciones distintas a las BPF y se proporcionaron en disolución de PBS. Los compuestos de prueba se almacenaron a -20°C como disoluciones madre. Con la excepción de U0126, y la terapia de combinación (U0126+IDX9059), el resto de las sustancias de prueba se administraron de manera enmascarada.

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

Experimentos con animales y dosificación: Se anestesió a las ratas con isoflurano (4,5%) mezclado con NO₂:O₂ (70%: 30%). Se usó láser Doppler para monitorizar el flujo sanguíneo cortical de la arteria cerebral media (MCA). Se introdujo un filamento en la arteria carótida interna, se empujó hacia delante hasta que ocluyó el flujo sanguíneo en la MCA derecha; una reducción de más del 80% en la señal de láser Doppler (flujo sanguíneo cortical) confirmó la oclusión.

Se controlaron la tensión arterial, los gases sanguíneos y la glucemia durante la operación. Tras 90 minutos de oclusión, se retiró el filamento y la circulación de sangre continuó en la MCA y se restituyó el flujo sanguíneo cortical (reperusión). Sólo se incluyeron en el estudio los animales que tenían una disminución de más del 80% en el flujo sanguíneo tras la oclusión y alta recirculación de flujo sanguíneo cortical.

Se controlaron la temperatura corporal y el comportamiento neurológico (puntuación) con la operación y a las 0, 1, 2, 24, 48 horas tras la recirculación. Se inyectaron 100 µl de los compuestos de prueba junto con 200 µl de PBS por vía intraperitoneal a las ratas 0 y 24 horas tras la recirculación. Se sacrificó a los animales 48 horas tras el final de la operación, y se extirpó rápidamente el cerebro y se enfrió en solución tampón de bicarbonato. Se prepararon cortes coronales de dos mm de grosor (6 cortes) del cerebro y se tiñeron con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; Sigma Aldrich) al 1% disuelto en solución salina. Se calculó el volumen de infarto mediante la integración numérica de la zona isquémica de cada corte usando la regla del trapecio y se expresó como el porcentaje del volumen cerebral total en los cortes usando el programa de software Brain Damage Calculator 1.1 (MB Teknikkonsult, Lund, Suecia).

Datos estadísticos: Se realizaron análisis estadísticos usando Prism (Graphpad versión 4.03, San Diego, CA,

EE.UU.). Se usó la prueba de la t de Mann-Whitney no paramétrica para calcular la significación estadística. Un valor de P menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo (*).

Resultados

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

10 En total hubo 7 grupos diferentes en el estudio. Se usó un total de aproximadamente 60 ratas en el estudio con una mortalidad del 30% debido a la operación. Se recogieron datos de todos los experimentos, tanto conjuntamente con la operación como en el periodo de seguimiento.

15 Tras la tinción con TTC, el tejido cerebral intacto era de color rojo brillante, mientras que las regiones de daño eran de color blanco pálido (figura 4a). Se cortaron los cerebros y se fotografió cada corte y se analizó con un programa de imágenes (véase Métodos). Las figuras describen diversos aspectos del infarto cerebral; área de infarto total (figura 4b), área de penumbra o necrosis neuronal selectiva (SNN) (figura 4c), y el núcleo isquémico (el área blanca tal como se muestra en la figura 4a, interpretada como núcleo) (figura 4d).

20 El estudio se realizó de manera enmascarada 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. Tal como puede observarse en las figuras 4b y 4d, hubo una reducción marcada (35-40%) en el volumen de infarto por la sustancia D (IDX9059) y la sustancia de control U0126. No hubo ninguna diferencia significativa en la reducción de SNN con diferentes sustancias (figura 4c).

25 Tras el desenmascaramiento del estudio, el último grupo introducido en el estudio fue la combinación de IDX9059 y U0126. La reducción no fue aditiva tal como se esperaba, sino menor que la observada para cada una de las sustancias sola.

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

35 Los resultados muestran que el tratamiento con SEQ ID NO 8 [IDX9059] tras la inducción del accidente cerebrovascular puede servir como post-acondicionamiento y para proteger al cerebro contra la lesión isquémica.

40 Anteriormente se había demostrado que el inhibidor de MEK1/2 (U0126) puede reducir el tamaño de infarto en un 30-40% (Henriksson M, 2007, Wang ZQ, 2004). En el presente estudio esta sustancia sirvió como control positivo y cuando se administró por vía i.p., redujo el volumen de infarto en un 33%. También hubo un buen efecto sobre la evaluación de neurología con una mejora mediante U0126 a las 48 horas; por tanto, se confirma que este experimento se realizó según otros investigadores (Henriksson *et al.*, 2007).

45 Recientemente, Stevens *et al.* (2008) mostraron que el preacondicionamiento con oligonucleótidos que contienen CpG puede inducir neuroprotección contra la lesión isquémica y que esta tolerancia es dependiente de TNF-alfa. Entre los 4 compuestos inventivos (IDX9010, IDX9074, IDX9054 e IDX9059) usados en este estudio, IDX9059 e IDX9074 mostraron mejor efecto neuroprotector. Sin embargo, se han usado previamente cuatro oligonucleótidos en estudios de esplenocitos de ratas Wistar para evaluar la expresión de TNF alfa usando PCR cuantitativa. Los resultados mostraron que IDX9054 e IDX9010 podían inducir la expresión de ARNm de TNF alfa, mientras que IDX9059 e IDX9074 no indujeron TNF alfa. Por tanto, esto puede sugerir que se requieren otros factores, además de TNF alfa, que proporcionan neuroprotección colectivamente. Además, en el estudio realizado por Steven *et al.* (2008), el efecto protector de los oligonucleótidos que contienen CpG sólo se observó cuando se administraron de manera profiláctica 1-14 días antes de la inducción de accidente cerebrovascular. En el presente estudio, los fármacos inventivos se administraron de manera terapéutica 90 min tras la inducción del accidente cerebrovascular, destacando la potencia de SEQ ID NO 8 [IDX9059].

55 Tras el desenmascaramiento del presente estudio, SEQ ID NO 8 [IDX9059] demostró ser el más eficaz en la reducción del daño isquémico en el cerebro. Puesto que el control positivo, la sustancia U0126 tuvo igualmente un efecto pronunciado en la reducción del daño isquémico, también se evaluó un tratamiento de combinación de U0126 y SEQ ID NO 8 [IDX9059]. No se esperaba la reducción de la lesión isquémica obtenida por el tratamiento de combinación y se desconoce el motivo para ello. Sin embargo, podría ser que las dos sustancias antagonizaran cada una el efecto de la otra.

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

65 5. Estudio del efecto inhibidor del oligonucleótido inmunomodulador sobre el daño isquémico miocárdico en un modelo de corazón de rata aislado-perfundido

El objetivo de este estudio fue investigar el posible efecto inhibidor de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre el daño cardiaco isquémico en un modelo de corazones de rata aislados, perfundidos. El estudio con animales 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 reperfusión miocárdica con episodios transitorios de reoclusión coronaria ha adquirido interés en la fase de reperfusión como objetivo para cardioprotección, un fenómeno denominado post-acondicionamiento isquémico (IPost). El mecanismo de la protección inducida por post-acondicionamiento isquémico no se entiende completamente, pero se ha demostrado que el procedimiento selecciona como diana los mediadores importantes de la lesión por reperfusión letal reduciendo el estrés oxidativo, disminuyendo la sobrecarga de Ca²⁺ intracelular, mejorando la función endotelial y atenuando la muerte de cardiomiocitos por apoptosis (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 al corazón a uno o más episodios de isquemia miocárdica y reperfusión no letales antes de la oclusión sostenida de la arteria coronaria. Un preacondicionamiento de este tipo sería beneficioso como tratamiento profiláctico antes de la cirugía de derivación cardiaca (revisado en Yellon). Tanto el preacondicionamiento como el post-acondicionamiento activan grupos similares de cascadas de señalización posteriores en la ruta RISK (rutas de cinasa de rescate de lesión por reperfusión) que median la protección isquémica en el corazón o el cerebro (Pignataro, 2008). Sin embargo, tanto IPC como IPost necesitan que se aplique un tratamiento invasivo directamente al miocardio con el fin de lograr cardioprotección, lo que en algunos entornos clínicos puede ser inviable y perjudicial.

Una estrategia más sensible alternativa es aplicar el estímulo cardioprotector a un órgano o tejido alejado del corazón, un enfoque englobado por el fenómeno del preacondicionamiento isquémico remoto (RIPC). El mecanismo real a través del cual un episodio de isquemia y reperfusión breve en un órgano o tejido ejerce protección contra un ataque sostenido posterior de lesión por isquemia-reperfusión en un órgano o tejido alejado no está claro actualmente.

Los oligodesoxinucleótidos desencadenan la activación del receptor de tipo Toll 9 (TLR9) dentro de poblaciones celulares 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 selecciona como diana una serie de proteína cinasas en la ruta RISK (Sun-Hey Lee 2007) de manera similar a IPost y IPC. En el ejemplo anterior (ejemplo 4), los inventores demostraron que el oligonucleótido IDX9059 puede reducir la lesión por isquemia-reperfusión en el cerebro. Por tanto, un objetivo de este estudio fue investigar si los oligonucleótidos que se usaron para reducir la lesión cerebral en el estudio anterior también podían ejercer efectos cardioprotectores durante la isquemia-reperfusión miocárdica.

Materiales y métodos

Material animal y condiciones: En este experimento, se usaron ratas Wistar Hannover macho obtenidas de Scanbur AS, Nittedal, Noruega. Las ratas se mantuvieron en la sala para animales central del Hospital Universitario de Ullevål. Personal autorizado y formado de manera apropiada manejó las ratas. Se realizaron registros diarios con respecto al bienestar de los animales. El peso de cada rata fue de aproximadamente 250-350 gramos. Las ratas se aleatorizaron en dos grupos experimentales (de prueba y de control, n= 8 en cada grupo).

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

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

Compuestos de prueba: Se sintetizó el oligonucleótido basado en ADN IDX9059 (SEQ ID NO 8, tabla 1) en Biomers.net GmbH, Ulm, Alemania (apéndice 1) en condiciones distintas a las BPF. El compuesto se proporcionó en disolución de PBS y se almacenó a -20°C como disolución madre tras su llegada.

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

Experimentos con animales y dosificación: Se administró fármaco de prueba (1 µg/µl) o placebo (PBS, vehículo de fármaco de prueba) (100 µl) por vía subcutánea 24 h antes del aislamiento del corazón. El experimento se realizó de manera enmascarada.

5 Se anestesió a las ratas mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico al 5% (60 - 80 mg kg⁻¹) y se heparinizaron (500 UI i.p.). Se extrajo el corazón y se perfundió durante 20 minutos para su estabilización a presión constante de 70 mmHg (modo Langendorff modificado a 37°C) usando tampón de Krebs Henseleit como perfundido (mmol/l: NaCl 118,5; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄/7H₂O 1,2; glucosa/1H₂O 11,1; CaCl₂ 1,8). Se gasificó el tampón con el 95% de O₂ y el 5% de CO₂ para proporcionar oxígeno y mantener a un pH fisiológico. Se mantuvo constante la temperatura del corazón durante el experimento mediante el tubo de vidrio circundante perfundido con agua procedente de una cámara de calentamiento. Se insertó un balón de látex lleno de fluido (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten, Alemania) en el ventrículo izquierdo para medir las presiones ventriculares mediante un sistema Powerlab (AD Instruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW 2154, Australia). La presión diastólica final del ventrículo izquierdo (LVEDP) se fijó a 5-10 mmHg, y se midieron los cambios en la LVEDP. Se calcularon la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (LVDevP = presión sistólica del ventrículo izquierdo (LVSP) - LVEDP) y el máximo y el mínimo del desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (LVdp/dtmáx y LVdp/dtmín). Se midió el flujo coronario (CF) mediante recogidas cronometradas de efluente coronario. Se contaron las arritmias como una respuesta de todo o nada (asistolia o fibrilación ventricular) durante los primeros 30 minutos de reperfusión y se evaluaron a partir de curvas de presión como la frecuencia cardiaca (HR). Se midió la temperatura miocárdica insertando una sonda de temperatura en el ventrículo derecho.

Se excluyeron del estudio los corazones con LVSP ≤ 100 mmHg, CF ≤ 8 o ≥ 20 ml min⁻¹, HR ≤ 220 latidos por minuto antes de la isquemia o arritmias irreversibles durante más de 30 minutos durante la reperfusión.

25 Al final de la reperfusión, se cortaron los corazones en cuatro cortes de un mm y tres cortes de dos mm (corazones fijados en matriz acrílica de cerebro de rata) en AgnThor's AB (Lidingö, Suecia). Se congelaron los cortes de dos mm sujetos en nitrógeno líquido y se almacenaron para posibles análisis posteriores (inmunotransferencia de tipo Western, PCR en tiempo real).

30 Los cuatro cortes ventriculares de un mm (5-8 mm desde el vértice) se incubaron a 37°C en cloruro de trifeníltetrazolio (TTC) al 1% en PBS durante 15 minutos. Tras la incubación, se presionaron suavemente los cortes entre dos placas de vidrio y se fotografiaron (Nikon, Colorfix5400). Se midió el área de infarto como el porcentaje del área total y se calculó con Adobe Photoshop y ScionImage (Infarct Area Calculation Macro file, Copyright ©1998 Rob Bell, Hatter Institute, UCL, RU).

35 Se evaluó la extensión de la necrosis (tamaño del infarto) como el criterio de valoración primario y las funciones cardiacas (LVEDP, LVSP, LVDevP, LVdp/dtmax, LVdp/dtmin, HR, arritmias, CF) como el criterio de valoración secundario.

40 Datos estadísticos: Para el tamaño del infarto: prueba de la t de Student, para el análisis de varianza de mediciones repetidas de datos continuo.

Resultados

45 Se investigó la inducción de tolerancia a la muerte celular isquémica por IDX9059 en un modelo *ex vivo* de corazón de rata aislado. Se extirparon los corazones y se perfundieron en modo Langendorff y se sometieron a un episodio de isquemia y reperfusión tal como se describe en Materiales y Métodos. Tras tinción con TTC, se cortaron los corazones y cada corte se fotografió y se analizó con un programa de imágenes (véase Métodos). La lesión por infarto en el ventrículo izquierdo mostró una reducción del 35% en las ratas tratadas con IDX9059 en comparación con las ratas tratadas con PBS (control con vehículo) (figura 5). También se investigaron diversos aspectos de la función cardiaca durante la reperfusión, sin embargo no se ha observado ninguna diferencia significativa en los datos funcionales en los animales tratados con IDX9059 frente al control (datos no mostrados).

55 Los resultados muestran claramente que el pretratamiento subcutáneo de las ratas con IDX9059 puede reducir significativamente el grado de daño isquémico global, en este caso en el 35%.

60 Los inventores han observado previamente que el oligonucleótido IDX9059 reducía el núcleo isquémico en un modelo de rata de isquemia cerebral. En el presente estudio, se encontró que el pretratamiento de las ratas con IDX9059 en un modelo de corazones de rata aislados/perfundidos aumenta la tolerancia y reduce el grado de lesión isquémica.

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

65 En el corazón aislado la protección observada de IDX9059 puede deberse a los mecanismos iniciados en el propio

corazón. Es razonable creer que esto se debe a cambios moleculares en los cardiomiocitos a través de una estimulación de tipo precondicionamiento en lo que se refiere a la señalización y los efectos, tras el pretratamiento con IDX9059. Esto podría estar mediado por componentes diferentes tales como proteínas de choque térmico, factor nuclear kappa B, proteína cinasas (Hausenloy *et al.*, 2005, y 2007, Valen G 2003, y 2005).

5 El experimento mostró que el tratamiento con IDX9059 reduce la migración de PMN en los diferentes ejemplos anteriores, e indica que el compuesto sometido a prueba también ejerce un efecto protector a través de otros mecanismos tales como precondicionamiento.

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

Sumario

15 Se indujo isquemia intestinal en ratones mediante la oclusión de la arteria mesentérica. Tras la reperfusión, se evaluó el daño en el intestino delgado y el grueso, así como en el pulmón.

Se investigó el efecto antiinflamatorio de IDX0150 (SEQ ID NO 13, tabla 1) mediante histología, ensayo de MPO, reducción con tetrazolio y acumulación de líquido en el intestino delgado.

20 El estudio mostró que IDX0150 demostró un efecto de mejora significativo en comparación con los animales de control a los que se dio sólo vehículo cuando se administró 20 minutos antes de la inducción de isquemia.

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

25 Materiales y métodos

Compuestos de prueba

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

Formulación

35 Se diluyeron adicionalmente los oligonucleótidos en PBS (Fluka Biochemika Ultra, Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.) a temperatura ambiente. Se ajustó la concentración mediante la ayuda de espectrofotometría UV (SmartSpec™ 3000, BIO-RAD, Hercules, EE.UU.) a una precisión del 95%, hasta que se alcanzó la concentración deseada (InDex SOP B015).

40 Experimentos con animales

Departamento de animales

45 El departamento de animales de MTC se monitoriza y se supervisa por el Karolinska Institute Veterinary Department. El departamento de animales ha establecido rutinas para mantener una instalación de animales de alta calidad. El estudio con animales se llevó a cabo en un laboratorio de investigación académica acreditado no GLP.

Animales

50 Se mantuvieron ratones BALB/cJ SPF hembra, edad 10-30 semanas, (que se originaron en The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EE.UU.) en el departamento CFGR de MTC en el Karolinska Institutet, Estocolmo. Se agruparon los animales y se les permitió que se aclimataran durante al menos una semana antes del comienzo de un experimento. Se mantuvieron los animales juntos con centinelas que se sometieron a prueba según las normas FELASA (5) un mínimo de dos veces al año.

55 Alojamiento

Se mantuvieron los animales en salas a $21 \pm 3^\circ\text{C}$ y con una humedad relativa del $55 \pm 15\%$. El sistema de ventilación se ha diseñado para dar 10 cambios de aire por hora. La sala se iluminó para producir un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La luz estaba encendida desde las 06:00 hasta las 18:00 horas.

60 Se mantuvieron los ratones en jaulas de policarbonato transparente (Macrolone tipo III, Scanbur AB, Sollentuna, Suecia) (área de suelo: 810 cm^2), 8 en cada jaula.

Lecho

65 El lecho en las jaulas fue lecho Scanbur (Scanbur AB, Sollentuna, Suecia).

Enriquecimiento ambiental

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

Dieta y agua potable.

10 Se suministró una dieta de pienso para roedores completa, R36 (Lantmännen, Kimstad, Suecia) a voluntad. Los animales tuvieron acceso libre a botellas de bebida para animales con agua potable del grifo.

Identificación, agrupación y tratamiento de los animales

15 Se identificó cada jaula mediante una tarjeta de jaula marcada con el número de estudio, el número de grupo y el sexo. Los animales se marcaron individualmente en la cola con líneas transversales correspondientes al número de los animales, usando un rotulador de tinta permanente.

Procedimiento de prueba

20 Inducción de isquemia y reperfusión

25 Se anestesió a los ratones con isoflurano (Forene®, Abbott Scandinavia AB, Solna, Suecia) después se mantuvo con anestesia quirúrgica (unidad de anestesia Univentor 400, AgnTho's AB, Lidingö, Suecia) y se colocó en una almohadilla térmica, controlada por un termómetro termopar (Pharmacia AB, Uppsala, Suecia) controlado por un termistor rectal que mantiene una temperatura corporal de 37°C. Con la ayuda de un estereomicroscopio quirúrgico operativo (Leitz Wild, Wetslar, Alemania) se practicó una incisión de 4-5 cm de largo en el abdomen y se localizó la arteria mesentérica craneal (superior). Se colocó una sujeción de microvaso, pinza Biemer, fuerza de cierre 0,20-0,25 N, (Aesculap-Werke AG, Tuttlingen, Alemania) sobre la arteria para ocluir totalmente el torrente circulatorio lo que se indica por falta de pulsaciones y palidez. Se cerró el abdomen y se colocó una almohadilla de gasa empapada con solución salina (NaCl al 0,9% p/v⁻¹) sobre el abdomen. Se rehabilitó el flujo sanguíneo tras 15 minutos, lo que se indicó por la vuelta de pulso y el enrojecimiento del vaso. Se cerró el abdomen con grapas o hilos de sutura quirúrgicos. Se le administraron a los ratones 2 ml de solución salina estéril s.c. para mantener las condiciones fisiológicas. Se administraron de 0,05 a 0,1 mg/kg de buprenorfina (Temgesic®, Schering-Plough Corp., New Jersey, EE.UU.) para analgesia. Tras 3 horas, se anestesió al animal y se tomaron muestras de sangre del plexo orbital del ojo. Se tomaron muestras de los intestinos y el hígado para histología y otros análisis.

Tratamiento farmacológico

40 Se administraron inyecciones por vía subcutánea (s.c.) de 50 µg/100 µl de IDX0150 en el cuello del animal aproximadamente 20 minutos antes de la inducción de isquemia o inmediatamente tras el comienzo de la reperfusión.

Signos clínicos

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

Parámetros clínicos

50 Se clasificaron los efectos inflamatorios usando un sistema de puntuación inflamatoria, enrojecimiento intestinal: normal 0, poco enrojecimiento 1, rojo 2, muy rojo 3; líquido intestinal: normal 0, poco 1, mucho 2; comportamiento animal: alerta 0, letárgico 2.

Homogenización de tejido pulmonar e intestinal para la medición de MPO

55 Se recogieron pulmones e intestino delgado (100-200 µg) de ratones tratados con IDX0150 y PBS sometidos a lesión por isquemia y reperfusión intestinal. Se homogeneizaron los tejidos durante 30 segundos en hielo usando un dispositivo 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 cóctel con inhibidor de proteasa (Sigma Aldrich). Después se incubaron las muestras en hielo durante 30 min, tras lo cual se retiraron los desechos de los homogeneizados mediante dos rondas de centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes, se tomaron alícuotas y se congelaron a -70°C para las mediciones posteriores de mieloperoxidasa (MPO). Se analizó la MPO en los homogeneizados usando un kit ELISA para MPO (Hycult biotechnology, Uden, Holanda) según las instrucciones del fabricante.

65 Resultados

La isquemia indujo una respuesta inflamatoria profunda que se observó como letargo y erección agrupada de la piel, en la autopsia los intestinos estaban hinchados, conteniendo líquido y estaban inflamados (figura 6a). En el animal tratado con IDX0150, el intestino estaba menos inflamado (figura 6b). Usando un sistema de puntuación, los animales inflamados tenían una puntuación de 6,5 lo que contrastaba con una puntuación menor en los animales que recibieron tratamiento i.p. con IDX0150 (figura 6c).

La mieloperoxidasa (MPO) es una hemoproteína expresada 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 se infiltran en el tejido isquémico y son un factor de contribución importante a la inflamación inducida.

En este estudio se investigó el efecto del compuesto oligonucleotídico IDX0150 (SEQ ID NO 13, tabla 1) sobre la infiltración de neutrófilos en el intestino delgado y el pulmón en un modelo de ratón de lesión por isquemia y reperusión intestinal midiendo MPO en tejido homogeneizado. Los niveles de MPO en tejido tanto intestinal (figuras 6d y e) como pulmonar (figuras 6 f y g) estaban reducidos en los ratones tratados con IDX0150 en comparación con los controles tratados con PBS. Esta disminución en MPO se observó si el compuesto se administró antes de la inducción de isquemia (figuras 6d, y f) así como tras el comienzo de la reperusión (figura 6e y g). La reducción observada en MPO indica que hay una infiltración de neutrófilos reducida en el tejido isquémico en respuesta a los compuestos oligonucleotídicos de la invención.

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

7. Efecto de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre la expresión de receptores de quimiocinas en células polimorfonucleares

Introducción

IL-8 es una potente citocina proinflamatoria que tiene un papel clave en el reclutamiento y la activación de neutrófilos durante la inflamación. IL-8 reacciona con los neutrófilos a través de dos tipos distintos de receptores (CXCR1 y CXCR2). La quimiotaxia de neutrófilos hacia IL-8 está mediada predominantemente por CXCR1 (78%) y el resto por CXCR2. Otro potente factor quimiotáctico para neutrófilos es el leucotrieno B4 (LTB₄), que se une con alta afinidad al receptor BLT1 expresado sobre la superficie de los neutrófilos. El objetivo de este estudio fue investigar si los compuestos inventivos pueden disminuir la expresión de CXCR1/2 y BLT1 y reducir de ese modo la infiltración de PMN.

Materiales y métodos

Compuestos de prueba

Se investigaron IDX9005, IDX9010, IDX9022, IDX9030, IDX9031, IDX9045, IDX9052, IDX9054, IDX9059, IDX9074, IDX9092, IDX9095, IDX9096 e IDX0150 (SEQ ID NO 1 a 14, tabla 1) para determinar su efecto sobre la expresión en superficie de CXCR1 y CXCR2 en células polimorfonucleares (PMN) sanas. Se investigaron adicionalmente los compuestos inventivos IDX9022, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEQ ID NO 3, 14, 7 y 8, tabla 1) para determinar su efecto sobre la expresión en superficie BLT1 en PMN de voluntarios sanos. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en Biomers.net (Ulm, Alemania), excepto IDX0150 que se pidió en Avecia (Manchester, Reino Unido).

Formulación

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

Preparación celular y estimulación *in vitro* con oligonucleótidos

Se usó sangre completa de donantes de sangre sanos para la preparación de PMN. Se aislaron las PMN mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Polymorphprep™ (Axis-Schield, Oslo, Noruega). Entonces se lavaron adicionalmente las células en PBS, y se determinó la viabilidad y el número de células contando las células en azul tripano (Sigma Aldrich, Estocolmo, Suecia). A continuación, se resuspendieron las células en medio celular completo que consistía de RPMI 1640 (Sigma Aldrich) complementado con suero bovino fetal (FCS, Invitrogen) al 10% inactivado con calor, l-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 μ g/ml, HEPES 10 mM (Sigma Aldrich) y gentamicina 5 μ g/ml (Invitrogen). Se cultivaron las PMN en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a una concentración de 2×10^6 células/ml con 0,5, 10 μ M o 25 μ M de los compuestos inventivos o con medio solo como control negativo en un volumen total de 200 μ l/pocillo. Se incubaron las células durante 3 h, si no se estableció de otro modo, a 37°C en una estufa de incubación de cultivo celular humidificado (Thermo Scientific, Waltham, MA) con 5% de CO₂, tras lo cual se analizaron las células para determinar la expresión

de CXCR1, CXCR2 y BLT1 usando citometría de flujo tal como se describe a continuación.

Evaluación cinética del efecto de oligonucleótidos sobre la expresión en superficie de CXCR1

5 Se estimularon PMN humanas de donante de sangre sano con 10 μ M de IDX9059 (SEQ ID NO 8, tabla 1) o con medio solo durante diversos puntos de tiempo (15 min, 30 min, 1 h, 2 h y 3 h). Posteriormente se recogieron las células y se fijaron en cada punto de tiempo en paraformaldehído al 2%, tras lo cual se analizaron para determinar la expresión de CXCR1 mediante citometría de flujo tal como se describe a continuación.

10 Citometría de flujo

Se recogieron células incubadas con los compuestos inventivos, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS complementado con el 2% de FCS. Se tiñeron las células por 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°C. Se compararon los anticuerpos usados con controles de isotipo correspondiente (Becton Dickinson). Tras lavar en PBS, se analizaron las células mediante un citómetro de flujo FACSarray (Becton Dickinson) y se analizaron los datos usando el sistema de software FACSarray (Becton Dickinson). Se analizó un mínimo de 15.000 PMN separadas por muestra.

20 Ensayo de cloroquina

Se pretrataron PMN aisladas de donantes de sangre sanos con 0,5, 5 y 10 μ g/ml de cloroquina (Sigma Aldrich) durante 30 min a 37°C antes de estimularse con 10 μ M de las sustancias de prueba durante 3 h adicionales. Entonces se analizó la expresión en superficie de CXCR1 y CXCR2 mediante citometría de flujo tal como se describió anteriormente.

25 Ensayo de quimiotaxia

Se investigó la quimiotaxia de PMN usando el ensayo de quimiotaxia colorimétrico de 24 pocillos de 3 μ m QCM™ (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 celular completo tal como se describió anteriormente. Se preincubaron las PMN en placas de 48 pocillos (Becton Dickinson) a una concentración de 1×10^6 células/ml, usando 250 μ l de suspensión celular por pocillo, con 0,5, 10 ó 25 μ M de los compuestos inventivos durante 1 h a 37°C en una estufa de incubación de cultivo celular humidificado (Thermo Scientific) con 5% de CO₂. Entonces se lavaron las células en medio celular completo y se transfirieron las células a las piezas de inserción superiores de un conjunto de placa de migración celular de 24 pocillos que tenía un tamaño de poro de 3 μ m (Millipore). A las cámaras inferiores, se añadieron medio celular completo que contenía 100 ng/ml de IL-8 humano recombinante (Invitrogen) o 500 nM de LTB₄ (Sigma Aldrich). En un experimento que sometió a prueba IDX9045, las células no se lavaron antes de añadirse a las piezas de inserción superiores de la placa de quimiotaxia y en este caso se añadió IL-8 junto con IDX9045, a la misma concentración que la usada para la pieza de inserción superior, a la cámara inferior, para eliminar el riesgo de crear un gradiente del compuesto. Entonces se permitió que las células migraran a través del filtro hacia el factor quimiotáctico durante 3 h a 37°C en una estufa de incubación de cultivo celular humidificado (Thermo Scientific) con el 5% de CO₂. Después, se detectaron las células de la cámara inferior, es decir las células migradas, mediante incubación con el colorante de viabilidad celular WST-1 durante 1 h seguido por cuantificación mediante la medición de la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (Tecan, Männedorf, Suiza).

Resultado y discusión

50 Las PMN son los principales leucocitos que resultan atraídos al tejido isquémico. En este caso, los neutrófilos se suman al daño tisular liberando radicales libres, enzimas proteolíticas tales como mieloperoxidasa y estimulando la liberación de citocinas de las células locales lo que conduce a un aumento de la inflamación. IL-8, al unirse a sus receptores CXCR1 y CXCR2, y LTB₄, al unirse a su receptor BLT1 en la superficie celular de las PMN, desempeñan un papel clave en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inflamación (Kobayashi, 2008; Tager y Luster, 2003).

55 En este estudio, se investigó el efecto de compuestos oligonucleotídicos sobre la expresión en superficie de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN aislados de donantes de sangre sanos. Tras 3 h de estimulación con sustancias de prueba, varios de los compuestos inventivos disminuyeron la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CXCR1, es decir la cantidad de CXCR1 expresada por célula (figura 7a). La mayor reducción en la expresión de CXCR1 se indujo por IDX9052, IDX9054, IDX9005, IDX9030, IDX9059, IDX9022 e IDX9045 (SEQ ID NO 14, 7, 1, 4, 8, 3 y 6, tabla 1), mediante lo cual se disminuyó la MFI en el 68%, el 62%, el 61%, el 60%, el 53%, el 52% y el 30%, respectivamente cuando se usó a 25 μ M. Además, hubo una pequeña disminución en el porcentaje de células CXCR1+ en PMN estimuladas con IDX9005, IDX9022, IDX9030, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEQ ID NO 1, 3, 4, 14, 7 y 8, tabla 1); sin embargo, la reducción no fue sustancial en cuanto a MFI (figura 7b). CXCR2 también se reguló por disminución en respuesta a los compuestos oligonucleotídicos inventivos (figura 7c), especialmente cuando las PMN se

estimularon con IDX9052 e IDX9054 (SEQ ID NO 14 y 7, tabla 1), lo que indujo una disminución en la MFI de CXCR2 en el 50 y el 36%, respectivamente. IDX9052 e IDX9054 también indujeron una pequeña disminución en el porcentaje de PMN CXCR2+ (figura 7d). La reducción en la expresión de CXCR fue dependiente de la dosis observándose el mayor efecto a 25 μ M del compuesto oligonucleotídico y observándose menos efecto a 10 y 0,5 μ M (figura 7e). Además, en un experimento separado usando PMN de donantes de sangre sanos, IDX9074 (SEQ ID NO 9, tabla 1) pudo regular por disminución la expresión de CXCR1 (figura 7f).

Para investigar la cinética para la regulación por disminución de CXCR1, se estimularon PMN humanas con 10 μ M de IDX9059 (SEQ ID NO 8, tabla 1) durante 15 min, 30 min, 1 h, 2 h y 3 h tras lo cual se investigó la expresión de CXCR1 con citometría de flujo. Ya tras 15 min, pudo observarse una pequeña disminución de la expresión en superficie de CXCR1 y tras 2 h la regulación por disminución había alcanzado el nivel máximo sin observarse disminución adicional tras 3 h (figura 7g).

Los compuestos inventivos IDX9052, IDX9054, IDX9059, IDX9005 e IDX9045 (SEQ ID NO 14, 7, 8, 1, y 6) fueron todos muy eficaces para reducir la expresión de CXCR1/2 y tienen en común que todos contienen un flanco de G en sus extremos 5'- y/o 3', lo que sugiere que este motivo estructural, junto con la secuencia del oligonucleótido, podría estar asociado con una capacidad reductora de CXCR1/2 más eficaz por los oligonucleótidos. Para apoyar esto adicionalmente, cuando se incubaron PMN de donantes de sangre sanos 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 CpG, IDX0480 no pudo reducir la expresión en superficie de CXCR1 tal como se observa para IDX9022, mientras que IDX9134 fue igual de potente que IDX9059 en la reducción de la expresión en superficie de CXCR1 (figura 7h). Sin querer restringirse a la teoría, los inventores contemplan que estos resultados indican que IDX9022, que no tiene un flanco de G, media su efecto reductor de CXCR1 y CXCR2 principalmente a través de sus motivos CpG, mientras que IDX9059 que contiene un flanco de G tiene efectos independientes de CpG.

Para investigar el papel de TLR9 en la reducción de la expresión en superficie de CXCR inducida por las sustancias de prueba, se pretrataron PMN con cloroquina antes de estimularse con las sustancias de prueba. La cloroquina es un fármaco de 4-aminoquinolina, que bloquea la fusión endosómica y la acidificación e impide la activación de TLR9 y las rutas de señalización metabólicas posteriores. La cloroquina pudo inhibir de manera dependiente de la dosis la reducción en la expresión en superficie de CXCR1 inducida por IDX9059 e IDX9022 (SEQ ID NO 8 y 3, tabla 1) (figura 7i). 10 μ g/ml de cloroquina bloquearon casi completamente la disminución en la expresión de CXCR1 inducida por estos dos compuestos (figura 7i). Sin embargo, la cloroquina no pudo bloquear la reducción en la expresión en superficie de CXCR1 inducida por IDX9054 o IDX9052 (SEQ ID NO 7 y 14, tabla 1) (figura 7i). Estos resultados indican que algunos de los compuestos inventivos median su efecto reductor de CXCR a través de la activación endosómica de TLR9 (es decir IDX9022 e IDX9059), mientras que otros no (es decir IDX9052 e IDX9054).

También pudo demostrarse una reducción dependiente de la dosis de BLT1, el receptor para el factor quimiotáctico LTB₄, tras la incubación con diferentes concentraciones (0,5, 10 y 25 μ M) de los compuestos inventivos (figura 7j). Se observó una reducción del 87%, el 80%, el 64% y el 57% en la MFI con los compuestos inventivos IDX9052, IDX9054, IDX9059 e IDX9022, respectivamente (SEQ ID NO 14, 7, 8 y 3, tabla 1) cuando se usaron a 25 μ M (figura 7j). Además, IDX9052 e IDX9054 redujeron significativamente el porcentaje de PMN positivas para BLT1 (figura 7k). Tal como se muestra en la figura 7j, los compuestos inventivos que contienen un flanco de G en sus extremos 5' y/o 3', es decir IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEQ ID NO 14, 7 y 8, tabla 1) fueron más eficaces en la reducción de la expresión en superficie de BLT1, en comparación con IDX9022 que no tiene un flanco de G.

Para investigar si la reducción en la expresión en superficie de CXCR1, CXCR2 y BLT1 inducida por los compuestos inventivos también conduce a disminuir la migración de PMN hacia el ligando de CXCR1 y CXCR2 (IL-8) o el ligando de BLT1 (LTB₄), se preincubaron PMN de donantes de sangre sanos durante 1 h con los compuestos oligonucleotídicos inventivos. Entonces se permitió que las células migraran IL-8 o LTB₄ en un ensayo de quimiotaxia durante 3 h. Se observó una reducción dependiente de la dosis en el número de PMN migradas tras la preincubación tanto con IDX9022, IDX9052, IDX9054 como con IDX9059 (SEQ ID NO 3, 14, 7 y 8, tabla 1), siendo los compuestos más eficaces IDX9052, IDX9054 e IDX9059, que a 25 μ M bloquearon completamente o casi completamente la migración de PMN tanto hacia IL-8 (figura 7l) como hacia LTB₄ (figura 7n). Además, en un experimento separado usando PMN de dos donantes de sangre sanos, IDX9045 (SEQ ID NO 6, tabla 1) redujo, de manera dependiente de la dosis, la migración inducida por IL-8 de PMN (figura 7m).

La expresión en superficie de CXCR1 y 2 se correlacionó con el número de PMN migradas en la quimiotaxia inducida por IL-8, igual que la expresión en superficie de BLT1 y el número de PMN migradas en la quimiotaxia inducida por LTB₄ (figura 7o-q). Esto indica que la reducción en migración de PMN se debe a una expresión en superficie inferior de los receptores.

Los inventores demostraron una rápida reducción en la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN incubadas con compuestos oligonucleotídicos, que para CXCR1 se demostró que comenzaba ya tras 15 min de estimulación.

Esto es muy importante puesto que los neutrófilos son células diferenciadas terminalmente y por tanto de vida corta, por lo que se desea un efecto inmunomodulador inducido rápidamente. Hayashi *et al.*, en 2003, demostraron una regulación por disminución de la expresión de CXCR1 en PMN por ADN CpG sólo en células pretratadas con GM-CSF (Hayashi *et al.*, 2003), mientras que en este estudio, las sustancias oligonucleotídicas inventivas redujeron la expresión en superficie de CXCR1 y 2 sin pretratamiento con citocina, destacando sus potentes propiedades inmunoestimuladoras.

Los inventores no sólo demuestran una reducción en la expresión en superficie de CXCR1,2 y BLT1 sino que además demuestran una capacidad de respuesta reducida de las células a los factores quimiotácticos IL-8 y LTB₄ dando como resultado menor migración. Hay motivos para predecir que estos resultados también reflejan un escenario *in vivo*, conduciendo por consiguiente a menos quimiotaxia de PMN a los tejidos inflamados.

Se observó una expresión en superficie disminuida de CXCR1, CXCR2 y BLT1 así como una capacidad de respuesta reducida de las células a los factores quimiotácticos IL-8 y LTB₄ en PMN sanas tratadas con los compuestos inventivos. Estas propiedades de los compuestos oligonucleotídicos muestran claramente la potencia de los compuestos inventivos para influir en las propiedades y los comportamientos de las PMN.

8. Efecto de oligonucleótidos inmunomoduladores sobre la expresión de receptores de quimiocina en células polimorfonucleares de pacientes asmáticos y con EM

Introducción

Las PMN están implicadas en la patogenia no sólo de isquemia, sino también de muchos otros trastornos inflamatorios y por tanto, el bloqueo de las funciones de las PMN sería beneficioso en muchas enfermedades inflamatorias. La inflamación celular de las vías respiratorias con PMN, es decir eosinófilos y neutrófilos, es un rasgo distintivo característico del asma. También se ha descrito que las PMN están implicadas en la patogenia de la esclerosis múltiple (EM). El objetivo de este estudio fue investigar si los compuestos inventivos pueden disminuir la expresión de CXCR1/2 y BLT1 no sólo en PMN de individuos sanos, sino también en PMN de pacientes con un estado inflamatorio, en este caso ejemplificado por el asma y la EM.

Materiales y métodos

Compuestos de prueba

Se investigaron IDX9022, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEQ ID NO 3, 14, 7 y 8, tabla 1) para determinar su efecto sobre la expresión en superficie de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN de pacientes asmáticos y con EM. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en Biomers.net (Ulm, Alemania).

Formulación

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

Preparación celular y estimulación *in vitro* con oligonucleótidos

Se usó sangre completa de pacientes asmáticos y con EM para la preparación de PMN. Se aislaron las PMN, se contaron y se resuspendieron en medio celular completo tal como se describe en materiales y métodos en el ejemplo 7. Se cultivaron las PMN en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) a una concentración de 2×10^6 células/ml con 0,5, 10 µM o 25 µM de oligonucleótidos o con medio solo como control negativo en un volumen total de 200 µl/pocillo. Se incubaron las células durante 3 h a 37°C en una estufa de incubación de cultivo celular humidificado (Thermo Scientific, Waltham, MA) con el 5% de CO₂, tras lo cual se analizaron las células para determinar la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 usando citometría de flujo.

Citometría de flujo

Se recogieron células incubadas con los oligonucleótidos, se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS complementado con el 2% de FCS. Se tiñeron las células por el marcador de granulocitos CD66b junto con CXCR1 o CXCR2 o BLT1 tal como se describe en materiales y métodos en el ejemplo 7. Entonces se analizaron las células mediante un citómetro de flujo FACSarray (Becton Dickinson) y se analizaron los datos usando el sistema de software FACSarray (Becton Dickinson). Se analizó un mínimo de 15.000 PMN separadas por muestra.

Resultado y discusión

Las PMN son una de las principales células que median el daño tisular durante una respuesta inflamatoria. Las PMN migran de la sangre a los sitios de inflamación en respuesta a factores quimiotácticos producidos localmente. Dos de

los principales mediadores de migración de PMN son la quimiocina CXCL8 y el leucotrieno LTB₄. En este estudio, los inventores propusieron investigar si los compuestos inventivos podían regular por disminución los receptores para CXCL8, es decir CXCR1 y CXCR2, así como el receptor para LTB₄, es decir BLT1, sobre la superficie de PMN derivadas de pacientes con una enfermedad inflamatoria.

El uso de sangre de pacientes con EM indicó una reducción dependiente de la dosis de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en PMN tras estimulaciones con los compuestos inventivos (figura 8a-f). Se observaron resultados similares cuando se usó sangre de un paciente asmático (figura 8g-i). La reducción se observó predominantemente para la MFI, es decir la cantidad de receptores expresados por célula. IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEQ ID NO 8, 7 y 14, tabla 1) indujeron una reducción de la MFI para CXCR1 en PMN de pacientes con EM con el 45%, el 56% y el 42%, respectivamente cuando se usaron a 25 μ M (figura 8a). Además, IDX9052, IDX9054 e IDX9059 redujeron la expresión en superficie de CXCR2 con el 76%, el 58% y el 39% (figura 8c), y la expresión en superficie de BLT1 con el 50%, el 47% y el 26%, respectivamente (figura 8e). Cuando se estimularon las PMN de un paciente asmático con los compuestos inventivos, la reducción en MFI para CXCR1 fue del 56%, el 71% y el 62% con IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (figura 8g), respectivamente. IDX9052, IDX9054 e IDX9059 también redujeron la MFI para CXCR2 en PMN de un paciente asmático con el 69%, el 50% y el 37% (figura 8h), y la MFI para BLT1 con el 85%, el 77% y el 64% (figura 8i), respectivamente. Tal como se observa con las PMN de donantes sanos, los compuestos inventivos que contienen una secuencia de oligo-G flanqueante, es decir IDX9052, IDX9054 e IDX9059 (SEQ ID NO 14, 7 y 8, tabla 1) fueron las más eficaces en la reducción de la expresión de CXCR1, CXCR2 y BLT1 en superficie también en PMN derivadas de pacientes con EM y asma.

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

Aunque la invención se ha descrito con respecto a sus realizaciones preferidas, que constituyen el mejor modo conocido actualmente por los inventores, debe entenderse que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones tal como resultaría obvio para un experto habitual en esta técnica sin apartarse del alcance de la invención tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

Bibliografía

Cooper, *et al.*, Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47), Proc Natl Acad Sci USA, 25 de abril de 1995, 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, 1 de enero de 2008; 13, 2400-2407.

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, 1 de noviembre de 1996;274(5288): 795-8

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.
- 5 Parkos, *et al.*, CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia, *J. Cell Biol.*, febrero de 1996; 132(3): 437-50
- Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT. Leucocyte adhesion molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997 ;8(4):380-388.
- 10 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 19 de septiembre de 2007. Erratum in: *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28(2):440. Gala, Rosaria [añadido].
- 15 Rowland RT, Meng X, Cleveland JC Jr, Meldrum DR, Harken AH, Brown JM. LPS-induced delayed myocardial adaptation enhances acute preconditioning to optimize posts ischemic cardiac function. *Am J Physiol.* 1997; 272:H2708-15.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- Valen G. Cellular signalling mechanisms in adaptation to ischemia-induced myocardial damage. *Ann Med.* 2003;35:300-7.
- 35 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-1beta 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.
- 45 **Lista de secuencias**
- <110> INDEX PHARMACEUTICALS AB
ZARGARI, Arezou
AXELSSON, Lars-Göran
50 ADMYRE, Charlotte
VON STEIN, Oliver
- <120> Compuestos y métodos para reducir el reclutamiento y/o la migración de células polimorfonucleares
- 55 <130> 59797
- <150> Documento US 61/111.284
<151> 04-11-2008
- 60 <150> Documento SE 0802338-4
<151> 04-11-2008
- <160> 16
- 65 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 1
 10 tcgtccatgq tcaggggtccc ggggg 25
 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 20 <400> 2 18
 tcccaagagt cgtccagg
 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 30 <400> 3 22
 tcgtcgttct gccatcgtcg tt
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Artificial
 <400> 4
 tcgtctgcca tggcggccgc c 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Artificial
 <400> 5
 55 tcgtcgattc gtctgccatg g 21
 <210> 6
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Artificial
 <400> 6

| | | |
|----|---------------------------|----|
| | gggtcgcagc tgg | 13 |
| | <210> 7 | |
| | <211> 15 | |
| 5 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Artificial | |
| 10 | <400> 7 | |
| | ggggtcgtct gcggg | 15 |
| | <210> 8 | |
| 15 | <211> 12 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 20 | <223> Artificial | |
| | <400> 8 | |
| | gatcgtccgg gg | 12 |
| 25 | <210> 9 | |
| | <211> 19 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 30 | <400> 9 | |
| | tcgttcgtct ttcgtctgc | 19 |
| | <210> 10 | |
| | <211> 23 | |
| | <212> ADN | |
| 35 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Artificial | |
| 40 | <400> 10 | |
| | tttcgtctgc tttcgtttcg ttt | 23 |
| | <210> 11 | |
| | <211> 18 | |
| 45 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Artificial | |
| 50 | <400> 11 | |
| | tcgtctgctt tcgtctgc | 18 |
| | <210> 12 | |
| 55 | <211> 16 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 60 | <223> Artificial | |
| | <400> 12 | |
| | gatcgtccga tcgtcc | 16 |

ES 2 641 751 T3

<210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Artificial
 <400> 13
 10 ggaacagttc gtccatggc 19
 <210> 14
 <211> 14
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 20 <400> 14 14
 ggggtcgtct gcgg
 <210> 15
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Artificial
 30 <400> 15 22
 tgctgcttct gccatgctgc tt
 <210> 16
 35 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Artificial
 <400> 16 12
 gatgctctgg gg
 45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un oligonucleótido tal como se define en SEQ ID NO 13 para la producción de una preparación farmacéutica para reducir el reclutamiento y/o la migración de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho reclutamiento y/o migración reducidos de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación es el resultado de una regulación por disminución de al menos uno de los receptores CXCR1 y CXCR2.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho reclutamiento y/o migración reducidos de células polimorfonucleares a un sitio de inflamación es el resultado de una regulación por disminución del receptor BLT1.
- 20 4. Uso según la reivindicación 1, en el que al menos un nucleótido tiene una modificación de la estructura principal de fosfato.
- 25 5. Uso según la reivindicación 4, en el que la modificación de la estructura principal de fosfato es una modificación fosforotioato o fosforoditioato.
- 30 6. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a través de una de las siguientes vías de administración: administración subcutánea, intraperitoneal, mucosa, intestinal, oral, intravenosa, gástrica, esofágica, bucal, nasal y pulmonar.
- 35 7. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra como una etapa en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
- 40 8. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a un paciente que ha experimentado, o se sospecha que ha experimentado, un infarto de miocardio.
- 45 9. Uso según la reivindicación 8, en el que la preparación farmacéutica se administra antes de, tras o simultáneamente con la administración de un agente trombolítico.
- 50 10. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a un paciente que ha experimentado, o se sospecha que ha experimentado, un accidente cerebrovascular.
11. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a un paciente que ha experimentado traumatismo.
12. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a un paciente que ha experimentado quemaduras.
13. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a un paciente programado para someterse a cirugía.
14. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a un paciente que tiene una embolia antes de, tras o simultáneamente con la embolectomía; o antes de o tras la administración de un agente trombolítico.
15. Uso según la reivindicación 1, en el que la preparación farmacéutica se administra a un órgano designado para trasplante o bien *in situ*, antes de la extracción del donante, en tránsito antes de la implantación en el receptor, o bien *in vivo*, antes o en el momento de restablecer el flujo sanguíneo.

Protocolo profiláctico

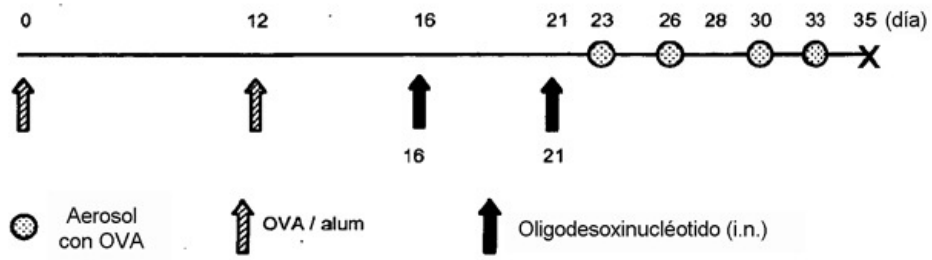


Fig. 1a

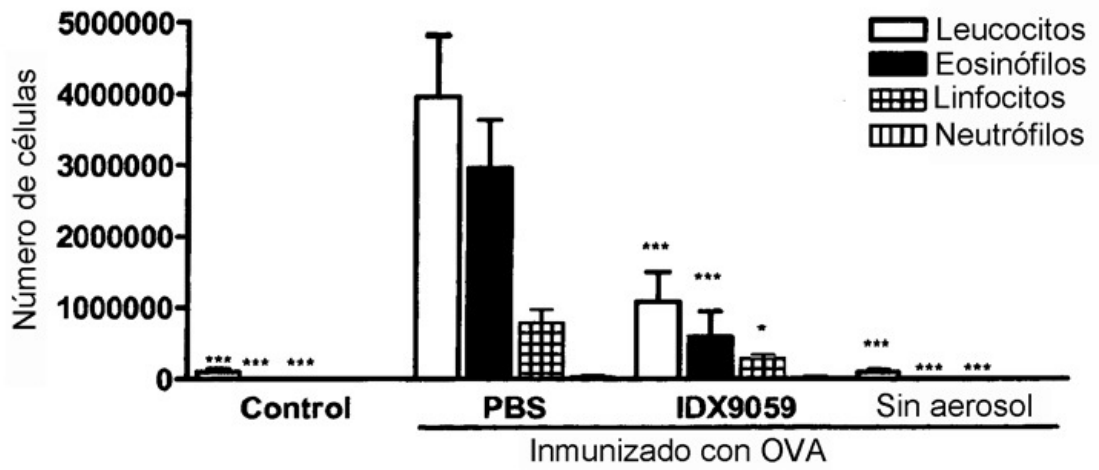


Fig. 1b

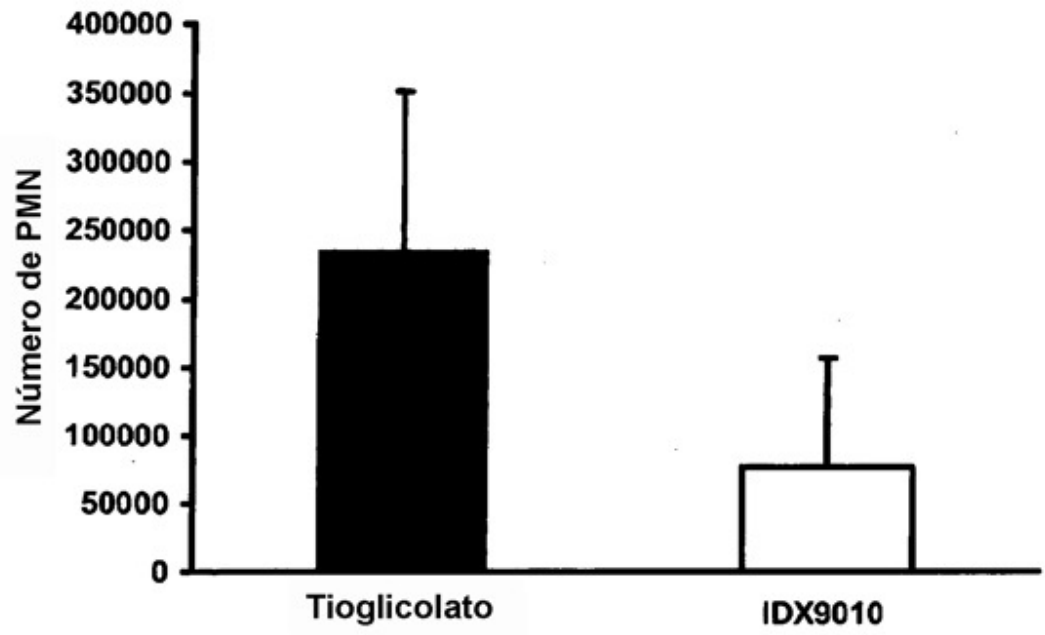


Fig. 2a

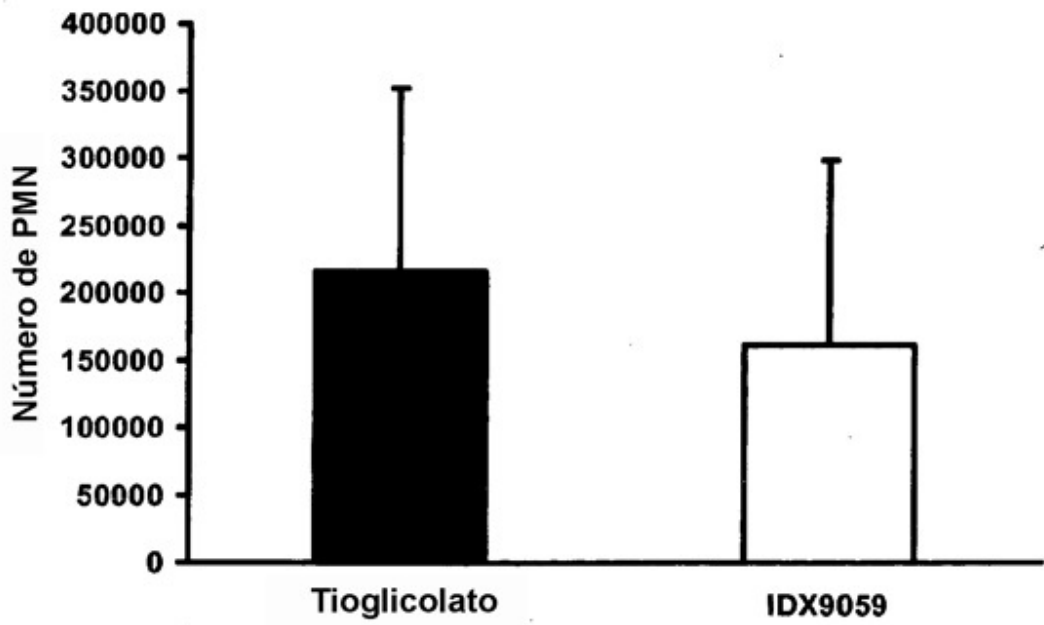


Fig. 2b

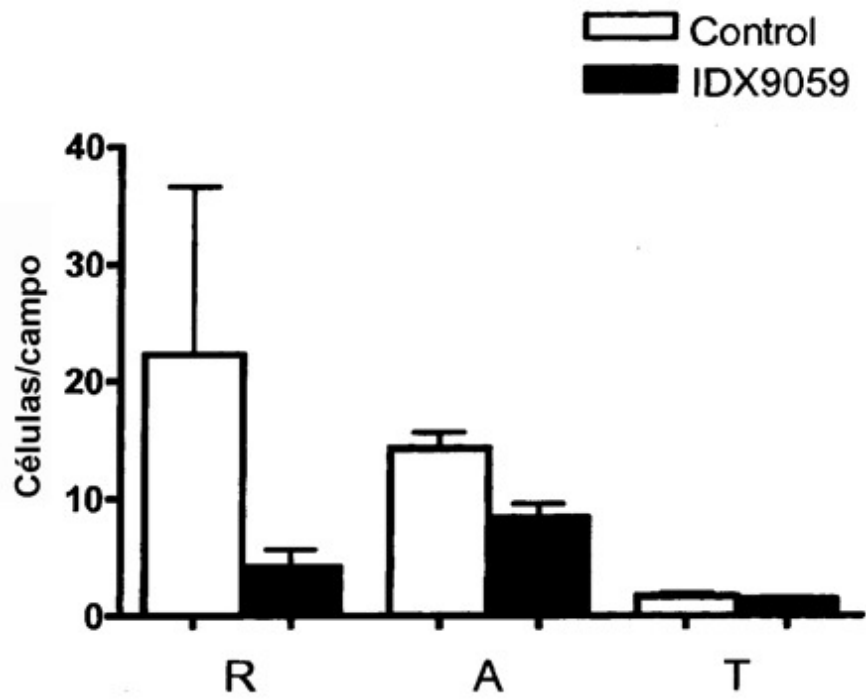


Fig. 3a

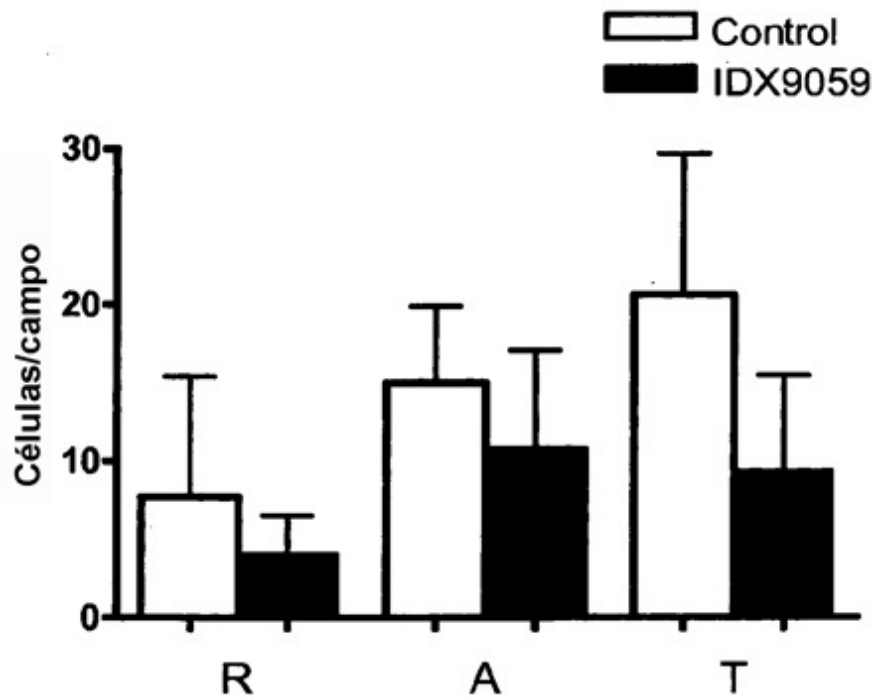


Fig. 3b

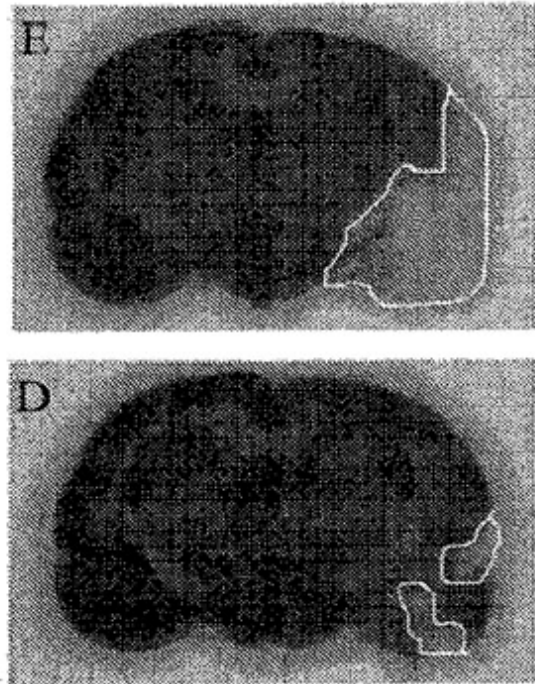


Fig. 4a

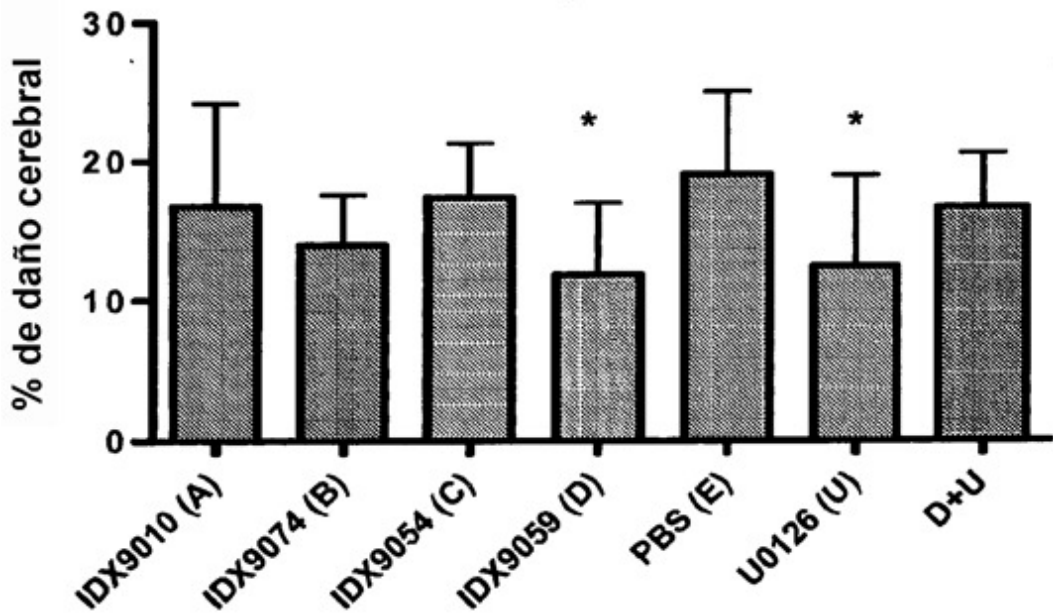


Fig. 4b

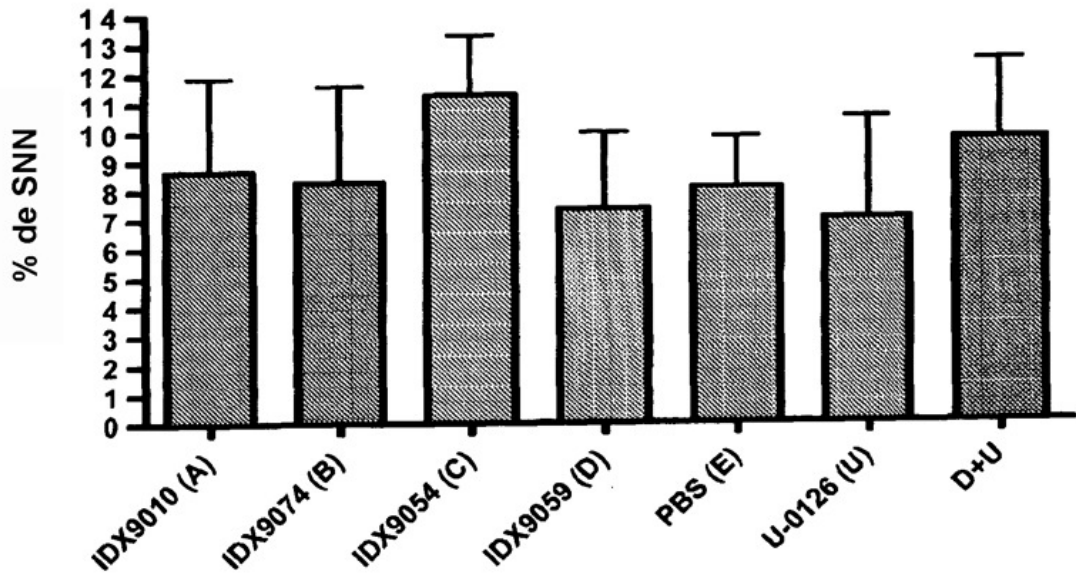


Fig. 4c

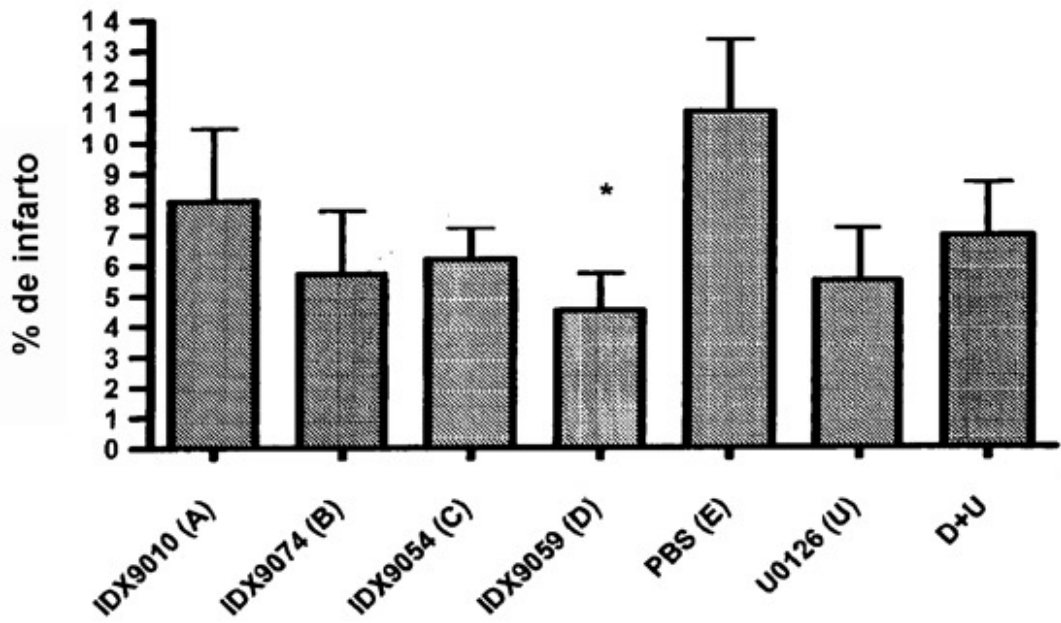


Fig. 4d

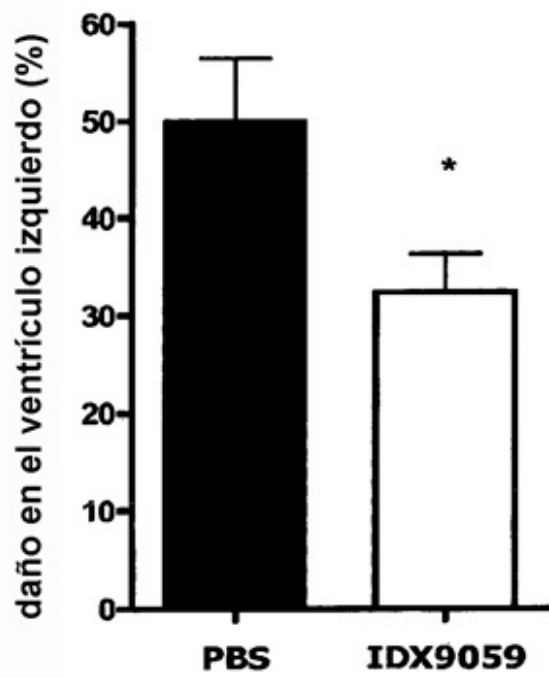


Fig. 5

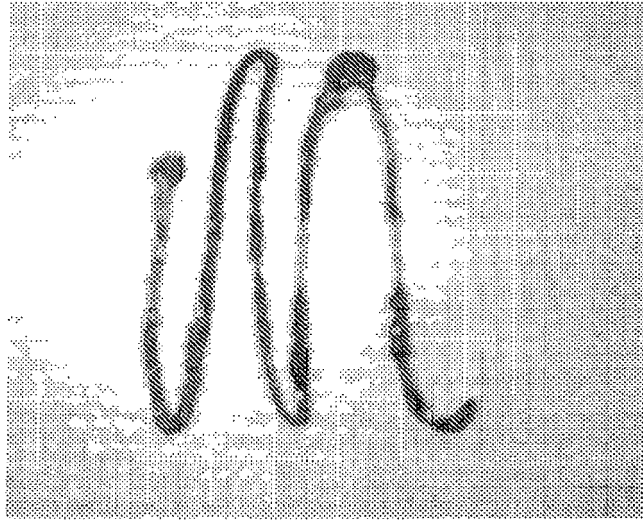


Fig. 6a

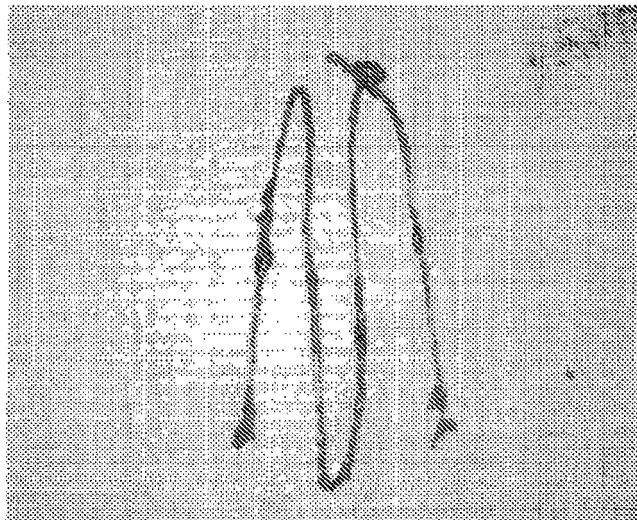


Fig. 6b

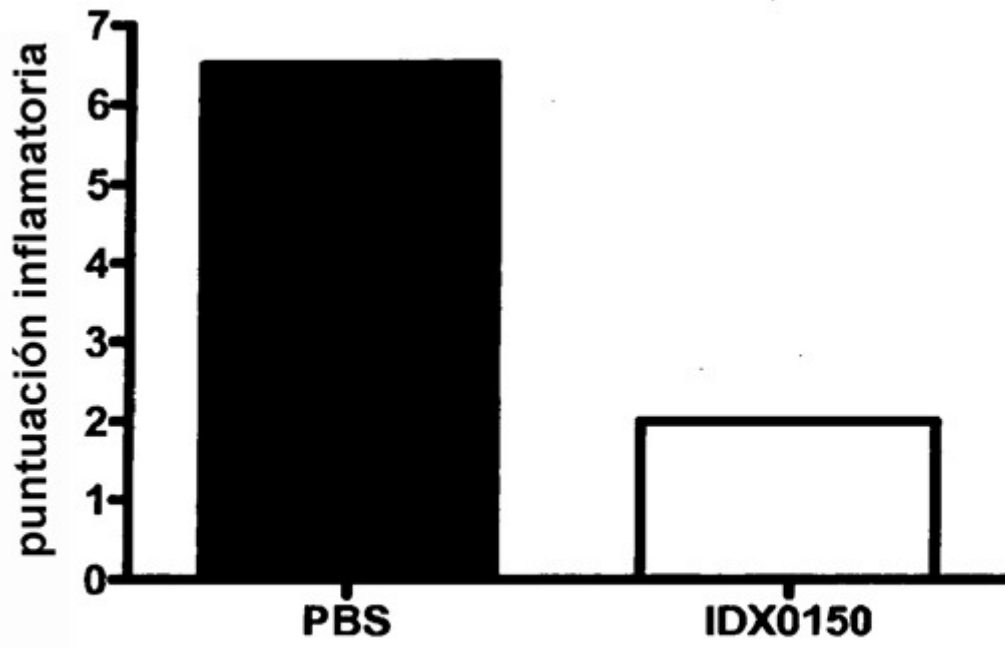


Fig. 6c

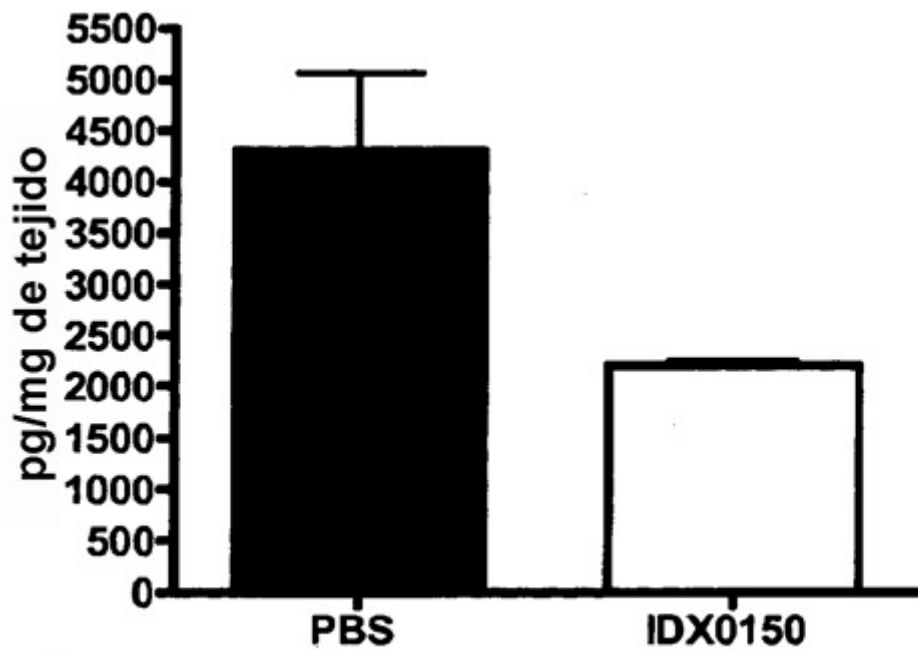


Fig. 6d

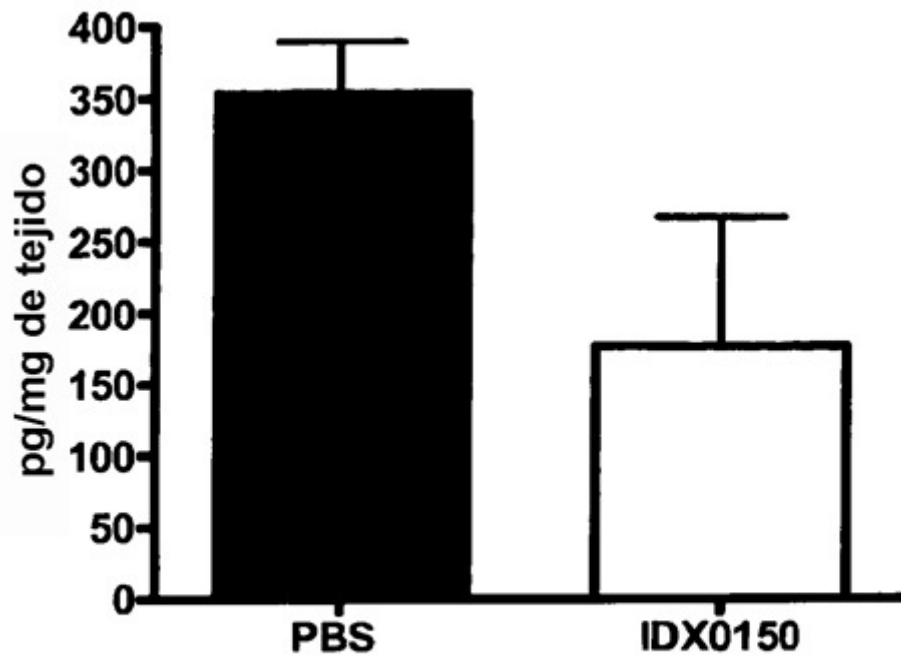


Fig. 6e

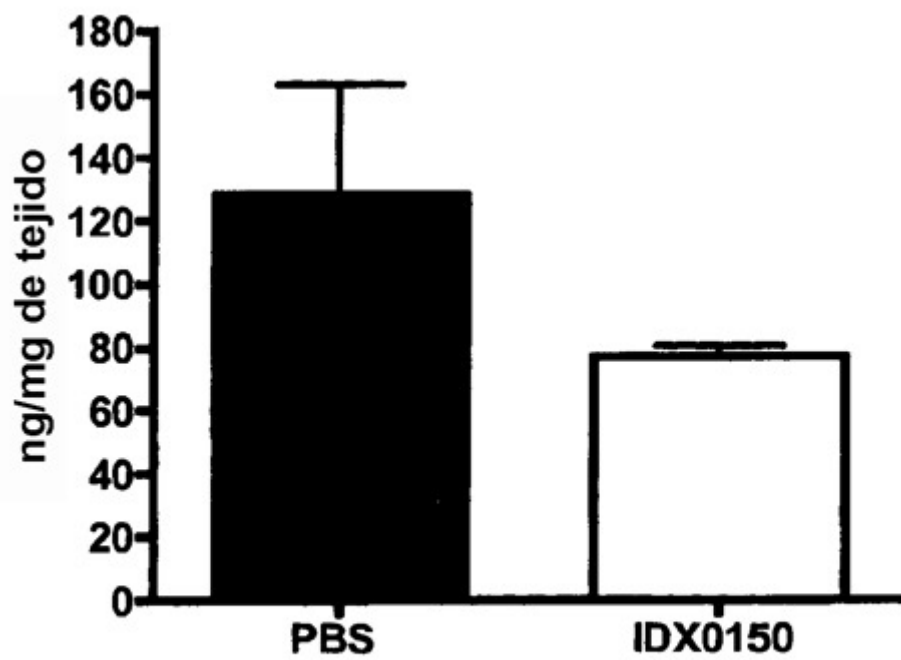


Fig. 6f

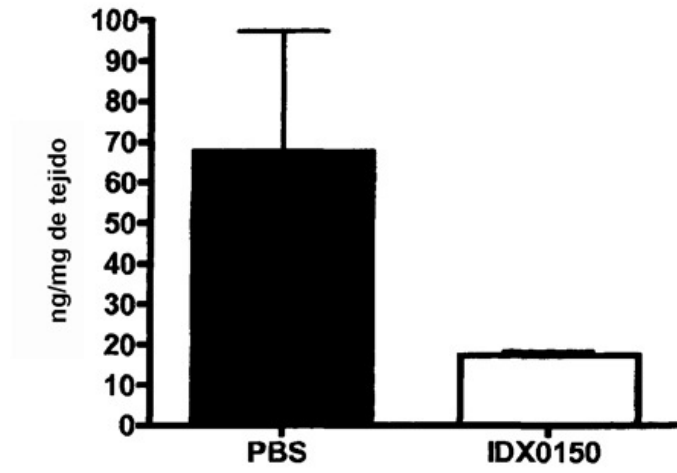


Fig. 6g

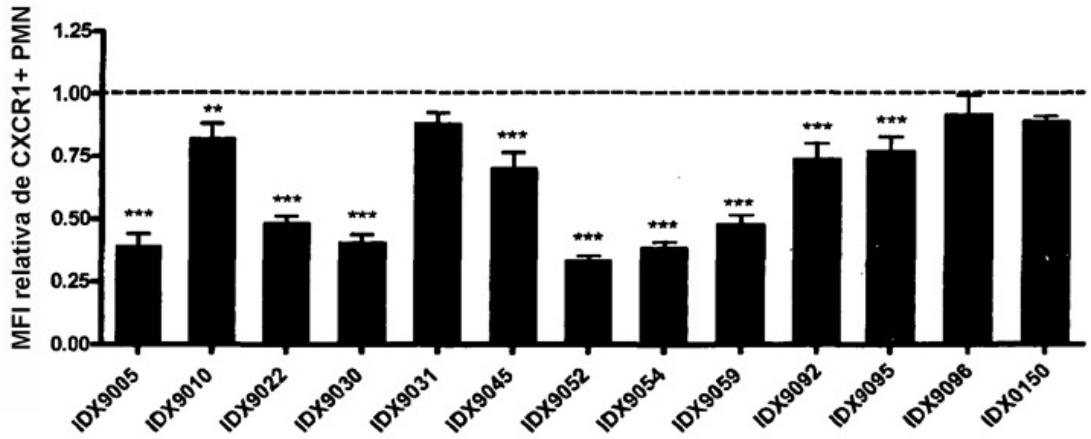


Fig. 7a

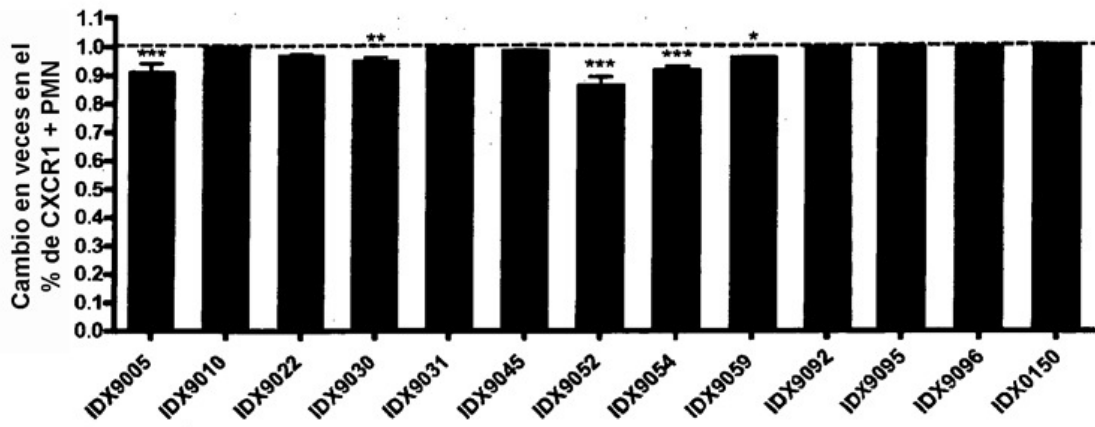


Fig. 7b

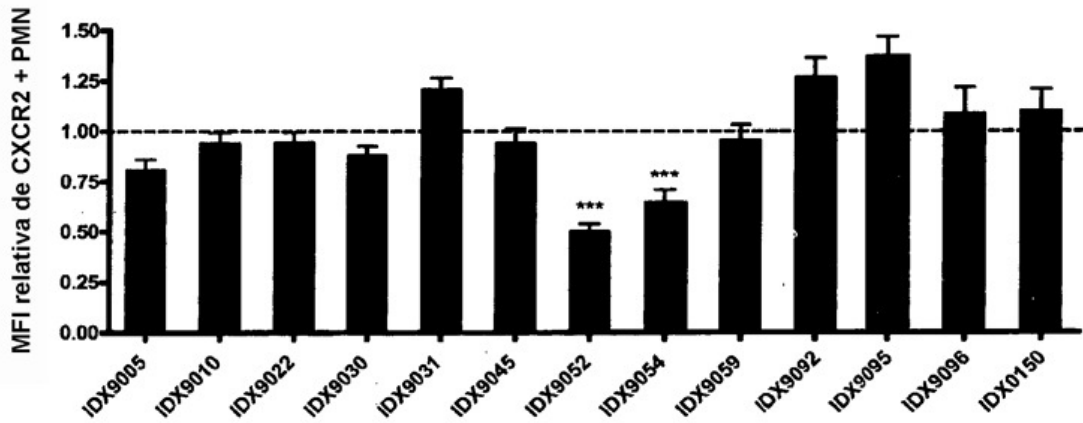


Fig. 7c

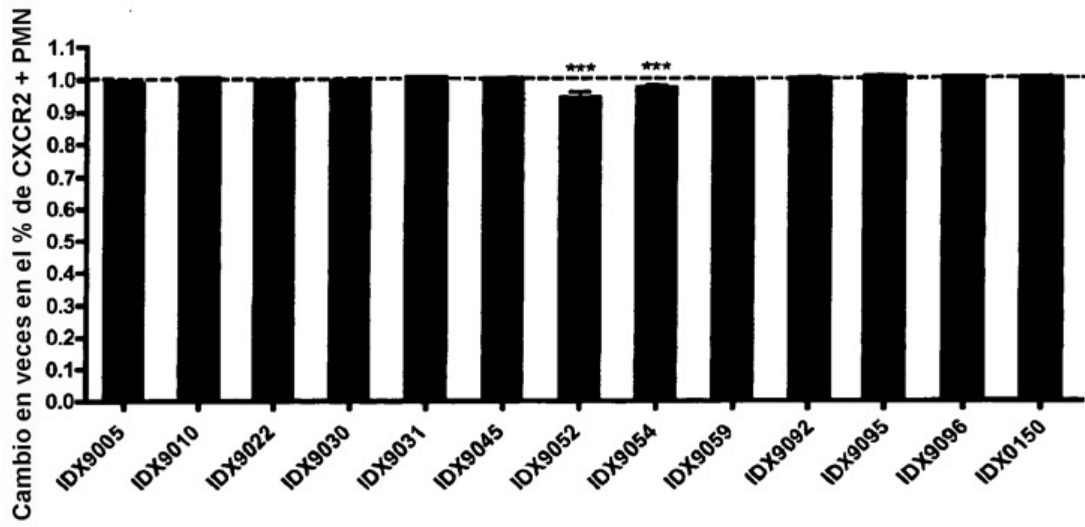


Fig. 7d

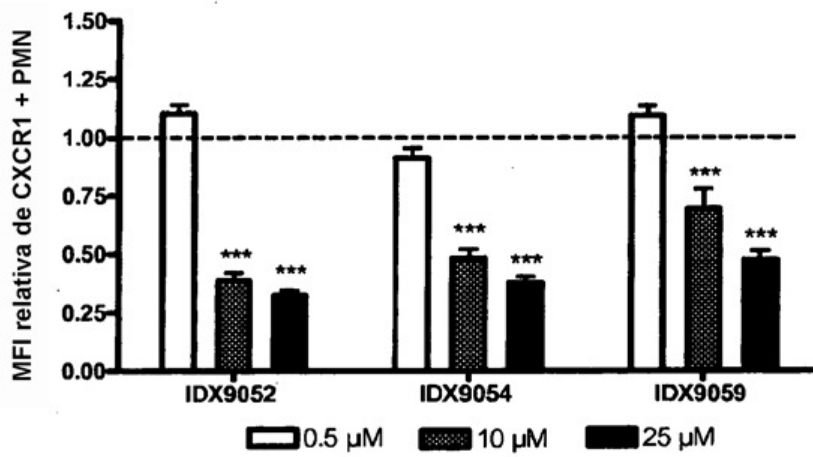


Fig. 7e

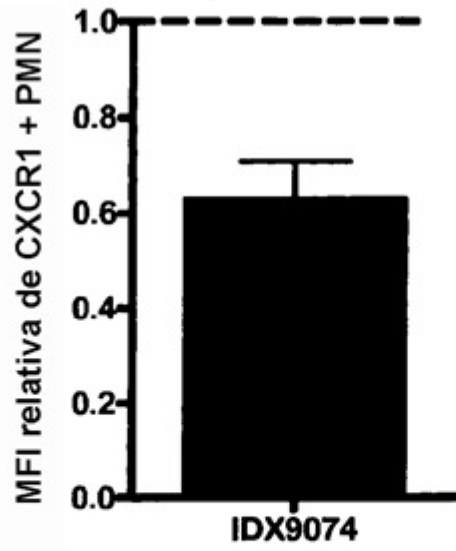


Fig. 7f

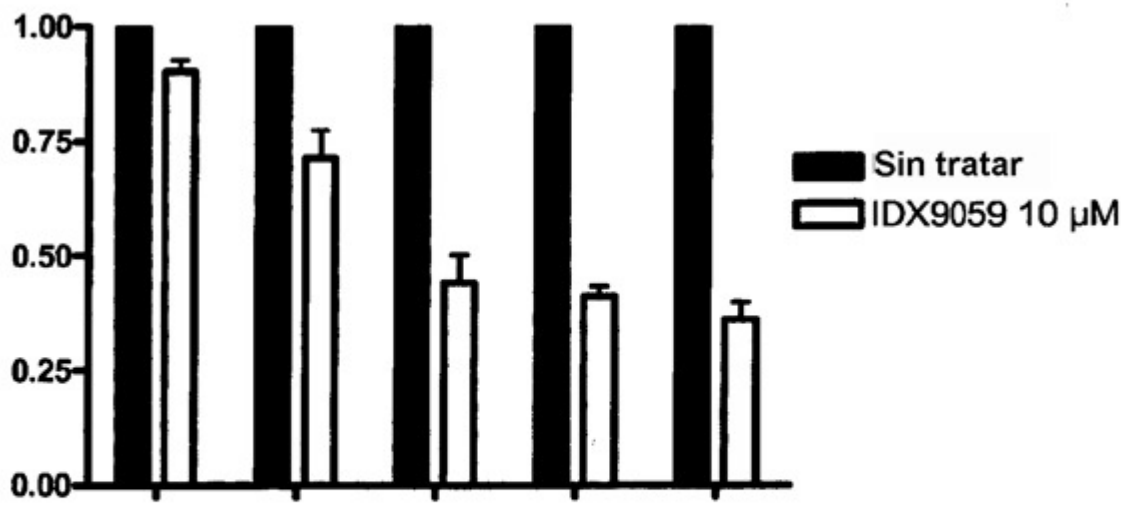


Fig. 7g

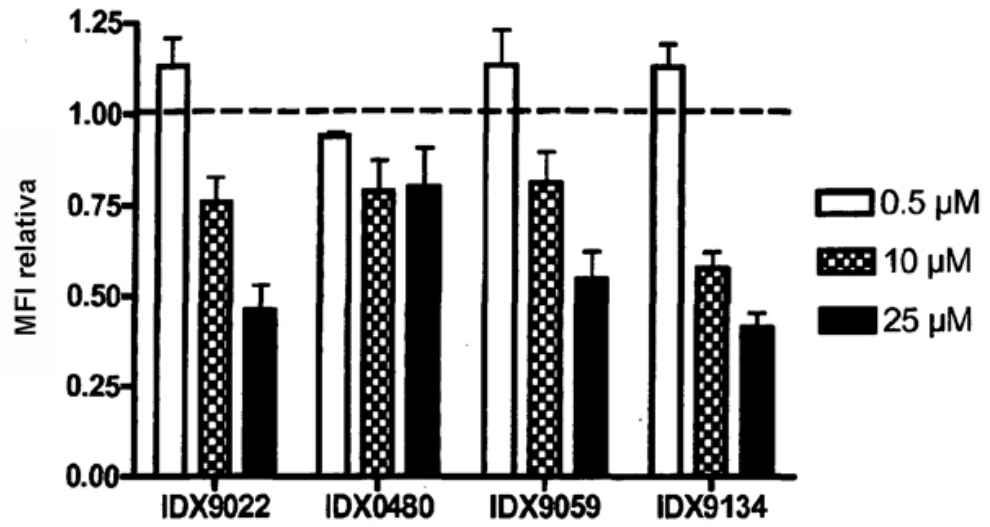


Fig. 7h

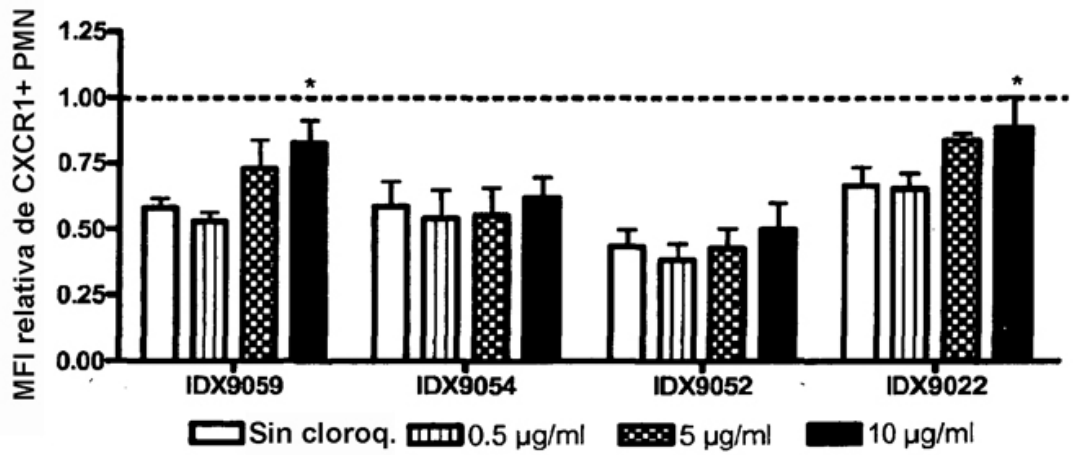


Fig.7i

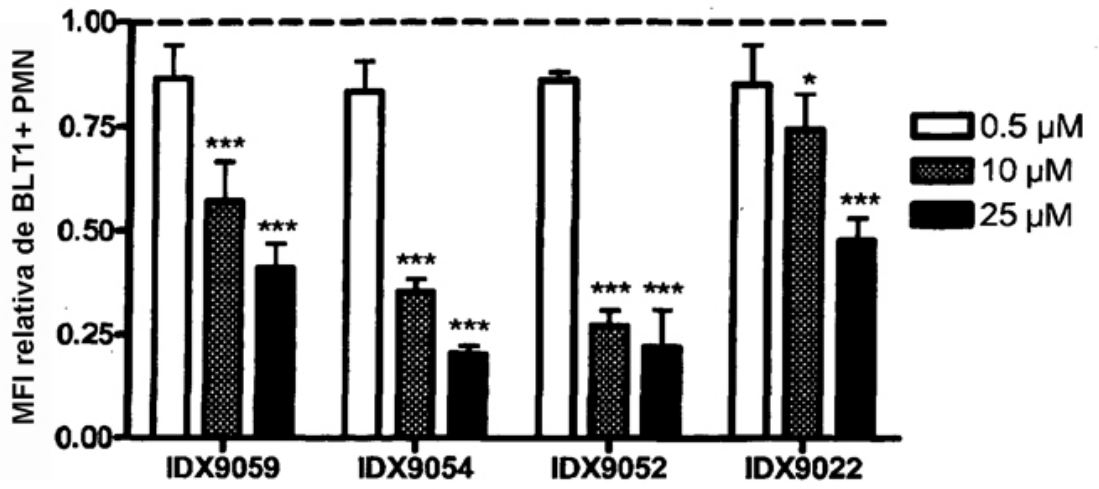


Fig. 7j

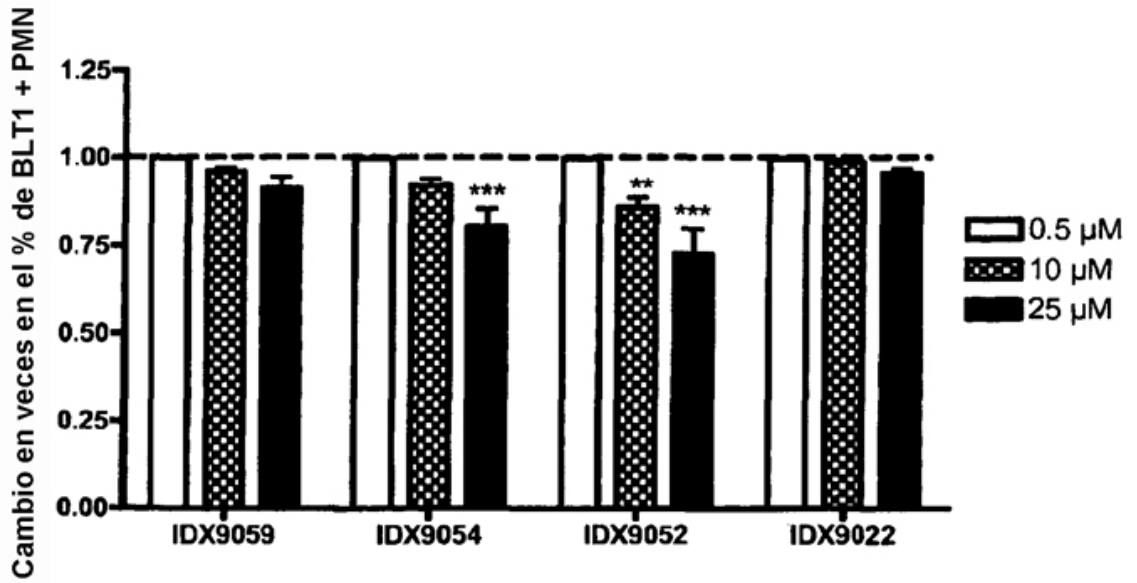


Fig. 7k

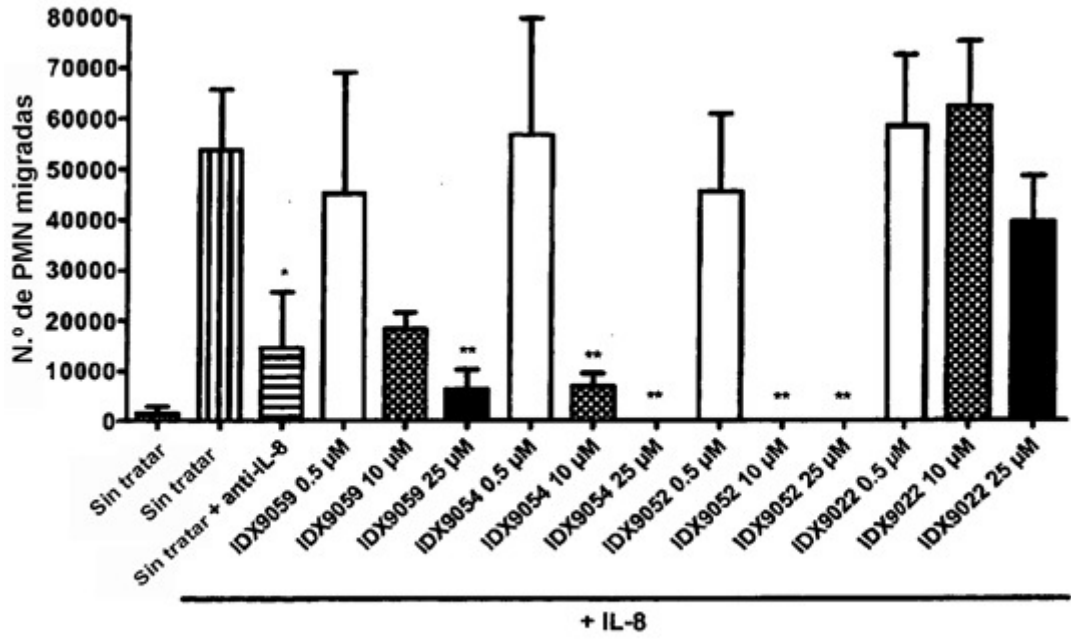


Fig. 7l

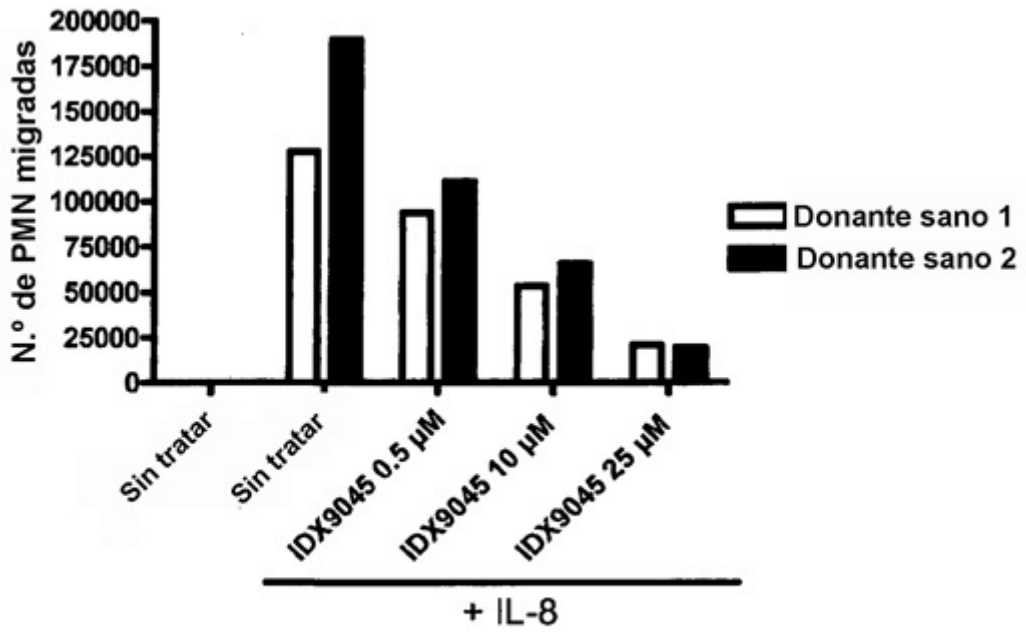


Fig. 7m

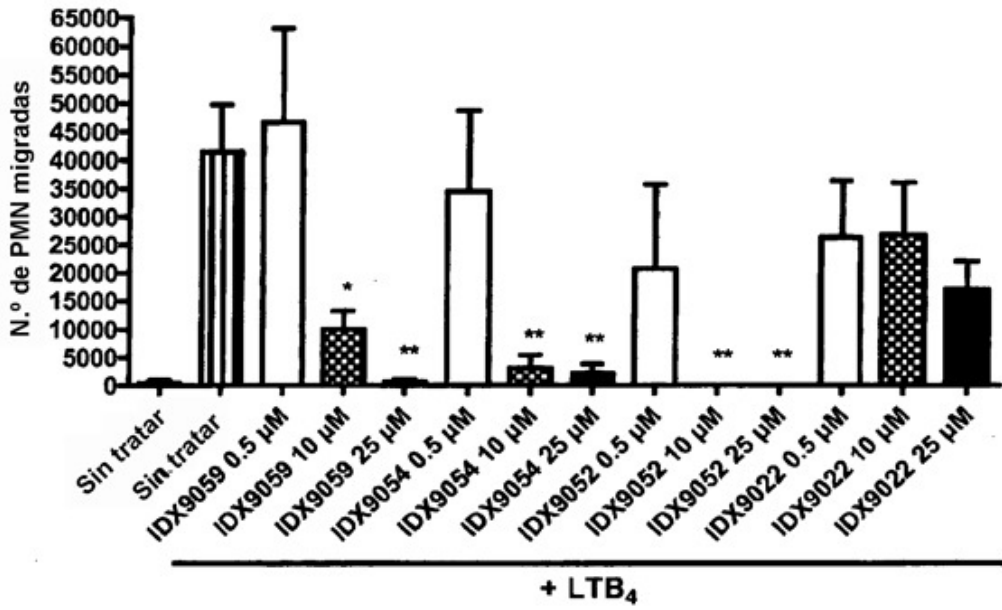


Fig. 7n

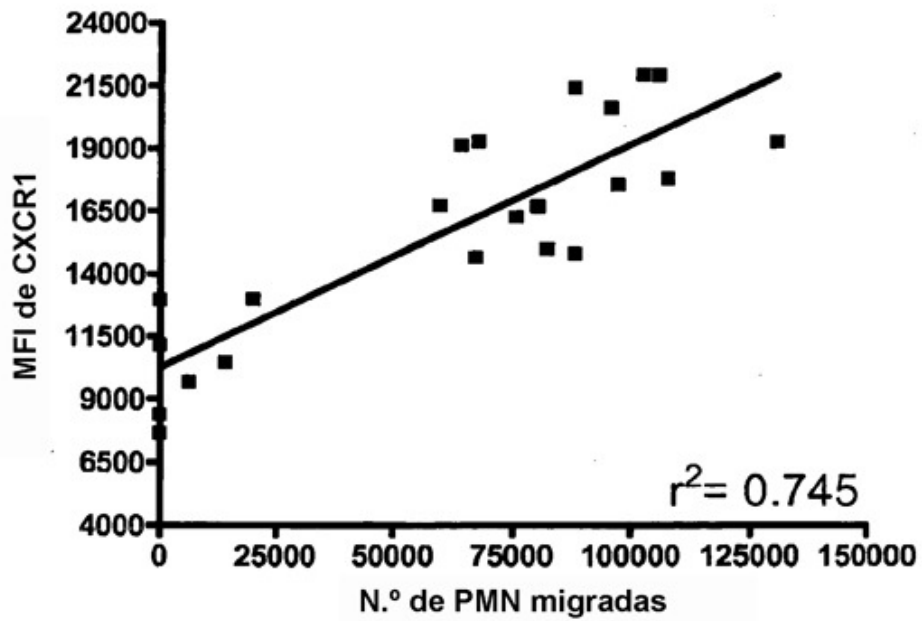


Fig. 7o

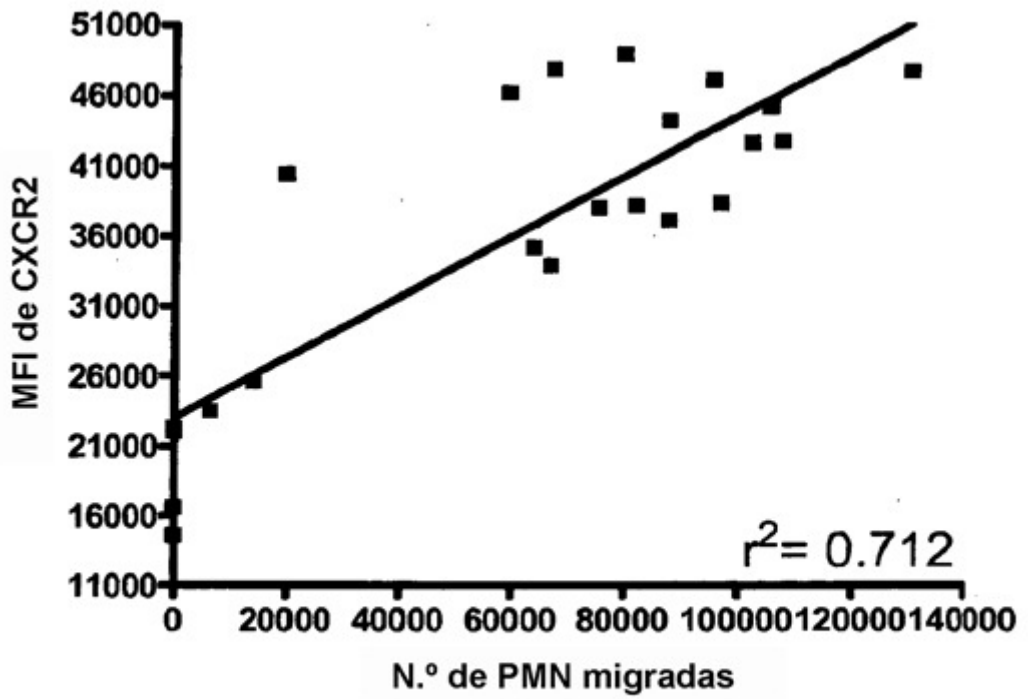


Fig. 7p

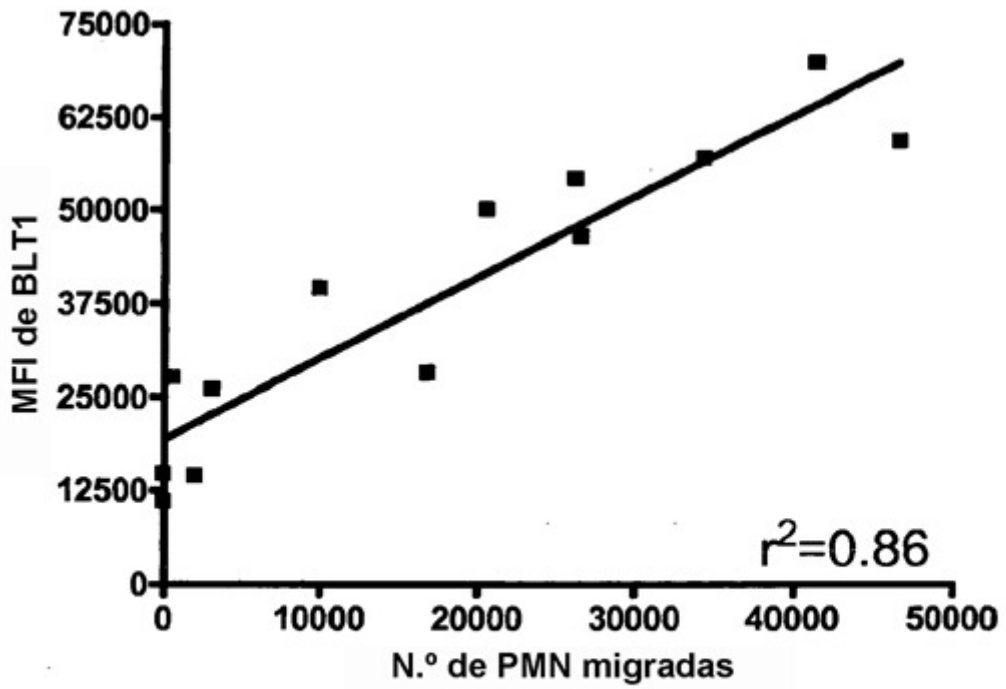


Fig. 7q

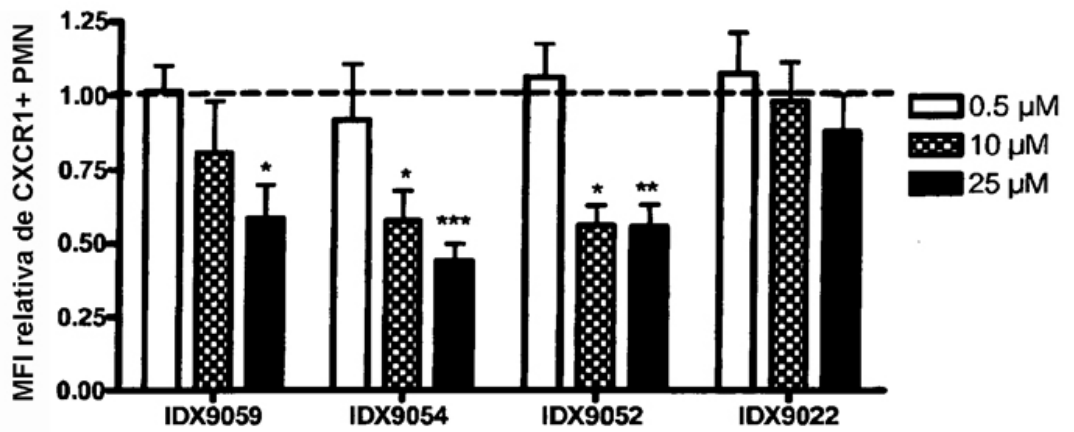


Fig. 8a

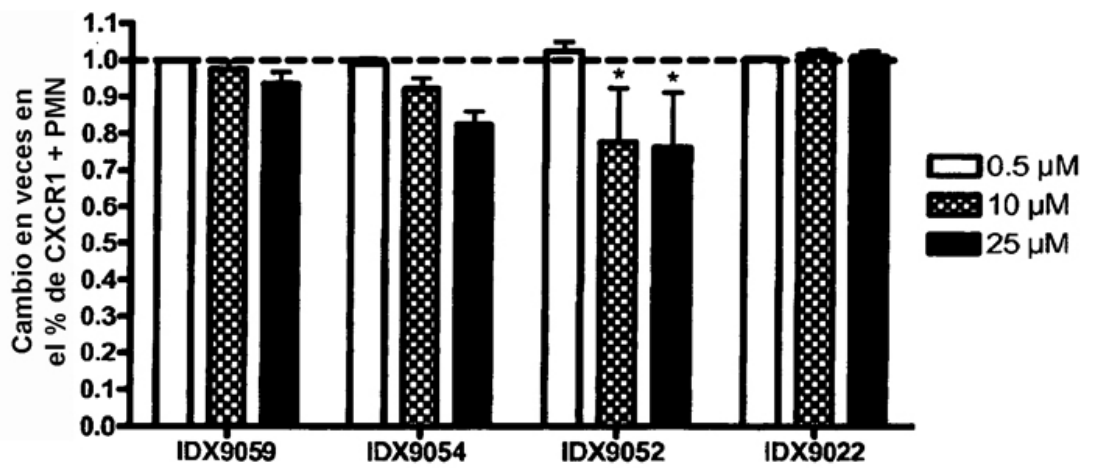


Fig. 8b

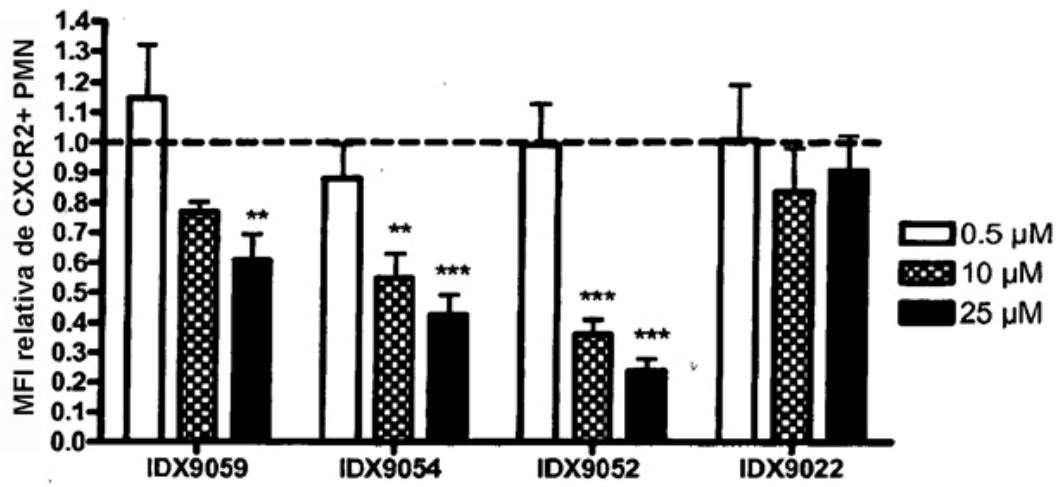


Fig. 8c

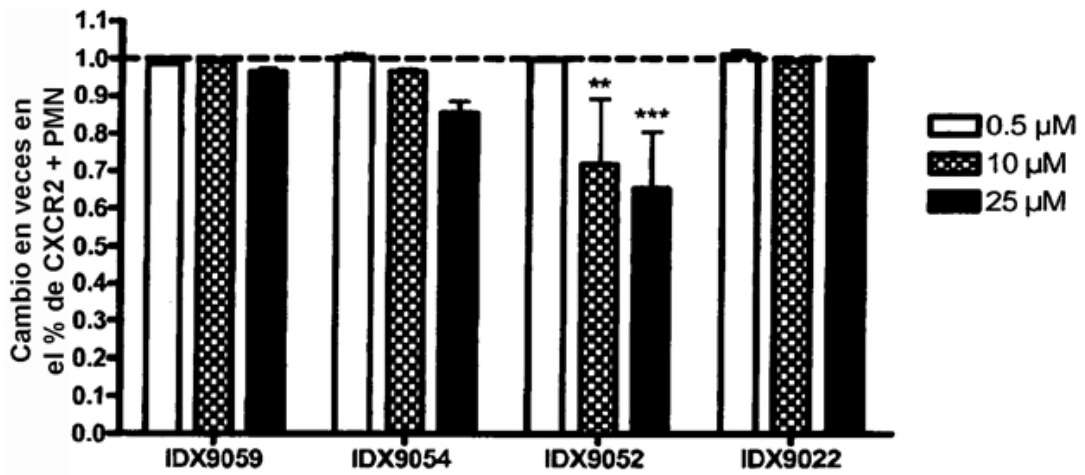


Fig. 8d

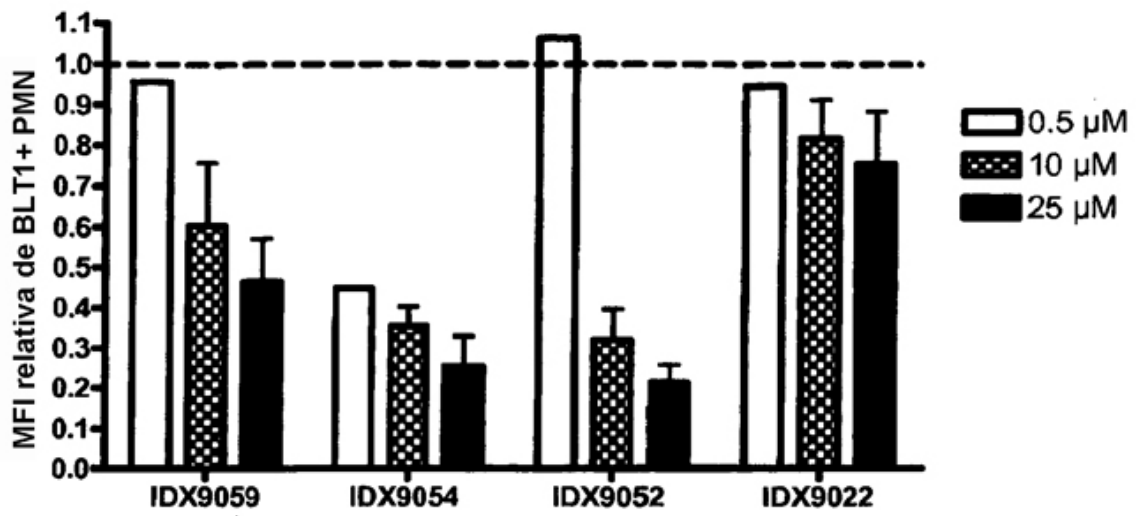


Fig. 8e

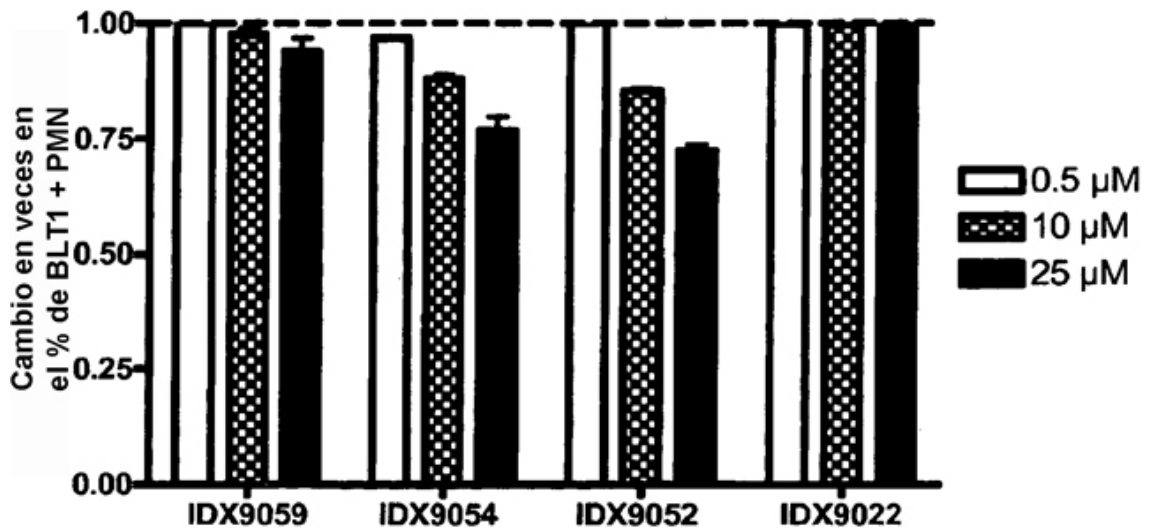


Fig. 8f

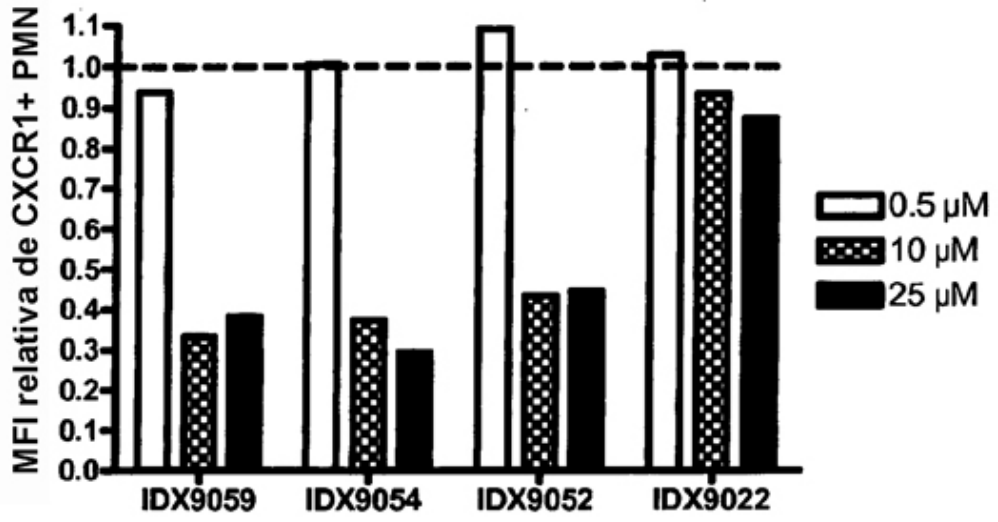


Fig. 8g

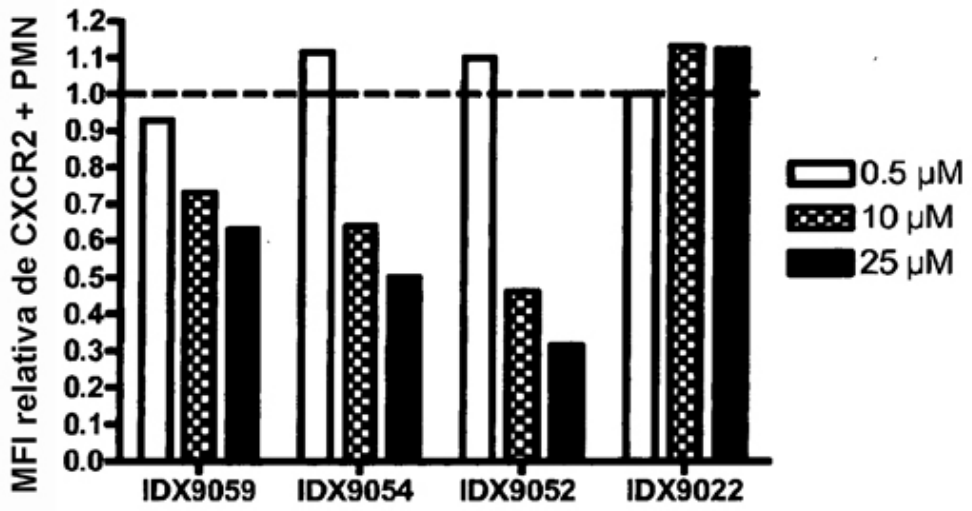


Fig. 8h

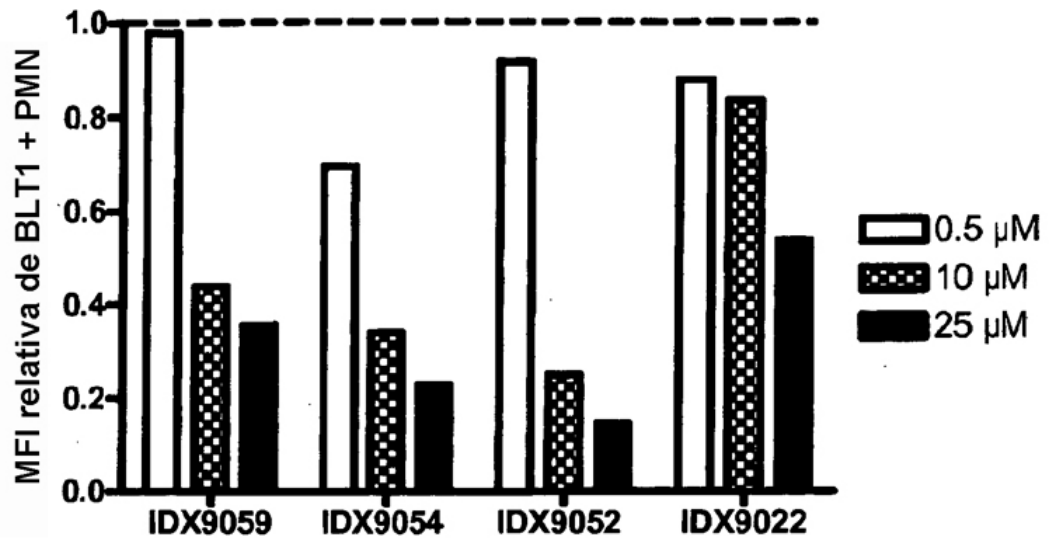


Fig. 8i