



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2342341 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/117 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.07.28
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.03.05
(86)	Europeisk søknadsnr	09825058.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.10.28
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.07.13
(30)	Prioritet	2008.11.04, SE, 0802338 2008.11.04, US, 111284 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Index Pharmaceuticals AB, Tomtebodavägen 23 a, plan 6, 171 65 Stockholm, SE-Sverige
(72)	Oppfinner	ADMYRE, Charlotte, Klippgatan 19 A, 3 tr, S-116 35 Stockholm, SE-Sverige AXELSSON, Lars-Göran, HumlegårdenFrebö 113, S-815 91 Tierp, SE-Sverige VON STEIN, Oliver, Karlbergsvägen 8, S-194 34 Upplands Väsby, SE-Sverige ZARGARI, Arezou, Ripstigen 4, S-170 74 Solna, SE-Sverige
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Forbindelser og fremgangsmåte for redusering av rekruttering eller migrering av polymorfonukleære celler
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2004/110477 WO-A1-2005/080568 WO-A1-2008/136748 WO-A2-2007/030580 LEVENTE JOZSEF ET AL: 'Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils' THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 176, 2006, pages 1195 - 1202, XP003026404 STEVENS S. L. ET AL: 'Toll-like receptor: 9: a new taget of ischemic preconditioning in the brain' JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW & METABOLISM vol. 28, no. 5, 2008, pages 1040 - 1047, XP003026405

Teknisk område.

Foreliggende oppfinnelse vedrører metoder og forbindelser for å redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler, og særlig forbindelser og metoder for forebygging, behandling eller lindring av forskjellige tilstander hvor egenskapene og adferden til polymorfonukleære celler spiller en rolle i patogenesen.

Bakgrunn.

Inflammasjon er en generell betegnelse for mekanismene som kroppen reagerer på infeksjon, irritasjon og annen skade med, noe som mobiliserer komponentene i immunsystemet. Polymorfonukleære celler rekrutteres på et tidlig stadium av en inflammasjon og migrerer til stedet for inflammasjon. Kjemokiner og deres reseptorer, sammen med andre kjemotiltrekkende stoffer, er nøkkelmediatorer for PMN-migrering. Eksempler på kjemotiltrekkende stoffer er IL-8 og LTB₄, som ved binding til sine reseptorer, henholdsvis CXCR1/CXCR2 og BLT1, spiller en avgjørende rolle ved rekruttering av PMN til stedet for inflammasjon. Viktig nok spiller inflammasjon en rolle ved tallrike tilstander, ikke bare sykdommer som normalt klassifiseres som inflammatoriske sykdommer.

Iskemi er en absolutt eller relativ mangel på blodtilførsel til et organ som resulterer i vevsskade på grunn av mangel på oksygen og næringsstoffer. Hjertet, hjernen og nyrene er blant de organene som er mest følsomme overfor utilstrekkelig blodtilførsel. Forskjellige behandlingsstrategier anvendes, avhengig av organene involvert og årsaken til iskemi. Ett eksempel, etter akutt hjerteiskemi (myokardialt infarkt), er at enten må trombolytisk terapi eller primær perkutan koronar intervensjon anvendes for å gjenopprette blodstrømmen (myokardial reperfusjon) i den infarkttrammede koronararterien. Imidlertid forårsaker gjenopprettelse av blodstrømmen etter en iskemisk episode at myocytter i hjertet som var levedyktige umiddelbart før myokardial reperfusjon, dør. Denne myokardiale skade betegnes dødelig reperfusjonsskade, som øker den endelige størrelsen på et myokardialt infarkt. Myokardial iskemi og reperfusjonsskade antas å være forbundet med inflammatoriske reaksjoner som involverer forskjellige typer av celler og cytokiner (Entman og Smith 1994).

Et annet eksempel er slag, og særlig iskemisk slag. Ved et iskemisk slag blir blodtilførselen til én eller flere deler av hjernen redusert, noe som fører til feilfunksjon og nekrose av hjernevevet i disse delene. Det finnes flere underliggende årsaker til et iskemisk slag: trombose (obstruksjon av et blodkar av et blodkoagel som danner seg lokalt), embolisme (obstruksjon av et blodkar på grunn av et embolus dannet et annet

sted i kroppen), systemisk hypoperfusjon (generell reduksjon av blodtilførsel, for eksempel som en konsekvens av sjokk) og venøs trombose.

Embolisme er en alvorlig tilstand som kan føre til begrenset blodtilførsel til organer eller vev, nedstrøms fra emboliet. Embolisme, nevnt ovenfor som én faktor
5 som ligger til grunn ved slag, er kjent for å forårsake obstruksjon i andre organer, hyppig i lungene, nyrene eller leveren, men også i de nedre lemmene. Et embolus kan dannes spontant, for eksempel når plakk løsner fra veggen i et blodkar og fraktes i blodstrømmen. Emboli kan også dannes som resultat av et traume, for eksempel fettemboli fra kompliserte frakturer eller blodkoagler (tromber) fra stedet med
10 blødning. Pasienter som gjennomgår kirurgi er også i risikozonen, siden både tromber og fettemboli kan dannes i løpet av den kirurgiske intervensjon. Også immobilitet, fedme og kreft er risikofaktorer kjent for å være forbundet med embolisme.

Mesenterisk iskemi er en medisinsk tilstand hvor inflammasjon og skade på tynntarmen er et resultat av utilstrekkelig blodtilførsel. Årsaker til den reduserte
15 blodstrømmen kan innbefatte endringer i den systemiske sirkulasjonen (for eksempel lavt blodtrykk) eller lokale faktorer, så som innsnevring av blodkar eller et blodkoagel. Andre lidelser og tilstander i tarmen som potensielt kan føre til iskemi, innbefatter ileus, distensjon, invaginasjon og volvulus, hvor unormal orientering av tarmene, avbrutt peristaltisk bevegelse og andre tilstander kan føre til redusert blodstrøm,
20 inflammasjon og til slutt iskemi. For eksempel kan ileus øke adhesjonsdannelse fordi tarmsegmenter er i langvarig kontakt, noe som tillater at det dannes fibrøse adhesjoner, og tarmdistensjon kan forårsake skade og iskemi i serøse membraner. Slike lidelser kan oppstå som et resultat av kirurgisk intervensjon, enten under operasjonen eller under rekonvalesens, som et resultat av traume, brannskade, sjokk
25 eller forskjellig etiologi etc., og kan føre til multipl organsvikt.

Polymorfonukleære celler (PMN'er), særlig polymorfonukleære nøytrofile granulocytter, som utgjør hovedandelen av leukocytene i blodet, trekkes inn i infarktsonen av kjemotiltrekkende stoffer i løpet av de første 6 timene med myokardial reperfusjon, og i løpet av de neste 24 timene migrerer de inn i det
30 myokardiale vevet. Denne prosessen lettes av celleadhesjonsmolekyler. De nøytrofile granulocytene forårsaker vaskulær tilstopping og frigjør nedbrytbare enzymer og reaktive oksygenforbindelser (Vinten-Johansen J, 2004). Derfor er nøytrofile granulocytter det primære målet for formålet med behandling eller forebygging av inflammasjon. Flere intervensjoner tok sikte på å redusere nøytrofile granulocytter fra
35 infarktområdet under myokardial reperfusjon, for eksempel blod tømte for leukocytter, antistoffer mot celleadhesjonsmolekylene, og farmakologiske hemmere av komplementaktivering. Imidlertid har de tilsvarende kliniske studiene ikke vist noen

betydningsfull kardiobeskyttende effekt av slike intervensjoner (redegjort for i Yellon, 2007).

PMN-akkumulering og -aktivering er blitt vist å spille en sentral rolle ved patogenesen i et vidt utvalg av sykdomstilstander så forskjellig som revmatoid artritt, aterosklerose, ulcerøs kolitt, psoriasis og iskemisk skade. Følgelig er klarlegging av endogene regulatoriske mekanismer som kan kontrollere nøytrofile funksjoner av betydelig terapeutisk interesse. Det er blitt gjort store anstrengelser for å identifisere medikament-kandidater, og én tilnærming er representert ved anvendelsen av peptidforbindelser som binder seg til α M integrin I-domenet og hemmer dets kompleksdannelse med proMMP-9, og derved forebygger nøytrofil migrering (se for eksempel WO2004/110477).

En annen tilnærming er anvendelse av lipoksin og lipoksinderivater, små lipofile forbindelser som er blitt vist å hemme leukocyttrekruttering og PMN-infiltrasjon i dyremodeller av inflammasjon (se for eksempel WO2000/055109).

Enda en annen tilnærming er anvendelse av antistoffer. Tidlig på 1990-tallet ble det identifisert et kraftig CD47-spesifikt antistoff (Ab), C5/D5, som var i stand til å hemme PMN-migrering over vaskulært endotel, kollagenbelagte filtre og tarmepitel, uten å hemme β 2-integrin-mediert adhesjon (Parkos, et al., 1996). På samme tid ble det vist at anti-CD47 også hemmet PMN-migrering over endotel-monosjikt (Cooper, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 92: 3978; 1995). Påfølgende studier med CD47 knockout-mus har bekreftet viktigheten av CD47 ved PMN-migrering *in vivo*, noe som antyder at CD47 spiller en rolle i reguleringen av graden av PMN-rekruttering til steder med infeksjon. (Lindberg et al., 1996).

Transplantasjon er et annet anvendelsesområde hvor konsekvensene av reperfusjonsiskemi må vurderes. Transplantasjon betyr overføring av celler, vev eller deler av organer eller hele organer fra ett sted til et annet. Transplantater kan være autologe, såkalte autotransplantater, hvor hovedsakelig celler blir tatt fra et individ og gitt tilbake til det samme individet. Hyppigere anvendes betegnelsen transplantat for celler, vev eller organer tatt fra én person, donoren, og gitt til en annen person, mottageren. Nyretransplantasjoner er de mest vanlig utførte. Transplantasjon av hjerte, lever og lunger blir også regelmessig utført. Etter hvert som medisinen utvikler seg blir andre vitale organer, innbefattende bukspyttkjertelen og tynntarmen, også anvendt i transplantasjoner. Vev, så som hornhinner, hjerteklaffer, hud og ben, kan også doneres.

Av praktiske årsaker er det behov for å lagre et transplantat utenfor kroppen for en tidsperiode, for å tillate transport, funksjonstesting, vevstyping og matching mellom donoren og mottageren. Siden transplantasjon først kom i stand har organer

som skal transplanteres blitt lagret kaldt og iskemisk. Selv om denne metoden var ment å hjelpe til å redusere graden av organskade under transport, forekommer fremdeles betydelig skade. Desto mer tid som går, desto mer alvorlig skade. Forskjellige tekniske og kjemiske løsninger er blitt foreslått. Imidlertid, etter hvert som antall personer som har behov for et transplantat langt overskrider antall donorer, og siden prosedyren er meget komplisert, kostbar og belastende for alle parter, gjenstår det et behov for forbedringer som øker sjansen for en vellykket transplantasjon. Minimalisering av organskade under lagring og transport er et viktig tema.

WO 2005/080568 vedrører anvendelse av NF-kB-hemmende forbindelser for forebygging eller reduksjon av graden av sekundær iskemisk skade hos et pattedyr. De NF-kB-hemmende forbindelsene er valgt fra gruppen som består av: et antisens NF KB p65-subenhet-oligonukleotid; en dominant negativ form av NF-KB p65-sub-enheten; en lokkedue; ribosom-hemmere; enzymatisk RNA mot NF-KB p65; og siRNA-konstruksjoner.

WO 2007/030580 vedrører metoder for å beskytte celler mot cytotoksisk skade, noe som involverer administrering av et preparat som innbefatter et middel som binder seg til og aktiverer en Toll-lignende reseptor til et individ, eventuelt i kombinasjon med administrering av en ASIC-hemmer. Metodene er angitt å være anvendelige for beskyttelse av nerveceller og celler som ikke er nerveceller. For eksempel tilveiebringes det metoder for beskyttelse av en nervecelle mot eksitotoksisk hjerneskade. Metoder for fremstilling av legemidler for profylaktisk behandling av eksitotoksisk skade, iskemi og/eller hypoksi, tilveiebringes også.

WO 2007/030581 er en søknad parallell med den ovennevnte WO 2007/030580, som fokuserer på administrering av et CpG-oligonukleotid for å beskytte celler mot cytotoksisk skade.

Oppsummering.

Foreliggende oppfinnere har overraskende vist at spesifikke oligonukleotid-forbindelser påvirker egenskapene og adferden til polymorfonukleære celler, særlig rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon, og at de gjennom denne mekanismen er nyttige ved forebygging, behandling og/eller lindring av forskjellige sykdommer.

Oppfinnerne gjør oligonukleotider og metoder for anvendelse av dem i terapi, så vel som i fremstilling av farmasøytiske preparater for dette formål, tilgjengelig. Kliniske situasjoner hvor det er ønskelig å forebygge eller redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon

innbefatter, men er ikke begrenset til, luftveisinflammasjon, pleuritt, myokardialt infarkt, cerebralt infarkt, slag, reperfusjonsskade relatert til vevs- eller organ-transplantater; og reperfusjonsskade relatert til kirurgisk intervensjon, embolisme, sårheling og traume.

5 Ett aspekt ved oppfinnelsen er å tilveiebringe nye forbindelser, så vel som metoder for anvendelse av dem, så som metoder for å forebygge eller redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon ved sykdommer med forskjellig etiologi. Andre aspekter ved oppfinnelsen, sammen med deres fordeler, vil være åpenbare for en person med

10 fagkunnskap ved å studere kravene, herved innlemmet ved referanse.

Kort beskrivelse av tegningene.

Oppfinnelsen vil bli beskrevet mer detaljert nedenfor, i beskrivelsen, ikke-begrensede eksempler og krav, med henvisning til de vedlagte tegningene, hvor:

15

- Figur 1a er den profylaktiske protokollen i musedyrmodellen av OVA-indusert luftveisinflammasjon. Musene ble sensitivisert med to i.p. injeksjoner av OVA i aluminiumhydroksidgel på dag 0 og 12. Behandlinger ble utført med to intranasale administreringer av testmedikament eller vehikkel på dag 16 og 21. Musene ble

20 deretter eksponert for fire aerosol-utfordringer. Forsøket ble avsluttet på dag 35.

20

- Figur 1b er et histogram som viser middelerverdiene av BAL-fluid-avledede celler etter behandling i henhold til fig. 1a. Behandling med IDX9059 resulterte i reduksjon av leukocytene, hovedsakelig eosinofile granulocytter og lymfocytter. Søyler indikerer midlere $\pm$ SD. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ med énveis ANOVA med Bonferroni post hoc-

25 korreksjon versus PBS-kontroll.

25

- Figur 2 viser reduksjonen av PMN-akkumulering etter behandling med forbindelser ifølge oppfinnelsen i en tioglykolat-indusert pleurittmodell i mus. 2a) IDX9010 ble administrert 20 minutter før induksjon av pleuritt og resulterte i en reduksjon av immigrerende PMN'er i pleurahulen med 68,2%. 2b) IDX9059 ble

30 administrert 20 minutter før induksjon av pleuritt og resulterte i en reduksjon av immigrerende PMN'er i pleurahulen med 25,1%. Søylene indikerer midlere $\pm$ SD.

30

- Figur 3a er et histogram over celler pr. mikroskop-felt uten stimulering med noen kjemotaktisk faktor i en modell med intravital mikroskopi av små vener i kremastermuskelen i mus. R = rullende celler, A = adherende celler og T = transmigrerte celler. $n=4$, midlere $\pm$ SD. De ustimulerte cellene avslørte en

35 celleaktivitet i rekkefølgen $R > A > T$. Behandling med IDX9059 viste nedregulerende effekter på rulling og adherens hos ustimulerte PMN-celler.

- Figur 3b er et histogram over celler pr. mikroskop-felt etter tilsetning av kjemotaktisk blodplate-aktiverende faktor (PAF) i en modell med intravital mikroskopi av små vener i kremastermuskelen i mus. R = rullende celler, A = adherende celler og T = transmigrerte celler. På stimulerte celler, (etter PAF) var aktivitetsrekkefølgen reversert, T>A>R>. Behandling med IDX9059 viste nedregulerende effekter på rulling og adherens av og transmigrasjon av PMN-celler. n=4, midlere $\pm$ SD.
- Figures 4a-c viser effekten av behandling med medikamenter ifølge oppfinnelsen og vehikkel (PBS) etter induksjon av cerebral iskemi i rottemodell av fokal iskemi.
- 4a) består av to fotografier som viser en sammenligning av graden av iskemisk skade hos ikke-behandlede dyr gitt PBS (dias E) mot IDX9059 (dias D). Den forbigående tilstoppingen av midtre hjernearterie ble anvendt til å indusere iskemisk hjerneskade i Wistar Hannover-rotter av hankjønn. Laser Doppler ble anvendt til å vise den kortikale blodstrømmen i midtre hjernearterie (MCA). Etter 90 minutter med tilstopping ble filamentet fjernet og blodsirkulasjonen fortsatt i MCA og den kortikale blodstrømmen gjenopprettet. Stoffene ble injisert intraperitonealt 0 og 24 timer etter resirkulasjon. Dyrene ble avlivet etter 48 timer med denne prosessen («operation») og hjernen fjernet og skåret opp i 2 mm tykke skiver. Skivene ble deretter inkubert i 0,8% trifenyltetrazoliumklorid (TTC) i fosfatbuffer for å skille de levedyktige hjernecellene (røde) fra nekrotiske (bleke). Skivene ble fotografert og hjerneskaden evaluert ved hjelp av computational analyse.
- 4b) er et søylediagram som viser prosentandelen total hjerneskade.
- 4c) er et søylediagram som viser prosentandelen område med selektiv nervenekrose (SNN). Selektiv nervenekrose er vist som en estimasjon av den delen som har en lett rose tone og ansett å være penumbraregionen.
- 4d) er et søylediagram som viser prosentandelen infarkt område (iskemisk kjerne). Data vist som midlere $\pm$ SD (n=4-8). Midlere indikert med søyle. *P<0,05 oppnådd med uparet t-test i behandlet gruppe versus PBS-kontroll.
- Figur 5 er et søylediagram som viser prosentandelen infarkt i en dyremodell av hjerteiskemi. IDX9059 (1 μ g/ μ l) eller placebo ble gitt (100 μ l) subkutan 24 t. før hjertet ble skåret ut. Hjertene ble høstet og perfundert i 20 minutter for stabilisering. Global iskemi ble indusert ved å stoppe perfusjon, fulgt av 120 minutter med reperfusjon. På slutten av reperfusjon ble hjertet fjernet og venstre ventrikel ble skåret opp i fire skiver, hver med en tykkelse på én mm, og ble inkubert i 1% trifenyltetrazoliumklorid i fosfatbuffer for å adskille de levedyktige kardiomyocytene. Det ble tatt fotografier av skivene og infarktvolumet evaluert ved hjelp av regnerisk analyse. Resultatene er vist i et søylediagram som viser prosentandelen infarktskade.

Dataene viser midlere (n=8) og SEM. *P< 0,05 ble beregnet ved hjelp av Mann-Whitney-test.

- Figurer 6a-c viser resultatet av behandling med IDX0150 og vehikkel (PBS) i en musemodell av tarmiskemi/reperfusjon. Iskemien ble indusert med 15 minutter ligering av mesenterialarterien, fulgt av 3 timer med reperfusjon. Musen fikk PBS, (6a), eller IDX0150, (6b), 20 minutter før induksjon av iskemi. 6a-b) illustrerer deler av musens fordøyelseskana (mage, venstre; tynntarm; cøcum og kolon) etter administrering av henholdsvis PBS eller IDX0150. Den inflammatoriske skåren for mus behandlet med IDX0150 (skåre 2) versus mus som fikk PBS (skåre 6,5), er vist på 6c.
- Figurer 6d-g viser nivåene av myeloperoksidase (MPO) i tarm- og lungevev i musemodellen med tarmiskemi og reperfusjonsskade. IDX0150 eller PBS ble administrert subkutant 20 min. før induksjon av iskemi (6d og 6f) eller umiddelbart etter start av reperfusjon (6e og 6g). Etter 3 t. med reperfusjon ble tynntarm (6d og 6e) og lunger (6f og 6g) homogenisert og nivåene av MPO analysert med ELISA. Resultatene er presentert som middelerdier med standardavvik.
- Figurer 7a-f viser resultatene av CXCR1- og CXCR2-ekspresjon på human perifer PMN etter stimulering med forskjellige teststoffer. Human PMN fra 5 friske bloddonorer ble stimulert med 25 µM av testforbindelser eller med medium alene (ubehandlet) i 3 t. Celler ble deretter høstet og analysert med tanke på CXCR1- og CXCR2-ekspresjon ved hjelp av strømningscytometri. Antall ganger endringer i midlere fluorescensintensitet (MFI) for CXCR1 (7a) og CXCR2 (7c), eller antall ganger endringer i % av CXCR1+ (7b) og CXCR2+ (7d) CD66b+ PMN ble beregnet ved å normalisere MFI eller % positiv PMN for tilsvarende ubehandlede celler til 1 (stiplet sort linje). 7e) illustrerer den relative MFI til CXCR1+ PMN etter stimulering med 0,5, 10 og 25 µM av IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (n=5). 7f) viser den relative MFI til CXCR1+ PMN etter stimulering med 10 µM IDX9074 i et separat forsøk ved anvendelse av PMN fra 5 friske bloddonorer. Resultatene er presentert som midlere ± SEM. *P<0,05, **P<0,01 og ***P<0,001 ble beregnet ved hjelp av to-veis ANOVA med Bonferronis post hoc-korreksjon versus ubehandlede celler.
- Figur 7g illustrerer CXCR1-ekspresjon på human PMN stimulert med IDX9059 på forskjellige tidspunkter. Human PMN fra 3 friske bloddonorer ble stimulert med 10 µM IDX9059 i 15 min., 30 min., 1 t., 2 t. eller 3 t. Celler ble deretter høstet og fiksert på hvert tidspunkt og analysert med tanke på CXCR1-ekspresjon ved hjelp av strømningscytometri. Antall ganger endringer i MFI for CXCR1 av CD66b positiv PMN i IDX9059-behandlede celler ble beregnet ved å normalisere MFI for tilsvarende ubehandlede celler til 1. Resultatene er presentert som middelerdier ± SEM.

- Figur 7h viser viktigheten av CpG og oligo-G-oligonukleotider på overflate-ekspressjonen av CXCR1. Human PMN fra 3 friske bloddonorere ble inkubert i 3 t. med 0,5, 10 eller 25 μ M av IDX9022 og IDX9059 så vel som de modifiserte kontroll-oligonukleotidene IDX0480 og IDX9134, som har de samme sekvensene som henholdsvis IDX9022 og IDX9059, men uten CpG-motiver. Celler ble deretter høstet og analysert med tanke på CXCR1-ekspressjon ved hjelp av strømningscytometri. Antall ganger endringer i MFI for CXCR1+ CD66b+ PMN ble beregnet ved å normalisere MFI for ubehandlede celler til 1 (stiplet sort linje). Resultatene er presentert som midlere $\pm$ SEM.
- 10 - Figur 7i demonstrerer effekten av klorokin på nedregulering av CXCR1-overflate-ekspressjon etter behandling med forbindelser ifølge oppfinnelsen. Human PMN fra 4 friske bloddonorere ble pre-inkubert i 30 min. med 0,5, 5 eller 10 μ g/ml klorokin før stimulert med 10 μ M av testforbindelser i 3 t. Celler ble deretter høstet og analysert med tanke på CXCR1-ekspressjon ved hjelp av strømningscytometri. Antall
- 15 ganger endringer i MFI ble beregnet ved å normalisere MFI for tilsvarende ubehandlede celler til 1 (stiplet sort linje). Resultatene er presentert som midlere $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ ble beregnet ved hjelp av to-veis ANOVA med Bonferronis post hoc-korreksjon versus ubehandlede celler.
- Figurer 7j-k viser resultatene av BLT1-overflate-ekspressjon på human PMN etter stimulering med forskjellige teststoffer. Human PMN fra 5 friske bloddonorere ble
- 20 stimulert med 0,5, 10 eller 25 μ M av forbindelser ifølge oppfinnelsen eller med medium alene (ubehandlet) i 3 t. Celler ble deretter høstet og analysert med tanke på BLT1-ekspressjon ved hjelp av strømningscytometri. Antall ganger endringer i MFI (7j) eller % BLT1+ CD66b positiv PMN (7k) ble beregnet ved å normalisere MFI eller % for
- 25 tilsvarende ubehandlede celler til 1 (stiplet sort linje). Resultatene er presentert som midlere og SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ og *** $P < 0,001$ ble beregnet ved hjelp av to-veis ANOVA med Bonferronis post hoc-korreksjon versus ubehandlede celler.
- Figur 7l-n viser effekten av forbindelsene ifølge oppfinnelsen på IL-8- og LTB₄-indusert kjemotakse av PMN. Human PMN fra 5 (7l) eller 4-6 (7n) friske bloddonorere ble pre-inkubert med 0,5, 10 eller 25 μ M av forbindelser ifølge oppfinnelsen i 1 t.,
- 30 hvoretter fri forbindelse ble vasket bort og cellene ble undersøkt med tanke på deres evne til å migrere mot IL-8 (7l) eller LTB₄ (7n) i en kjemotakseanalyse i 3 t. Resultatene er presentert som det midlere antall migrerte PMN $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ og ** $P < 0,01$ ble beregnet ved hjelp av énveis ANOVA med Dunnetts post hoc-korreksjon
- 35 versus ubehandlede celler inkubert med IL-8/LTB₄. 7m) viser et separat forsøk hvor PMN fra 2 friske bloddonorere ble pre-inkubert med 0,5, 10 eller 25 μ M av IDX9045 i 1

t., hvoretter cellene ble undersøkt med tanke på deres evne til å migrere mot IL-8 i nærvær av fri forbindelse i en kjemotakse-analyse i 3 t.

- Figurer 7o-q demonstrerer sammenhengen mellom CXCR1-, CXCR2- og BLT1-overflate-ekspresjon og PMN-migrering etter stimulering med forbindelsene ifølge oppfinnelsen. MFI for CXCR1 (7o), CXCR2 (7p) og BLT1 (7q) til PMN etter stimulering med forbindelser ifølge oppfinnelsen, ble plottet mot antall PMN som migrerte mot IL-8 (7o og 7p) eller LTB₄ (7q) i kjemotakse-analysen. Kurvetilpasningen (r^2) er spesifisert på figurene.

- Figurer 8a-f viser resultatene av CXCR1-, CXCR2- og BLT1-ekspresjon på human perifer PMN isolert fra MS-pasienter etter stimulering med forskjellige teststoffer. Human PMN fra MS-pasienter ble stimulert med 0,5, 10 og 25 μ M av testforbindelser eller med medium alene (ubehandlet) i 3 t. Celler ble deretter høstet og analysert med tanke på CXCR1- (n=4), CXCR2- (n=4) og BLT1- (n=2) ekspresjon ved hjelp av strømningscytometri. Antall ganger endringer i midlere fluorescensintensitet (MFI) for CXCR1 (8a), CXCR2 (8c) og BLT1 (8e), eller antall ganger endringer i % for CXCR1+ (8b), CXCR2+ (8d) og BLT1+ (8f) CD66b+ PMN, ble beregnet ved å normalisere MFI eller % positiv PMN for tilsvarende ubehandlede celler til 1 (stiplet sort linje). Resultatene er presentert som midlere $\pm$ SEM. *P<0,05, **P<0,01 og ***P<0,001 ble beregnet ved hjelp av to-veis ANOVA med Bonferroni post hoc-korreksjon versus ubehandlede celler.

- Figurer 8g-i illustrerer resultatene av CXCR1-, CXCR2- og BLT1-ekspresjon på human perifer PMN avledet fra en astmapasient etter stimulering med forbindelsene ifølge oppfinnelsen. Human PMN fra en astmapasient ble stimulert med 0,5, 10 og 25 μ M av testforbindelser eller med medium alene (ubehandlet) i 3 t. Celler ble deretter høstet og analysert med tanke på CXCR1-, CXCR2- og BLT1-ekspresjon ved hjelp av strømningscytometri. Antall ganger endringer i midlere fluorescensintensitet (MFI) for CXCR1 (8g), CXCR2 (8h) og BLT1 (8i) CD66b+ PMN ble beregnet ved å normalisere MFI for tilsvarende ubehandlede celler til 1 (stiplet sort linje).

30 Detaljert beskrivelse.

Før foreliggende oppfinnelse blir beskrevet, skal det forstås at terminologien benyttet her er anvendt bare for det formål å beskrive spesielle utførelsesformer, og er ikke ment å være begrensende, siden omfanget av foreliggende oppfinnelse bare vil være begrenset av de medfølgende krav og ekvivalenter til disse.

35 Det skal bemerkes at entallsformene «en», «et» og «den/det», slik de benyttes i denne beskrivelsen og de medfølgende kravene, innbefatter flertallsformene, med mindre sammenhengen klart sier noe annet.

Ordet "omtrent" anvendes til å indikere et avvik på $\pm 2\%$ av den angitte verdi, fortrinnsvis $\pm 5\%$, og mest foretrukket $\pm 10\%$ av de numeriske verdiene, der det er aktuelt.

I tillegg til ovennevnte, vil følgende betegnelser bli benyttet:

5 Betegnelsen "homologi", og "grad av homologi", betyr likheten eller identiteten mellom to sekvenser, hvor 100 % homologi betyr at sekvensene er identiske, og en lavere homologi indikerer at variasjoner er til stede. For eksempel for en sekvens som består av 20 nukleobaser, er en annen sekvens 90 % homolog hvis 18 baser er de samme.

10 "Funksjonelt homolog" betyr sekvenser som har kanskje en lavere strukturell homologi med den beskrevne sekvensen, men som oppviser homolog funksjon *in vivo*, i enten den friske eller syke organismen, for eksempel som koder for de samme eller meget like proteiner med lignende cellulære funksjoner.

15 Betegnelsene "behandling", "terapi", "terapeutisk anvendelse", "legemiddel", og "medisinsk anvendelse", omfatter anvendelse både til mennesker og dyr eller for veterinæranvendelse.

20 Foreliggende oppfinnere har funnet at spesifikke oligonukleotider er i stand til å påvirke egenskapene og adferden til polymorfonukleære celler, for eksempel deres endoteladhesjon og transmigrasjon, og at disse forbindelsene gjennom disse og muligens andre mekanismer er nyttige ved forebygging og/eller lindring av sykdommer med forskjellig etiologi. Disse funnene er blitt bekreftet i dyreforsøk og i *in vitro*-tester utført på PMN'er isolert fra donorblod.

Tabell 1. Eksempler på oligonukleotidsekvenser.

<u>SEKV. ID. NR.</u>	<u>IDX-Nr.</u>	<u>Seq 5'-3'</u>
1	IDX9005	T*C*G*TCCATGGTCA GGGTCCCGG*G*G*G
2	IDX9010	T*C*C*CAAGAGTCGTCC*A*G*G
3	IDX9022	T*C*G*TCGTTCTGCCATCGTC*G*T*T
4	IDX9030	T*C*G*TCTGCCATGGCGGCC*G*C*C
5	IDX9031	T*C*G*TCGATTCTGTGCTGCA*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*TTCGTCTTCGTC*T*G*C

SEKV. ID. NR.	IDX-Nr.	Seq 5'-3'
10	IDX9092	T*T*T*CGTCTGCTTTCGTTTCG*T*T*T
11	IDX9095	T*C*G*TCTGCTTTCGTC*T*G*C
12	IDX9096	G*A*T*CGTCCGATCG*T*C*C
13	IDX0150	G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*C
14	IDX9052	G*G*G*GTCGTCTG*C*G*G
15	IDX0480	T* <u>G</u> *C* <u>TG</u> CTTCTGCCAT <u>GCTG</u> *C*T*T
16	IDX9134	G*A*T* <u>GCTCTG</u> *G*G*G

Oppfinnerne gjør nye oligonukleotider tilgjengelig, og følgelig er én utførelsesform av oppfinnelsen et isolert og i det vesentlige rensset oligonukleotid som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].

Fortrinnsvis har minst ett nukleotid i en sekvens valgt blant sekvensene ovenfor en fosfatryggrad-modifisering. Nevnte fosfatryggrad-modifisering er fortrinnsvis en fosforotioat- eller fosforoditioat-modifisering.

Oppfinnerne gjør også et farmasøytisk preparat som omfatter et oligonukleotid valgt blant sekvensene ovenfor tilgjengelig.

Én utførelsesform av oppfinnelsen er anvendelse av et oligonukleotid for fremstilling av et farmasøytisk preparat for å redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon, hvor oligonukleotidet er som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059]. Fortrinnsvis, ifølge resultatene som for tiden er tilgjengelig for oppfinnerne, er nevnte reduserte rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon et resultat av en nedregulering av minst én av reseptorene CXCR1 og CXCR2, eller et resultat av en nedregulering av reseptoren BLT1.

I anvendelsen ovenfor blir oligonukleotidet fortrinnsvis gitt på én av følgende måter for administrering: subkutan, intraperitoneal, mukosal, intestinal, oral, gastrisk, øsofageal, bukkal, nasal og pulmonal administrering.

I henhold til en foretrukket utførelsesform, som fritt kan kombineres med det ovenstående, blir oligonukleotidet administrert som et trinn i behandlingen av en inflammatorisk sykdom.

I henhold til en annen foretrukket utførelsesform, som fritt kan kombineres med det ovenstående, blir oligonukleotidet administrert til en pasient som har lidd av, eller som mistenkes for å ha lidd av, et myokardialt infarkt.

I henhold til en annen foretrukket utførelsesform, som fritt kan kombineres med det ovenstående, blir oligonukleotidet administrert til en pasient som har lidd av, eller som mistenkes for å ha lidd av, et slag.

5 I henhold til en annen foretrukket utførelsesform, som fritt kan kombineres med det ovenstående, blir oligonukleotidet administrert til en pasient som har lidd av traume eller brannskade, eller som etter planen skal gjennomgå kirurgi.

I henhold til en annen foretrukket utførelsesform, som fritt kan kombineres med det ovenstående, blir oligonukleotidet administrert til en pasient som har en embolisme («an embolism») før fjerning av emboliet eller før administrering av et
10 trombolytisk middel. Siden forbindelsene er blitt vist å ha også en post-kondisjonerende effekt, antas det at de kan bli administrert også etter fjerning av emboliet eller administrering av et trombolytisk middel, noe som signifikant øker deres anvendelighet i en situasjon med intensiv pleie.

I henhold til en annen foretrukket utførelsesform, som fritt kan kombineres med det ovenstående, blir oligonukleotidet administrert til et organ utpekt for
15 transplantasjon, enten *in situ*, før uttak fra donoren, *in transit* før implantering i mottageren, eller *in vivo*, før eller på tidspunktet for gjenoppretting av blodstrømmen.

Videre gjør oppfinnerne tilgjengelig en metode for å redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon i et organ
20 i en menneskepasient, hvor oligonukleotidet, som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059], blir administrert lokalt til nevnte organ eller systemisk til nevnte pasient.

Alternativt gjør oppfinnerne tilgjengelig en metode for å redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon i et organ, hvor et oligonukleotid blir administrert lokalt til nevnte organ eller systemisk til
25 nevnte pasient før, samtidig med eller etter reperfusjon av nevnte organ, hvor oligonukleotidet er som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].

I en hvilken som helst av metodene for behandling ovenfor, og i henhold til resultatene som for tiden er tilgjengelig for oppfinnerne, er nevnte reduserte rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med
30 inflammasjon, et resultat av en nedregulering av minst én av reseptorene CXCR1 og CXCR2, eller et resultat av en nedregulering av reseptoren BLT1.

Oppfinnerne vedrører også en metode for kondisjonering av en pasient som har lidd av, eller som mistenkes for å ha lidd av, en forstyrrelse eller en avbrytning av blodstrømmen i et organ og som er planlagt for behandling, hvor et oligonukleotid
35 som er i stand til å redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon i nevnte organ, blir administrert til nevnte pasient

før, samtidig med eller etter den planlagte behandlingen, hvor oligonukleotidet er SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059];

I en utførelsesform av ovennevnte metode er nevnte organ fortrinnsvis hjertet, og nevnte reduksjon av rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon i nevnte organ er effektivt til å redusere iskemisk skade og forebygge eller lindre sekundær reperfusjonsskade. I denne utførelsesformen kan nevnte sekundære reperfusjonsskade være en skade som følge av gjenoppretting av blodstrømmen til hjertet gjennom administrering av et trombolyttisk middel. Alternativt er nevnte sekundære reperfusjonsskade en skade som følge av gjenoppretting av blodstrømmen til hjertet gjennom kirurgisk intervensjon, for eksempel bypass-operasjon. Alternativt er nevnte sekundære reperfusjonsskade en skade som følge av gjenoppretting av blodstrømmen til hjertet gjennom ballong-angioplastikk. Alternativt er nevnte sekundære reperfusjonsskade en skade som følge av kirurgisk gjenoppretting av blodstrømmen til et transplantert organ i mottageren av transplantatet.

I en annen utførelsesform av ovennevnte metode er nevnte organ hjernen, og nevnte iskemiske skade er en sekundær reperfusjonsskade. I denne utførelsesformen kan nevnte sekundære reperfusjonsskade være en skade som følge av gjenoppretting av blodstrømmen til hjernen gjennom administrering av et trombolyttisk middel.

I enda en annen utførelsesform av ovennevnte metode, er nevnte organ valgt blant lever, minst én nyre, tarmene eller deler derav, minst én lunge eller deler derav, og nevnte iskemiske skade er en sekundær reperfusjonsskade.

I en hvilken som helst av ovennevnte utførelsesformer av metoden, blir oligonukleotidet gitt på én av følgende måter for administrering: systemisk, fortrinnsvis subkutan, intraperitoneal, mukosal, innbefattende intestinal, oral, gastrisk, øsofageal, bukkal, nasal og pulmonal administrering.

Oppfinnerne gjør også tilgjengelig en adjuvant metode for behandling av myokardialt infarkt, hvor et oligonukleotid som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] blir administrert før, etter eller samtidig med administrering av et trombolyttisk middel.

Videre gjør oppfinnerne tilgjengelig en adjuvant metode for behandling av slag, hvor et oligonukleotid som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] blir administrert før, etter eller samtidig med administrering av et trombolyttisk middel.

En annen utførelsesform av oppfinnelsen er en teknisk løsning for lagring og/eller transport av transplantater, hvor nevnte løsning omfatter et oligonukleotid som er i stand til å påvirke egenskapene og adferden til polymorfonukleære celler, for eksempel undertrykking av endoteladhesjon og rekruttering og/eller migrering av

polymorfonukleære celler, i en mengde som er tilstrekkelig for forebygging og/eller lindring av iskemisk skade, og nevnte oligonukleotid er SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].

I ovennevnte metoder for anvendelse, så vel som metodene for behandling, blir oligonukleotidet administrert i en terapeutisk effektiv dose. Definisjonen av en
5 "terapeutisk effektiv dose" er avhengig av sykdommen og behandlingssituasjonen, idet en "terapeutisk effektiv dose" er en dose som, alene eller i kombinasjon med andre behandlinger, resulterer i en målbar forbedring av pasientens tilstand. En person med fagkunnskap kan bestemme en terapeutisk effektiv dose enten empirisk, eller basert på laboratorieforsøk, utført uten unødig anstrengelse. Behandlende lege
10 kan også bestemme en egnet dose, basert på hans/hennes erfaring og i betraktning av sykdommens natur og alvorlighetsgrad, så vel som pasientens tilstand.

I henhold til én utførelsesform blir oligonukleotidet gitt i en dose i et intervall på omtrent 1 til omtrent 2000 µg/kg kroppsvekt, fortrinnsvis omtrent 5 til omtrent 1000 µg/kg kroppsvekt, mest foretrukket i en dose i et intervall på omtrent 10 til
15 omtrent 500 µg/kg kroppsvekt.

Oligonukleotidet kan administreres som én enkelt dose eller som gjentatte doser. Den for tiden mest foretrukne utførelsesform medfører én enkelt dose av oligonukleotidet ifølge oppfinnelsen, administrert til en slimhinne, for eksempel gitt intranasalt, oralt, rektalt eller intravaginalt, i en mengde på mindre enn omtrent 2000
20 µg, fortrinnsvis mindre enn omtrent 500 µg, fortrinnsvis omtrent 100 µg per kg kroppsvekt.

En annen utførelsesform som for tiden er foretrukket, er administrering av oligonukleotidet i to eller tre doser, adskilt i tid med omtrent 2, omtrent 6, omtrent 12 eller omtrent 24 timer.

25 Ifølge en annen utførelsesform av oppfinnelsen blir oligonukleotidet administrert til et organ utpekt for transplantasjon, enten *in situ*, før uttak fra donoren, *in transit* før implantering i mottageren, eller *in vivo*, før eller på tidspunktet for gjenoppretting av blodstrømmen. Fortrinnsvis er oligonukleotidet til stede i en konsentrasjon på omtrent 0,1 til omtrent 2000 µg/l i en løsning anvendt for
30 kondisjonering av transplantatet før uttak fra donoren. Alternativt, eller i tillegg til dette, er oligonukleotidet til stede i en konsentrasjon på 0,1 til omtrent 1000 µg/l i en løsning benyttet for transport av transplantatet. Alternativt, eller i tillegg til dette, er oligonukleotidet til stede i en konsentrasjon på 0,1 til omtrent 1000 µg/l i en løsning anvendt for kondisjonering av transplantatet før gjenoppretting av blodstrømmen.

35 Det er indikasjoner på at oligonukleotidet kan administreres ikke bare før, men også samtidig med, eller til og med etter gjenoppretting av blodstrømmen. I sammenhengen i eksempel 4 er muligheten for prekondisjonering så vel som

postkondisjonering omtalt. Resultatene viser overraskende at behandling med SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059], også etter induksjon av slaget, kan tjene som postkondisjonering og beskytte hjernen mot iskemisk skade.

Ovennevnte utførelsesformer er gjensidig inkluderende, noe som betyr at forskjellige doser, måter for administrering og tidsintervaller fritt kan kombineres innen utførelsesformene listet opp, så vel som med andre utførelsesformer som åpenbarer seg for en person med fagkunnskap.

Ovennevnte utførelsesformer tilbyr mange fordeler ved at de vil være innlysende for en person med fagkunnskap, ved studium av beskrivelsen og eksemplene. Én fordel er at anvendelse av oligonukleotidene tilbyr muligheten for å erstatte eller komplementere medikamenter som for tiden anvendes, og redusere uheldige effekter forbundet med nåværende medikamenter og behandlinger.

Eksempler.

1. Nasal administrering av immunmodulerende oligonukleotid-teststoff i en musedyrmodell av OVA-indusert luftveisinflammasjon.

Materialer og metoder.

Dyr.

Balb/c-mus av hunkjønn (8 uker), anskaffet fra B&K Sollentuna, Stockholm, Sverige, ble benyttet i forsøket. Musene ble føret med en komplett pelletediett for gnagere, R36 (Laktamin AB, Stockholm, Sverige) og vann av innenlands drikke kvalitet ad libitum. Dyrene ble holdt i dyrerom ved 21°C, ±3°C, og med en relativ fuktighet på 55% ±15%. Ventilasjonssystemet var utformet til å gi 10 luftutskiftninger pr. time. Rommet ble lyssatt til å gi en syklus på 12 timer lys og 12 timer mørke. Lyset er på fra kl. 07:00 til kl. 19:00. Musene ble holdt i bur av transparent polykarbonat (Makrolon type III) (gulvareal: 820 cm²), 5 i hvert bur. Underlaget i burene var 4HV Aspen-underlag (Tapvei, Finland). Hvert bur ble identifisert med et kort på buret merket med studienummer, gruppenummer, kjønn og antall dyr.

Sensitivisering og aerosol-utfordring.

Musene ble sensitivisert intraperitonealt med 200 µl OVA/aluminiumhydroksid-gel (1:3) på dag 0 og 12 (fig. 1a). OVA (kyllingeggalbumin kvalitet V, Sigma, St. Louis, MO) ble oppløst i saltoppløsning og blandet med aluminiumhydroksidgel til en konsentrasjon på 50 µg/ml ved rotasjon ved 4°C i 3 t. På dag 23, 26, 30 og 33 (se fig.

1 a), ble musene utfordret i lungene ved inhalasjon av aerosolisert OVA i 30 minutter ved anvendelse av et Batelle-eksponeringskammer. Aerosoler ble frembragt ved hjelp av en trykkluftforstøver (Collison 6-jet) ved en luftstrøm på 7,4 l/min ved anvendelse av en en forstøver-konsentrasjon på 10 mg/ml OVA oppløst i PBS (Sigma, St Louis, MO, USA). Kontrollgruppen med ikke-sensitiviserte dyr fikk ingen annen behandling enn aerosolisert OVA på dag 23, 26, 30 og 33. Det var også en kontrollgruppe med sensitiviserte mus som ikke fikk aerosol-utfordring.

Oligonukleotid.

10 I denne OVA-modellen (fig. 1a) ble et utvalgt oligonukleotid, IDX9059,(SEKV. ID. NR. 8, tabell 1) testet. Oligonukleotidene ble syntetisert av biomers.net GmbH, Ulm, Tyskland, og lagret fryst ved -20 °C.

Formulering.

15 Det immunmodulerende oligonukleotidet ble oppløst i fosfatbufret saltoppløsning (PBS, Fluka Biochemika Ultra, Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Behandling av OVA-indusert luftveisinflammasjon.

20 I dette forsøket ble det gitt intranasal instillasjon av IDX9059 (1,247 µg/µl) på dag 16 og 21 i en profylaktisk setting (fig. 1a). Stoffet ble administrert i 40ml PBS, noe som gir en dose på ~50 µg/mus (49,88 µg/mus). De to sensitiviserte sham-behandlingsgruppene fikk dryppet inn PBS, det samme totale volum som for test-forbindelsen, på dag 16 og 21.

25 Analyse av luftveisinflammasjons-parametere.

Musene ble drept ved å få nakken brukket 42 t. etter den siste OVA-aerosol-utfordringen. Trakea ble kanylert med polyetylenrør (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) og bronkoalveolær skylling (BAL) ble utført ved anvendelse av 4 x 1 ml alikvoter av iskald Hanks balanserte saltløsning (HBSS) (Sigma, St Louis, MO, USA). BAL-fluidet 30 ble sentrifugert (400 g, 10 min., 4°C) og supernatanten gjenvunnet og fryst for senere analyser. Cellene ble gjenoppslemmet i 0,4 ml PBS og det totale antall leukocytter tallet ved anvendelse av Trypan blå-eksklusjon i et Bürker-kammer. Duplicate Cytospin- (Cytospin 3, Shandon, Runcorn, UK) preparater av BAL-fluidceller ble farget med May Grünwald Giemsa-farge for differensialtelling, ved anvendelse av 35 standard morfologiske kriterier.

Statistisk analyse.

Statistiske sammenligninger ble utført ved anvendelse av énveis variansanalyse (ANOVA) ved anvendelse av Dunnetts post hoc-korreksjon for å sammenligne med sensitiviserte, PBS-behandlede kontrollmus (GraphPad Prism 4). Data er vist som midlere $\pm$ standard avvik. En P-verdi under 0,05 ble betraktet som signifikant.

Resultater.

Den ovalbumin-induserte allergisk astma-modellen er en vidt anvendt modell for å reprodusere luftveis-eosinofili, pulmonal inflammasjon og forhøyede IgE-nivåer funnet ved astma. Analyse av denne modellen beror på generelle indikatorer på astma, så som BAL-analyse, hvor typen og mengden av infiltrerende inflammatoriske celler henholdsvis blir identifisert og tellet.

Følgelig ble BAL-fluidcellene tatt fra hver mus tellet som beskrevet og verdiene plottet inn som et kombinert histogram som gir middelverdiene for de forskjellige gruppene (fig. 1 b).

Generelt sagt var nivået av induert luftveisinflammasjon høyt, som indikert ved en stor influks av de 4 analyserte celletypene i lungene til dyrene (gruppe PBS). Kontrollgruppene viste ingen tegn på induert inflammasjon, noe som bekreftet at dyrene ikke oppviste en naturlig allergisk reaksjon på aerosol-ovalbuminproteinet og at ovalbuminproteinet anvendt ikke var forurenset med for eksempel LPS.

Det fullstendige fravær av noen som helst tegn på inflammasjon i "ingen aerosol"-kontrollgruppene bekreftet at forsøksprosedyren med OVA-immunisering i seg selv ikke induserte lungeinflammasjon.

Etter nasal behandling hadde teststoffet, SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059], en reducerende effekt på inflammatoriske celler, det vil si leukocytter ($P < 0,001$), eosinofile granulocytter ($P < 0,001$) og lymfocytter ($P < 0,05$).

I denne *in vivo*-modellen av allergisk astma spiller leukocytt, det vil si PMN, hovedsakelig eosinofil, en viktig rolle ved lungeinflammasjon. En statistisk signifikant reduksjon av antallet leukocytter, eosinofile granulocytter og lymfocytter som infiltrerer BAL-fluidet ble observert i dyr når behandlet med forbindelsen ifølge oppfinnelsen, SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059]. Dette indikerer at forbindelsen ifølge oppfinnelsen er i stand til å forebygge inflammasjon gjennom å hemme PMN-infiltrering.

2. Tioglykolat-indusert pleuritt i C57/B16-mus.

Materialer og metoder.

5 En dyremodell ble arrangert for å studere effekten av oligonukleotider i henhold til en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse på cellemigrering og vaskulær permeabilitet.

Mus ble anestetisert med en intraperitoneal injeksjon på 0,15-0,20 ml av en blanding av ketamin (Ketalar® Parke-Davis; 25 mg/ml) og xylazin (Narcoxyl vet.® Veterinaria AG; 5 mg/ml).

Venstre halsvene ble kanylert med polyetylenrør (PE10) for intravenøs administrering (i.v.). Det ble gjort et snitt i huden på høyre side av brystet. Etter disseksjon av den underliggende muskel ble pleuritt (inflammasjon av lungesekken) induisert ved hjelp av én enkelt intrapleural injeksjon av 100 µl tioglykolat (Sigma).
15 Steril PBS ble anvendt som negativ kontroll. FITC-konjugert dekstran i PBS (100 µl, 30 mg/ml) ble injisert i.v. Etter 4 t. ble dyrene drept med en overdose av bedøvelsesmiddel, brystet ble forsiktig åpnet og eksudatet fjernet ved aspirasjon og volumet notert. Thorax ble deretter skyllet med 1 ml iskald 3 mM EDTA i PBS. Eksudat som var forurenset med røde blodceller ble kastet.

20 Eksudatet og skyllematerialet ble sentrifugert ved 1500 g i 5 min. og supernatanten anvendt for måling av fluorescensintensitet med et fluorometer (Fluoroskan Acsent, LabSystems) og clearance-volum av FITC-dekstran ble beregnet. Pelleten ble gjenoppslemmet i PBS med 0,1 % BSA i 15 min. for å blokkere uspesifikk antistoff-binding. 10 µl celsuspension ble anvendt for differensialtelling av WBC i et
25 Bürker-kammer.

Celler fra eksudatet ble farget med nøytrofil- og makrofag-spesifikke antistoffer og ble analysert ved hjelp av strømningscytometri (FACSort og CellQuest programvare, BD). Analysen innbefattet telling av hvite blodceller totalt, basert på deres typiske fremtoning i foroverrettet og sideveis spredning. PMN og makrofager ble
30 ytterligere identifisert ved hjelp av deres ekspresjon av henholdsvis Ly6G og F4/80.

For å teste den anti-inflammatoriske effekten av oligonukleotider ved reduksjon av PMN-migrering i henhold til utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, ble forbindelsene som skulle testes administrert intraperitonealt, i en dose på 100 µl, det vil si 50 µg/mus, omtrent 20 minutter før induksjon av pleuritt. I denne studien ble
35 IDX9010, IDX9054, IDX9059, (henholdsvis SEKV. ID. NR. 2, 7, og 8, tabell 1) og IDX 0150 (SEKV. ID. NR. 13) testet.

Resultater.

Den tioglykolat-induserte pleurittmodellen er en av de beste modellene for praktisk screening av nye medikamenter under utvikling, selv om den er teknisk komplisert og nå og da kan vise individuelle, uensartede verdier. Imidlertid er denne modellen begrenset med hensyn til antall dyr som kan testes samtidig.

Resultatene viste at dyr responderte på det inflammasjonsinduserende midlet, tioglykolat, med høy immigrasjon av PMN i pleurahulen og akkumulering av ødem i pleura.

Mus (n=4) som fikk IDX9010 viste et antall PMN'er redusert med 68,2 % (fig. 2a), men ingen reduksjon av ødem (data ikke vist). Mus gitt IDX9054 (n=4) viste ingen reduksjon av antall PMN, men kunne redusere ødemet med 36% (data ikke vist). IDX9059 viste reduksjon av både PMN-akkumulering (25,1%, fig. 2b) og ødem (31 %)(data ikke vist) i en gruppe på 7 dyr. Mus (n=5) gitt IDX0150 viste 40,9 % reduksjon av PMN-antall, og 68,2 % reduksjon av ødem (data ikke vist). Resultatene representerer midlere $\pm$ SD.

Forsøk der det ble anvendt et anti-PMN-antistoff, viste at anti-PMN-ab'et i like stor grad kunne redusere PMN og ødem til de samme nivåene som forbindelsene ifølge oppfinnelsen (data ikke vist). Den profylaktiske administreringen av forbindelser ifølge oppfinnelsen ved tioglykolat-indusert pleuritt førte til reduksjon av PMN-migrering i pleurahulen.

3. Intravital mikroskopi i en musedyrmodell av vaskulær inflammasjon.

Den *in vivo* anti-inflammatoriske effekten av oligonukleotid IDX9059 (SEKV. ID. NR. 8, tabell 1) på leukocyt-ekstravasasjon i mus ble undersøkt. Som respons på en kjemotaktisk stimulus transmigrerer inflammatoriske celler over blodkarenes vegg mot en gradient av stimulus. For å transmigrere må cellene først midlertidig feste seg til blodkarets indre vegg, det vil si rulle (R), deretter starte å feste seg sterkere, adherens (A), og så migrere ut i det omkringliggende vev, transmigrasjon (T). Blodplate-aktiverende faktor (PAF) ble anvendt til å indusere denne inflammatoriske prosessen. I normale, ustimulerte kar var rekkefølgen av disse hendelsene R>A>T. Etter eksponering for PAF ble denne rekkefølgen reversert, T>A>R, noe som viser at celler startet å feste seg og transmigrere.

Introduksjon.

Leukocyt-mobilisering er en forutsetning for en inflammatorisk respons. I blodkar fører en serie av hendelser mellom hvite blodceller og endotel til akkumulering av inflammatoriske celler på et sted med skade eller inflammasjon (Lindbom, 1983). Én viktig celle i denne kaskaden av hendelser, er den polymorfonukleære cellen (PMN). PMN'er blir transportert i blodstrømmen. Blodstrømmen har en høyere hastighet i midten av blodkaret og en lavere fart mot ytterkanten, noe som tillater kontakt mellom PMN'en og blodkarets vegg. Molekylære mekanismer letter adherens av PMN'er til endotelet (Penberthy et al., 1997). Én gruppe av slike molekyler blir kalt selektiner. Til å begynne med forårsaker denne interaksjonen bare delvis at PMN'ene ruller langs endotelet. Stimulert av pro-inflammatoriske molekyler, blir denne adherensen sterkere og forårsaker at PMN'ene fester seg til endotelet, et fenomen kalt klebing. Klebing tillater PMN'ene aktivt å transmigrere over endotelsjiktet og deretter gå inn i bindevevet, og blir videre dirigert av en gradient av inflammatoriske faktorer mot episenteret for inflammasjon.

Alle disse hendelsene kan studeres *in vivo* ved hjelp av intravital mikroskopi. Intravital mikroskopi tillater studiet av celler i små kar og i det omkringliggende bindevev.

Egnede små vener har blitt studert, for eksempel i «tenuissimus»-muskelen i kaniner, og i kremastermuskelen hos mus.

Dette eksemplet omhandler intravital mikroskopi i kremastermuskelen hos mus. Kremastermuskelen er den muskelen som regulerer temperaturen i testiklene i skrotum. Vaskulaturen i denne muskelen kan enkelt eksponeres under et vannimmersjonsobjektiv, «superfused» med bufret saltoppløsning ved kroppstemperatur. Kjemotaktiske eller pro-inflammatoriske stoffer kan tilsettes til «superfusing»-bufferen og farmakologisk middel kan tilsettes til «superfusatet» eller i dyret.

Rulling, klebing og transmigrasjon kan deretter studeres ved hjelp av time-lapse-videoopptak og opptakene kan senere anvendes for mengdebestemmelse av celler eller målinger av avstander på tvers («transversed»).

Målet for denne studien var å studere effekter av forbindelsen ifølge oppfinnelsen, IDX9059, på inflammatorisk cellemigrering i små vener etter PAF-stimulering i mus.

Materialer og metoder.

Dyremateriale og betingelser: C57BL/6 SPF-mus fra Scanbur AB, Sollentuna, Sverige, ble holdt i dyrerom med kontrollert temperatur (21 ± 2 °C), lys/mørke-
 5 cykluser på 12 t. hver, og fikk fri tilgang til mat og vann.

Testforbindelse: Oligonukleotidet SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] ble syntetisert av biomers.net GmbH, Ulm, Tyskland, under ikke-GMP-betingelser og tilveiebragt i PBS-løsning. Oligonukleotidet ble lagret ved -20°C som forrådsløsninger og fremstilt 2-3 dager før igangsetting av forsøket.

10 Formulering: Oligonukleotidet ble ytterligere fortynnet i PBS (Fluka, Sigma) ved romtemperatur. Konsentrasjonen ble justert ved hjelp av UV-spektrofotometri (SmartSpec™ 3000, BIO-RAD, Hercules, USA) opp 95% nøyaktighet, inntil den ønskede konsentrasjon var nådd.

Behandling av PAF-indusert inflammasjon: Dyrene ble gitt IDX9059 s.c., 50
 15 µg/100 µl/mus, circa 20 minutter før induksjon av inflammasjon.

Intravital mikroskopi av leukocyt-rekruttering: Grupper på 4 mus ble anvendt. Mus ble anestetisert med en intraperitoneal injeksjon av 0,15-0,20 ml av en blanding av ketamin (Ketalar®; Pfizer AB, Sollentuna, Sverige; 25 mg/ml) og xylazin (Narcoxy vet.®; Intervet International B.V., Nederland; 5 mg/ml). Venstre halsvene ble kanylert
 20 med polyetylenrør (PE10) for kontinuerlig administrering av bedøvelsesmiddel. Et buksnitt ble gjort på høyre skrotum og én testikkel trukket ut. Kremastermuskelen ble dissekert fra fascia, laget snitt i og festet flat med nåler («pinned») på en transparent pidestall for å tillate gjennomlysning. Testiklene ble deretter festet med nåler til siden. Preparatet ble holdt fuktig og varmt ved kontinuerlig «superfusion» med en 37 °C
 25 temperaturkontrollert bikarbonatbuffer, noe som opprettholder fysiologiske nivåer av temperatur, pH og gass-spenninger. Leukocyt-ekstravasasjon ble indusert ved tilsetning av blodplateaktiverende faktor (PAF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 100 nM) til superfusion-løsningen i 60 min. Målinger av rulling, adhesjon og transmigrasjon ble gjort før og etter stimulering. Video-opptak ble gjort av 20-50 µm brede,
 30 veldefinerte, små vener. Rulling ble bestemt som antallet leukocytter som passerer en referanselinje vertikalt på blodstrømmen i løpet av 30 sekunder. Celler inne i karet ble klassifisert som adherente hvis de forble stasjonære i mer enn 30 sekunder. Transmigrerte celler ble tellet i det ekstravaskulære vev innen en avstand på 70 µm fra det studerte karet.

Alle observasjoner gjort med mikroskop ble gjort ved anvendelse av et Leitz Orthoplan intravital-mikroskop med et Leitz SW25 vannimmersjonsobjektiv (Leitz Wetslar GMBH, Tyskland). Bilder ble overført («televised») og tatt opp ved anvendelse av et Panasonic WV-1550/G (Panasonic, Japan) videokamera.

5

Resultater.

For å transmigrere begynte cellene å rulle, begynte deretter å feste seg sterkere og så migrere ut i det omkringliggende vev. Blodplate-aktiverende faktor (PAF) ble anvendt til å indusere denne inflammatoriske prosessen, og i normale, 10 ustimulerte kar var rekkefølgen av disse hendelsene $R > A > T$. I fravær av kjemotil-trekkende stoff (PAF) var SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] i stand til å redusere rulling med 81,4% og adherens med 41,9% (fig. 3a).

Etter eksponering for PAF ble rekkefølgen av hendelser (rulling, adhesjon og 15 transmigrasjon) reversert, $T > A > R$, noe som viser at celler begynte å feste seg og transmigrere. I overensstemmelse med dette viser resultatet at når PAF ble tilsatt, gikk transmigrerende celler fra et basissnivå på 1,7 celler/felt (før tilsetning av PAF, fig. 3a), opp til 20,66 (etter tilsetning av PAF, fig. 3b). Det var en reduksjon av rullende celler fra 22,3 celler/felt (før tilsetning av PAF, fig. 3a) til 7,7 (etter tilsetning av PAF, 20 fig. 3b), og adherende celler forble på omtrent 14 celler/felt. Ved denne tilstanden reduserte SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] rulling, adherens og transmigrasjon etter PAF-eksponering. Reduksjonen var for rullende celler 48,4%, adherente celler med 28,5% og transmigrerende celle med 54,4%, noe som viser at SEKV. ID. NR. 8 har anti-inflammatoriske egenskaper som kunne være effektive på forskjellige nivåer av inflammasjon og virke på forskjellige inflammatoriske mediatorer.

25 Sett sammen viser disse resultatene de anti-inflammatoriske effektene av SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059]. Overraskende viste SEKV. ID. NR. 8 reduserende effekter på rulling- og adherens-verdier i fravær av kjemotaktisk middel. Dette er én indikasjon på at denne sekvensen har potensiale til å bli anvendt i kliniske situasjoner hvor hemming av PMN-infiltrering er foretrukket.

30

4. Studie av den hemmende effekten av immunmodulerende oligonukleotider på cerebral iskemisk skade i et forsøk med rottemodell.

35 Formålet med studien var å undersøke den hemmende effekten på iskemisk hjerneskade med immunmodulerende oligonukleotider i et forsøk med rottemodell av cerebral iskemi. Dyrestudien ble utført ved Facility for Division of Experimental Vascular Research, Department of Clinical Sciences, Lund University, Lund, Sverige.

Introduksjon.

Det har blitt vist at toleranse mot iskemisk skade kan induseres med LPS via TLR4 i forskjellige organer, så som hjerte, hjerne og nyre (Heemann et al 2000, Rowland et al, 1997; Tasaki et al, 1997). Selv om mekanismen ved beskyttelse ikke er godt forstått, er paradigmet at en liten inflammatorisk respons med LPS-prekondisjonering demper den påfølgende skade av inflammatorisk respons forbundet med kraftigere sekundære stimuli. Det er både likheter og forskjeller mellom de kjente TLR-signaliserende banene, og både TLR4 og TLR9 uttrykkes av noen celler i immunsystemet og sentralnervesystemet (McKimmie og Fazakerley 2005; Tang et al, 2007). Følgelig antas CpG-oligodeoksinukleotider å trigge aktivering av TLR9 innen utvalgte cellepopulasjoner for å promotere iboende immunitet og inducere Th1-tilbøyelig («biased») adaptiv immunitet.

Ett mål med denne studien var å undersøke hvorvidt de spesifikke forbindelsene identifisert av foreliggende oppfinnere også kunne redusere iskemisk skade i hjernen lik LPS-indusert toleranse for iskemisk hjerneskade.

Materialer og metoder.

Dyremateriale og betingelser: Rottene anvendt var innavlede Wistar Hannover-rotter anskaffet fra Harlan Horst, Nederland. Vekten til hver rotte var tilnærmet 350-400 gram. Rottene ble holdt i standard åpne bur av typen Macrolon 3. Burene var plassert i åpne stativer under kontinuerlig luftstrøm bak plastgardiner. Standard-underlag var innkjøpt fra Scanbur- BK, Sollentuna, Sverige. Underlaget ble skiftet én gang pr. uke. Temperaturen i dyrerommene var 18 °C - 22 °C og ble kontrollert via det omgivende ventilasjonssystem i laboratoriet. Lys-syklusen var 12 timer mørke og 12 timer lys (lyset på 06.00).

Rottene ble gitt normal rottediett innkjøpt fra Scanbur- BK, Sollentuna, Sverige. Vannflasker ble fylt opp når nødvendig under akklimatisering og forsøk. Diett og vann ble administrert *ad libitum*.

Rottene had FELASA SPF-status og innkvarteringen og byttesystemet var utformet for å sikre at SPF-statusen ville bli opprettholdt under studien. Utdannet personel håndterte rottene. Veterinær-ekspertise var tilgjengelig på kort varsel fra veterinæravdelingen på LU. Daglige nedtegninger og avgjørelser gjort vedrørende dyrevelferd.

Testforbindelser: IDX9010, IDX9054, IDX9059 og IDX9074 (henholdsvis SEKV. ID. NR. 2 og 7-9, i tabell 1) ble testet med henblikk på deres *in vivo* effektivitet til å redusere hjerneskade i et forsøk med rottemodell av cerebral iskemi. I tillegg tjente

en mitogen-aktivert proteinkinase-hemmer [1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminofynyltio)butadien; $C_{18}H_{16}N_6S_2$] (U0126, Sigma-Aldrich), og PBS (Invitrogen), som henholdsvis positive og negative kontroller. En kombinasjonsbehandling av IDX9059 og U0126 ble også anvendt på et senere stadium i studien. Alle IDX-stoffer ble syntetisert av Biomern.net GmbH, Ulm, Tyskland, under ikke-GMP betingelser og tilveiebragt i PBS-løsning. Testforbindelsene ble lagret ved -20 °C som forrådsløsninger. Med unntak av U0126 og kombinasjonsterapien (U0126+IDX9059), ble alle andre teststoffer gitt på blindet måte.

Formulering: Før igangsetting av et forsøk ble arbeidende konsentrasjon (1 µg/µl) fremstilt ved ytterligere fortykning av forbindelsene i PBS ved romtemperatur. Konsentrasjonen ble justert ved hjelp av UV-spektrofotometri (SmartSpec™ 300, Bio-Rad, Hercules, USA) til 95% nøyaktighet.

Dyreforsøk og dosering: Rottene ble anestetisert med isofluran (4,5%) blandet med NO₂:O₂ (70%:30%). Laser Doppler ble anvendt for å overvåke den kortikale blodstrømmen i midtre hjernearterie (MCA). Et filament ble innført i den indre halsarterien, sendt inn inntil det stengte for blodstrømmen i høyre MCA; en mer enn 80% reduksjon av Laser Doppler-signalet (kortikal blodstrøm) bekreftet tilstoppingen.

Blodtrykk, blodgasser og blodsukker ble kontrollert under operasjonen. Etter 90 minutter med tilstopping ble filamentet fjernet og blodsirkulasjonen fortsatt i MCA og den kortikale blodstrømmen gjenopprettet (reperfusjon). Bare dyrene som hadde mer enn 80% reduksjon av blodstrømmen etter tilstoppingen og høy resirkulasjon av kortikal blodstrøm ble inkludert i studien.

Kroppstemperaturen og den nevrologiske adferden (skåre) ble kontrollert under operasjonen og 0, 1, 2, 24, 48 timer etter resirkulasjon. 100 µl av testforbindelsene sammen med 200 µl PBS ble injisert intraperitonealt i rottene 0 og 24 timer etter resirkulasjon. Dyrene ble avlivet 48 timer etter avslutning av operasjonen og hjernen hurtig fjernet og avkjølt i bikarbonat-bufferløsning. To mm tykke frontalskiver (6 skiver) av hjernen ble preparert og farget med 1% 2,3,5-trifenyltetrazoliumklorid (TTC; Sigma Aldrich) oppløst i saltoppløsning. Infarktvolumet ble beregnet ved hjelp av numerisk integrasjon av det iskemiske område av hver skive ved anvendelse av trapezregelen, og ble uttrykt som prosentandel av totalt hjernevolum i skivene ved anvendelse av programvare-programmet Brain Damage Calculator 1.1 (MB Teknikkonsult, Lund, Sverige).

Statistikk: Statistiske analyser ble utført ved anvendelse av Prism (Graphpad version 4.03, San Diego, CA, USA). Ikke-parametrisk Mann-Whitney-t-test ble anvendt for å beregne statistisk signifikans. P-verdi på mindre enn 0,05 ble betraktet som statistisk signifikant (*).

Resultater.

Induksjonen av toleranse for iskemisk celledød ved hjelp av spesifikke oligonukleotider, ble undersøkt i en *in vivo*-modell av cerebral iskemi i Wistar Hannover-rotte.

Totalt var det 7 forskjellige grupper i studien. Totalt omtrent 60 rotter ble anvendt i studien med 30% dødelighet på grunn av operasjonen. Data ble innsamlet utover i forsøkene, både i sammenheng med operasjonen og i oppfølgingsperioden.

Etter TTC-farging var det intakte hjernevevet klart rødt, mens områder med skade var bleke - hvite (fig. 4a). Hjernene ble delt opp og hver del ble fotografert og analysert med et billedannelsesprogram (se Metoder). Figurene beskriver forskjellige aspekter av det cerebrale infarkt; totalt infarkt område (fig. 4b), penumbra regionen eller selektiv nervenekrose (SNN) (fig. 4c), og den iskemiske kjernen (det hvite området, som vist på fig. 4a, tolket som kjernen) (fig. 4d).

Studien ble utført på blindet måte for IDX9010 (stoff A), IDX9074 (stoff B), IDX9054 (stoff C), IDX9059 (stoff D) og PBS (stoff E), men ikke for U0126 eller kombinasjonsbehandlingen. Som det kan sees på figurer 4b og 4d, var det markert reduksjon (35-40%) av infarktvolum med stoff D (IDX9059) og kontrollstoffet U0126. Det var ingen signifikant forskjell i reduksjon av SNN med forskjellige stoffer (fig. 4c). Etter avblinding av studien, var den siste gruppen innført i studien kombinasjonen av IDX9059 og U0126. Reduksjonen var ikke, som forventet, additiv, men mindre enn den sett ved hvert av stoffene alene.

De fysiologiske parametrene under forsøket og resultatet av en nevrologisk evaluering, ble registrert. Det var ingen forskjell på de fysiologiske parametrene mellom gruppene (data ikke vist). Imidlertid samsvarte nevrologi-evalueringen godt med forbedringer med SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].

Resultatene viser at behandling med SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] etter induksjon av slaget, kan tjene som postkondisjonering og beskytte hjernen mot iskemisk skade.

Det er tidligere blitt vist at MEK1/2-hemmeren (U0126) kan redusere infarkt størrelsen med 30-40% (Henriksson M, 2007, Wang ZQ, 2004). I foreliggende studie tjente dette stoffet som positiv kontroll og reduserte, når administrert i.p., infarktvolumet med 33 %. Det var også en god effekt på nevrologi-evalueringen, med forbedring med U0126 ved 48 timer; bekrefter således at dette forsøket er utført i overensstemmelse med andre forskere (Henriksson *et al.*, 2007).

Nylig viste Stevens *et al.* (2008) at prekondisjonering med CpG-inneholdende oligonukleotider kan indusere nervebeskyttelse mot iskemisk skade, og denne

toleransen er TNF-alfa-avhengig. Blant de 4 forbindelsene ifølge oppfinnelsen (IDX9010, IDX9074, IDX9054 og IDX9059) anvendt i denne studien, viste IDX9059 og IDX9074 en bedre nervebeskyttende effekt. Imidlertid har fire oligonukleotider tidligere blitt anvendt i Wistar-rotte-splenocytstudier for å evaluere ekspresjonen av TNF-alfa ved anvendelse av kvantitativ PCR. Resultatene viste at IDX9054 og IDX9010 var i stand til å indusere ekspresjon av TNF-alfa-mRNA, mens IDX9059 og IDX9074 sviktet med hensyn til å indusere TNF-alfa. Kan således antyde at det kreves andre faktorer, i tillegg til TNF-alfa, som kollektivt gir nervebeskyttelse. I tillegg, i studien utført av Steven *et al.* (2008), ble den beskyttende effekten av CpG-inneholdende oligonukleotider bare sett når de ble administrert profylaktisk 1-14 dager før induksjon av slag. I foreliggende studie ble medikamentene ifølge oppfinnelsen gitt terapeutisk 90 min. etter induksjon av slaget, noe som understreker styrken til SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].

Etter avblinding av foreliggende studie, viste SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] seg å være mest effektiv til å redusere iskemisk skade i hjernen. Siden det positive kontrollstoffet U0126 likeledes hadde en uttalt effekt med hensyn til å redusere iskemisk skade, ble en kombinasjonsbehandling med U0126 og SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059] også evaluert. Reduksjonen av iskemisk skade oppnådd med kombinasjonsbehandlingen var ikke som forventet, og årsaken til dette er ukjent. Imidlertid kunne det være at de to stoffene antagoniserte hverandres effekt.

Således viste denne *in vivo*-studien den nervebeskyttende effekten av forbindelsene ifølge oppfinnelsen ved behandling av slag i en rotte-modell av cerebral iskemi.

25 5. Studie av den hemmende effekten av immunmodulerende oligonukleotid på myokardial iskemisk skade i en modell av isolert/perfundert rottehjerte.

Formålet med denne studien var å undersøke den mulig hemmende effekten av immunmodulerende oligonukleotider på iskemisk hjerteskaade i en modell av isolerte, perfunderte rottehjerter. Dyrestudien ble utført ved dyreavdelingen på Ullevål universitetssykehus, Oslo, Norge.

Introduksjon.

Evnen til å redusere størrelsen på myokardialt infarkt ved å avbryte myokardial reperfusjon med kortvarige episoder med gjentatt koronar-tilstopping har oppnådd interesse i reperfusjonsfasen som et mål for beskyttelse av hjertet, et fenomen betegnet iskemisk postkondisjonering (IPost). Mekanismen ved iskemisk postkondisjo-

nering/indusert beskyttelse er ikke fullt ut forstått, men prosedyren er blitt vist å målsøke de viktige mediatorene av dødelig reperfusjonsskade ved å redusere oksidativt stress, redusere intracellulær Ca²⁺-overbelastning, forbedre endotelfunksjon og svekke apoptotisk kardiomyocytt død (redegjort for i Yellon).

5 Iskemisk prekondisjonering (IPC) intervensjon anvendes også til å redusere størrelsen på myokardialt infarkt i en forsøks-situasjon, ved å utsette hjertet for én eller flere episoder med ikke-dødelig myokardial iskemi og reperfusjon før den vedvarende kransarterie-tilstoppingen. Slik prekondisjonering ville være fordelaktig som profylaktisk behandling før bypasskirurgi i hjertet (redegjort for i Yellon). Både
10 post- og pre-kondisjonering aktiverer lignende grupper av nedstrøms signaliserings-kaskader i RISK-banen (reperfusion injury salvage kinase pathway) som medierer iskemisk beskyttelse i hjerte eller hjerne (Pignataro, 2008). Imidlertid er det både ved IPC og IPost behov for en invasiv behandling som blir benyttet direkte på myokard for å oppnå beskyttelse av hjertet, noe som i noen kliniske situasjoner kan være upraktisk
15 og skadelig.

En alternativ, mer ansvarlig strategi er å påføre det hjertebeskyttende stimulus et organ eller vev fjernt fra hjertet, en tilnærming omfattet av fenomenet med remote iskemisk prekondisjonering (RIPC). Den faktiske mekanismen der en episode med kortvarig iskemi og reperfusjon i et organ eller vev utøver beskyttelse mot en
20 påfølgende, vedvarende beskadigelse med iskemi/reperfusjonsskade i et fjernt organ eller vev, er for tiden uklar.

Oligodeoksinukleotidene trigger aktivering av Toll-lignende reseptor 9 (TLR9) innen utvalgte cellepopulasjoner for å promotere iboende immunitet og indusere Th1-tilbøyelig adaptiv immunitet. Denne egenskapen hos oligonukleotidene modulerer
25 inflammasjon og kan tilveiebringe beskyttelse mot infeksjøs og ikke-infeksjøs sykdommer. Aktivering av TLR9 med oligonukleotider målsøker også en serie av proteinkinaser i RISK-banen (Sun-Hey Lee 2007) på samme måte som IPost og IPC. I foregående eksempel (eksempel 4), viste oppfinnerne at oligonukleotid IDX9059 er i stand til å redusere iskemi/reperfusjonsskade i hjernen. Derfor var ett mål for denne
30 studien å undersøke hvorvidt oligonukleotidene som ble anvendt til å redusere cerebral skade i den foregående studien, også kunne utøve hjertebeskyttende effekter under myokardial iskemi/reperfusjon.

Materialer og metoder.

35 Dyremateriale og betingelser: Wistar Hannover-rotter av hankjønn anskaffet fra Scanbur AS, Nittedal, Norge, ble anvendt i dette forsøket. Rottene ble holdt i den sentrale dyrestallen på Ullevål universitetssykehus. Korrekt autorisert og utdannet

personale håndterte rottene. Daglige registreringer ble gjort vedrørende dyrevelferd. Vekten til hver rotte var tilnærmet 250-350 gram. Rottene ble randomisert til to forsøksgrupper (test og kontroll, $n = 8$ i hver gruppe).

5 Rottene ble holdt i standard åpne bur med standard underlag. Temperaturen i dyrerommene var $18^{\circ}\text{C} - 22^{\circ}\text{C}$ og ble regulert via det omgivende ventilasjonssystem i laboratoriet (fuktighet 55-60%). Lys-syklusen var 12 timer mørke og 12 timer lys (lysene på 06,00).

En fullstendig pelletediett RM3 (Scanbur BK AS, Nittedal, Norge) ble tilført *ad libitum*, og rottene hadde fri tilgang til flasker med friskt drikkevann.

10 Testforbindelser: Det DNA-baserte oligonukleotid IDX9059 (SEKV. ID. NR. 8, tabell 1) ble syntetisert av Biomers.net GmbH, Ulm, Tyskland (Appendix 1) under ikke-GMP-betingelser. Forbindelsen ble tilveiebragt i PBS-løsning og lagret ved -20°C som forrådsløsning ved ankomst.

15 Formulering: Før igangsetting av et forsøk ble arbeidende konsentrasjon ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) fremstilt ved ytterligere fortynning av forrådsløsningen med PBS (Fluka, Sigma) ved romtemperatur, i henhold til InDex SOPB015. Konsentrasjonen ble justert ved hjelp av UV-spektrofotometri (SmartSpecTM 300, Bio-Rad, Hercules, USA) til 95% nøyaktighet. Testforbindelsen ble holdt ved 4°C inntil anvendelse.

20 Dyreforsøk og dosering: Testmedikament ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eller placebo (PBS, vehikkel for testmedikament) ble gitt ($100\text{ }\mu\text{l}$) subkutan 24 t. før isolering av hjertet. Forsøket ble utført på blindet måte.

25 Rotter ble anestetisert med intraperitoneal injeksjon av 5% natriumpento-barbital ($60\text{--}80\text{ mg kg}^{-1}$) og heparinisert (500 IU i.p.). Hjertet ble høstet og perfundert i 20 minutter for stabilisering ved et konstant trykk på 70 mmHg (modifisert Langendorff-måte ved 37°C) ved anvendelse av Krebs Henseleit-buffer som perfusat (mmol/l : NaCl 118,5; NaHCO_3 25; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; glukose/1 H_2O 11,1; CaCl_2 1,8). Bufferen ble gasset med 95% O_2 og 5% CO_2 for å tilveiebringe oksygen og opprettholde ved fysiologisk pH. Hjertets temperatur ble holdt konstant under forsøket med det omkringliggende glassrøret perfundert med vann fra et
30 varmekammer. En fluid-fyllt lateksballong (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, Hugstetten, Tyskland) ble innført i venstre ventrikkel for å måle ventrikulært trykk med et Powerlab-system (AD Instruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW 2154, Australia). Venstre ventrikulære ende-diastoliske trykk (LVEDP) ble innstilt på 5-10 mmHg og endringer i LVEDP ble målt. Venstre ventrikulære utviklede trykk (LVDevP =
35 Venstre ventrikulære systoliske trykk (LVSP) - LVEDP) og maksimum og minimum av venstre ventrikulære trykk-utvikling (LVdp/dtmax og LVdp/dtmin) ble beregnet. Koronar flow (CF) ble målt ved tidsbestemte innsamlinger av koronar gjennom-

strømning. Arytmier ble tellet som en alt- eller ingenting-respons (asystoli eller ventrikulær fibrillasjon) i løpet av de første 30 minuttene med reperfusjon og evaluert ut fra trykk-kurver som hjerterate (HR). Myokardial temperatur ble målt ved å innføre en temperatursonde i høyre ventrikkel.

5 Hjerter med LVSP ≤ 100 mmHg, CF ≤ 8 eller ≥ 20 ml min⁻¹, HR ≤ 220 slag pr. minutt før iskemi eller irreversible arytmier i mer enn 30 minutter under reperfusjon ble ekskludert fra studien.

På slutten av reperfusjonen ble hjertene skåret opp i fire skiver på én mm og tre skiver på to mm (hjerter fiksert i «acrylic rat brain matrix» fra AgnThor's AB, 10 Lidingö, Sverige). Skivene på to mm ble fryst, lagt («clamped») i flytende nitrogen og lagret for eventuelle senere analyser (Western blot, sanntid PCR).

De fire ventrikulære skivene på én mm (5-8 mm fra apex) ble inkubert ved 37°C i 1% trifenyltetrazoliumklorid (TTC) i PBS i 15 minutter. Etter inkubering ble skivene forsiktig presset mellom to glassplater og fotografert (Nikon, Colorfix5400). 15 Infarktområdet ble målt som prosentandel av totalt område og beregnet med Adobe Photoshop og ScionImage (Infarct Area Calculation Macro file, Copyright ©1998 Rob Bell, Hatter Institute, UCL, UK).

Utstrekningen av nekrose (infarktstørrelse) som primært endepunkt og hjertefunksjoner (LVDP, LVSP, LVDP, LVdp/dtmax, LVdp/dtmin, HR, arytmier, CF) 20 som sekundære endepunkter, ble evaluert.

Statistikk: For infarktstørrelse: Students' t-test, for kontinuerlig data-varians-analyse gjentatte målinger.

Resultater.

25 Induksjonen av toleranse for iskemisk celledød med IDX9059 ble undersøkt i en ex vivo-modell av isolert rottehjerte. Hjertene ble skåret ut og perfundert på Longendorff-måte og ble utsatt for en episode med iskemi og reperfusjon som beskrevet i Materiale og metoder. Etter TTC-farging ble hjertene delt opp og hver del ble fotografert og analysert med et billeddannelsesprogram (se Metoder).

30 Infarktskaden på venstre ventrikkel viste 35% reduksjon i rottene behandlet med IDX9059, sammenlignet med rotter behandlet med PBS (vehikkelkontroll) (fig. 5). Forskjellige aspekter ved hjertefunksjonen under reperfusjon ble også undersøkt, imidlertid er ingen signifikant forskjell i funksjonelle data blitt observert i IDX9059-behandlede dyr versus kontroll (data ikke vist).

35 Resultatene viser klart at subkutan forhåndsbehandling av rotter med IDX9059 er i stand til signifikant å redusere graden av global iskemisk skade, her med 35%.

Oppfinnerne har tidligere observed at oligonukleotidet IDX9059 reduserte den iskemiske kjernen i en rotte-modell av cerebral iskemi. I foreliggende studie ble forhåndsbehandling av rotter med IDX9059 i en modell av isolerte/perfunderte rottehjerter funnet å øke toleransen og redusere graden av iskemisk skade.

5 I modellen med isolert hjerte er mange av faktorene som kan være fordelaktige ikke til stede, så som effekten via leukocytter. Følgelig er det forventet at *in vivo*-studier kan resultere i en mer uttalt effekt.

I det isolerte hjertet kan den observerte beskyttelsen med IDX9059 skyldes mekanismer initiert i selve hjertet. Det er rimelig å anta at dette skyldes molekylære endringer i kardiomyocytene via en prekondisjonerings-lignende stimulering i
10 betydningen signalisering og effekter, etter forhåndsbehandling med IDX9059. Dette kunne medieres ved hjelp av forskjellige komponenter, så som varmesjokkproteiner, kjernefaktor kappa B, proteinkinaser (Hausenloy et al., 2005 og 2007, Valen G 2003, og 2005).

15 Forsøket viste at behandling med IDX9059 reduserer PMN-migrering i forskjellige eksmples ovenfor, og indikerer at den testede forbindelsen også utøver en beskyttende effekt gjennom andre mekanismer, så som prekondisjonering.

6. Hemming av akkumulering av nøytrofile granulocytter ved mesenterisk iskemi med immunmodulerende oligonukleotider.
20

Oppsummering.

Tarmiskemi ble indusert i mus ved tilstopping av mesenterialarterien. Etter reperfusjon ble skade på tynn- og tykktarm evaluert, så vel som på lungen.

25 De anti-inflammatoriske effektene av IDX0150 (SEKV. ID. NR. 13, tabell 1) ble undersøkt ved hjelp av histologi, MPO-assay, tetrasoliumreduksjon og akkumulering av tynntarmfluid.

Studien viste at IDX0150 viste signifikant lindrende effekt sammenlignet med kontrolldyr gitt vehikkel, bare når administrert 20 minutter før induksjon av iskemi.

30 Resultatene indikerer at IDX0150 kunne være verdifull for reduksjon av reperfusjonsskade ved iskemi.

Materialer og metoder.

35 Testforbindelser.

Alle forbindelser ble lagret ved -20°C som forrådsløsninger og fremstilt 2-3 dager før igangsetting av et forsøk.

Formulering.

Oligonukleotidene ble ytterligere fortynnet i PBS (Fluka Biochemika Ultra, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) ved romtemperatur. Konsentrasjonen ble justert ved
5 hjelp av UV-spektrofotometri (SmartSpec™ 3000, BIO-RAD, Hercules, USA) til 95% nøyaktighet, inntil den ønskede konsentrasjon var nådd (InDex SOP B015).

Dyreforsøk.

10 Dyreavdeling.

MTC-dyreavdelingen blir overvåket og ført tilsyn med av Karolinska Institutet, veterinæravdelingen. Dyreavdelingen har etablert rutiner for å opprettholde høykvalitets enheter for dyr. Dyrestudien ble utført i et ikke-GLP-akkreditert forskningslaboratorium.

15

Dyr.

BALB/cJ SPF-mus av hunkjønn, alder 10-30 uker (stammer opprinnelig fra The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, ble holdt ved MTC's CFGR-avdeling ved Karolinska Institutet, Stockholm). Dyrene ble inndelt i grupper og fikk akklimatiseres i
20 minst én uke før start av et forsøk. Dyrene ble holdt sammen med pleiere som ble testet i henhold til FELASAs reglement (5) minst to ganger pr. år.

Innkvartering.

Dyrene ble holdt i rom ved 21 ± 3 °C, og med en relativ fuktighet på $55 \pm 15\%$.
25 Ventilasjonssystemet er blitt utformet til å gi 10 luftutskiftninger pr. time. Rommet ble lyssatt til å gi en syklus på 12 timer lys og 12 timer mørke. Lyset var på fra kl. 06:00 til kl. 18:00.

Musene ble holdt i transparente polykarbonat- (Makrolon type III, Scanbur AB, Sollentuna, Sverige) bur (gulvareal: 810 cm²), 8 i hvert bur.

30

Underlag.

Underlaget i burene var Scanbur Bedding (Scanbur AB, Sollentuna, Sverige).

Forbedring av livsforholdene.

35 For forbedring av livsforholdene ble dyrene gitt Sizzle-nest eller Happi-Mat, (Scanbur AB, Sollentuna, Sverige).

Diett og drikkevann.

En komplett, pelletisert gnagerdiett, R36 (Lantmännen, Kimstad, Sverige) ble gitt *ad libitum*. Dyrene hadde fri tilgang til drikkeflasker for dyr med drikkevann av innenlands kvalitet.

5

Identifisering av dyr, gruppering og behandling.

Hvert bur ble identifisert med et kort på buret merket med studienummer, gruppenummer og kjønn. Dyrene ble individuelt merket på halen med tverrgående streker tilsvarende dyrets nummer, ved anvendelse av en filtpenn med dokumentfast blekk.

10

Testprosedyre.

Induksjon av iskemi og reperfusjon.

15

Musen ble anestetisert med Isofluran (Forene[®], Abbott Scandinavia AB, Solna, Sverige), deretter holdt under kirurgisk anestesi (Univentor 400 Anesthesia Unit, AgnTho's AB, Lidingö, Sverige) og plassert på en varmepute, regulert med et termokoblet termometer (Pharmacia AB, Uppsala, Sverige) regulert med en rektal termistor som opprettholder en kroppstemperatur på 37°C. Med hjelp av et kirurgisk stereomikroskop for operasjon (Leitz Wild, Wetslar, Tyskland) ble et 4-5 cm langt snitt gjort i abdomen og den fremre («cranial») (øvre) mesenterialarterie ble lokalisert. En mikrokarklemme, Biemer-clip, lukkestyrke 0,20-0,25 N, Aesculap-Werke AG, Tuttlingen, Tyskland) ble plassert over arterien for totalt å tilstoppe blodstrømmen, indikert ved mangel på puls og blekhet. Abdomen ble lukket og en gastampong gjennombløtt med saltoppløsning (0,9% (vekt/volum⁻¹ NaCl) ble plassert over abdomen. Blodstrømmen ble gjenopprettet etter 15 minutter, indikert ved retur av puls og rødhet i karet. Abdomen ble lukket med agrafer eller kirurgiske suturer. Musen ble gitt 2 ml steril saltoppløsning s.c. for å opprettholde fysiologiske betingelser. Buprenorfin (Temgesic[®], Schering-Plough Corp., New Jersey, USA), 0,05 til 0,1 mg/kg, ble gitt for analgesi. Etter 3 timer ble dyret anestetisert og blodprøve ble tatt fra øyets orbitale plexus. Prøver ble tatt fra tarmer og lever for histologi og andre analyser.

20

25

30

Farmakologisk behandling.

Subkutane (s.c.) injeksjoner av 50 µg/100 µl IDX0150 ble gitt i dyrets hals omtrent 20 minutter før induksjon av iskemi eller umiddelbart etter start av reperfusjon.

35

Kliniske tegn.

Hver mus ble observert regelmessig inntil den ble drept. Alle tegn på sykdom, helse og eventuelle endringer i adferd ble registrert.

5 Kliniske parametre.

De inflammatoriske effektene ble gradert ved anvendelse av et inflammatorisk skåringssystem, rødhet i tarmen: normal 0, lite rødhet 1, rød 2, meget rød 3; tarmfluid: normalt 0, lite 1, mye 2; dyreadferd: våken 0, sløv 2.

10 Homogenisering av lung- og tarmvev for MPO-måling.

Lunger og tynntarm (100-200 µg) ble innsamlet fra IDX0150- og PBS-behandlede mus utsatt for tarmiskemi og reperfusjonsskade. Vevene ble homogenisert i 30 sekunder på is ved anvendelse av Disperser T 10 (IKA®-Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Tyskland) i 1 ml RIPA-buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) inneholdende 5 mM EDTA (Sigma Aldrich) og preteasehemmer-cocktail (Sigma Aldrich). Prøvene ble deretter inkubert på is i 30 min., hvorefter debris ble fjernet fra homogenatene ved hjelp av to runder med sentrifugering ved 10.000 x g i 10 min. ved 4°C. Supernatantene ble innsamlet, alikvotert og fryst ved -70°C for senere myeloperoksidase- (MPO) målinger. MPO ble analysert i homogenatene ved
20 anvendelse av et MPO ELISA-sett (Hycult biotechnology, Uden, Holland), i henhold til produsentens instruksjoner.

Resultater.

Iskemien induserte en grunnleggende inflammatorisk respons som ble sett som
25 sløvhet og stående pels («pile erection of the fur»), ved nekropsi var tarmene oppsvulmet, inneholdende fluid og var inflammet (fig. 6a). I det IDX0150-behandlede dyr var tarmen mindre inflammet (fig. 6b). Ved anvendelse av et skåringssystem hadde de inflammerte dyrene en skåre på 6,5, som sto i kontrast til en lavere skåre i dyr som fikk i.p. IDX0150-behandling (fig. 6c).

30 Myeloperoksidase (MPO) er et hemeprotein som blir uttrykt i overflod i polymorfonukleære nøytrofile granulocytter og blir anvendt som en markør for nøytrofil infiltrering og aktivering (Lau og Baldus, 2006). Nøytrofile granulocytter utgjør hovedandelen av leukocytter som infiltrerer det iskemiske vev og er en viktig bidragsyter til den induserte inflammasjon.

35 I denne studien ble effekten av oligonukleotidforbindelsen IDX0150 (SEKV. ID. NR. 13, tabell 1) på infiltreringen av nøytrofile granulocytter i tynntarm og lunge i en musemodell av tarmiskemi og reperfusjonsskade undersøkt ved måling av MPO i

homogenisert vev. MPO-nivåene i både tarm- (fig. 6d og e) og lunge- (fig. 6f og g) vev ble redusert i mus behandlet med IDX0150, sammenlignet med PBS-behandlede kontroller. Denne reduksjonen av MPO ble sett hvis forbindelsen ble administrert før induksjon av iskemi (fig. 6d og f), så vel som etter start av reperfusjon (fig. 6e og g).
 5 Den observerte reduksjonen av MPO indikerer at det er en redusert infiltrering av nøytrofile granulocytter i det iskemiske vev som respons på oligonukleotid-forbindelsene ifølge oppfinnelsen.

Disse resultatene ble også reflektert i de kliniske resultatene, med en reduksjon av inflammatorisk skåre.

7. Effekten av immunmodulerende oligonukleotider på ekspresjon av kjemokinreseptorer på polymorfonukleære celler.

Introduksjon.

15 IL-8 er et kraftig proinflammatorisk cytokin som har en nøkkelrolle i rekruttering og aktivering av nøytrofile granulocytter under inflammasjon. IL-8 reagerer med nøytrofile granulocytter via to særskilte typer av reseptorer (CXCR1 og CXCR2). Kjemotakse av nøytrofile granulocytter til IL-8 blir hovedsakelig mediert av CXCR1 (78 %), og resten av CXCR2. Et annet kraftig kjemotiltrekkende stoff for
 20 nøytrofile granulocytter er Leukotrien B₄ (LTB₄), som binder seg med høy affinitet til reseptoren BLT1 uttrykt på overflaten av nøytrofile granulocytter. Målet for denne studien var å undersøke hvorvidt forbindelsene ifølge oppfinnelsen er i stand til å redusere ekspresjonen av CXCR1/2 og BLT1 og derved redusere infiltreringen av PMN.

Materialer og metoder.

Testforbindelser.

25 IDX9005, IDX9010, IDX9022, IDX9030, IDX9031, IDX9045, IDX9052, IDX9054, IDX9059, IDX9074, IDX9092, IDX9095, IDX9096 og IDX0150 (SEKV. ID. NR. 1 til 14, tabell 1) ble undersøkt med tanke på deres effekt på CXCR1- og CXCR2-overflate-ekspresjon i friske polymorfonukleære celler (PMN). Forbindelsene ifølge oppfinnelsen, IDX9022, IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (SEKV. ID. NR. 3, 14, 7 og 8, tabell 1), ble videre undersøkt med henblikk på deres effekt på BLT1-overflate-ekspresjon i PMN fra friske frivillige. Alle oligonukleotider ble syntetisert av
 35 Biomerns.net (Ulm, Tyskland), med unntak av IDX0150, som ble bestilt fra Avecia (Manchester, Storbritannia).

Formulering.

Oligonukleotidene ble justert med fosfatbufret saltoppløsning (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) for å nå en forrådskonsentrasjon på 500 μ M ved hjelp av UV-spektrofotometri (SmartSpec® 3000, BIO-RAD, Hercules, USA) og lagret ved -20 °C inntil
5 anvendelse.

Cellepreparering og *in vitro*-stimulering med oligonukleotider.

Fullblod fra friske bloddonorer ble anvendt for preparering av PMN. PMN ble isolert ved densitetssentrifugering ved anvendelse av Polymorphprep™ (Axis-Schield, Oslo, Norge). Cellene ble deretter videre vasket i PBS, og levedyktigheten og
10 celleantallet ble bestemt ved å telle cellene i Trypan-blått (Sigma Aldrich, Stockholm, Sverige). Deretter ble cellene gjenoppslemmet i komplett cellemedium, som består av RPMI 1640 (Sigma Aldrich) supplert med 10 % varme-inaktivert føtalt kalveserum (FCS, Invitrogen), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 10
15 mM HEPES (Sigma Aldrich) og 5 μ g/ml gentamicin (Invitrogen). PMN ble dyrket i 96-brønners vevsdyrkningsplater (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) ved en konsentrasjon på 2×10^6 celler/ml med 0,5, 10 μ M eller 25 μ M av forbindelsene ifølge oppfinnelsen, eller med medium alene som en negativ kontroll, i et totalt volum på 200 μ l/brønn. Cellene ble inkubert i 3 t. hvis ikke annet er angitt, ved 37 °C i en fuktet
20 celledyrkningsinkubator (Thermo Scientific, Waltham, MA) med 5 % CO₂, hvorefter cellene ble analysert med tanke på CXCR1-, CXCR2- og BLT1-ekspresjon, ved anvendelse av strømningscytometri, som beskrevet nedenfor.

Kinetisk evaluering av effekten av oligonukleotider på CXCR1-overflate-
25 ekspresjon.

Human PMN fra friske bloddonorer ble stimulert med 10 μ M av IDX9059 (SEKV. ID. NR. 8, tabell 1) eller med medium alene på forskjellige tidspunkter (15 min., 30 min., 1 t., 2 t. og 3 t.). Celler ble deretter høstet og fiksert på hvert tidspunkt i 2 % paraformaldehyd, hvorefter de ble analysert med tanke på CXCR1-ekspresjon ved
30 hjelp av strømningscytometri, som beskrevet nedenfor.

Strømningscytometri.

Celler inkubert med forbindelsene ifølge oppfinnelsen ble høstet, vasket i PBS og gjenoppslemmet i PBS supplert med 2 % FCS. Cellene ble farget for granulocytmarkøren CD66b sammen med CXCR1 eller CXCR2 eller BLT1, ved anvendelse av
35 fluorokrommerket monoklonale muse-antistoffer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) i 30 min. ved 4°C. Antistoffene anvendt ble sammenlignet med isotype-

matchede kontroller (Becton Dickinson). Etter vasking i PBS ble cellene analysert ved hjelp av et FACSarray-strømningscytometer (Becton Dickinson) og dataene ble analysert ved anvendelse av FACSarray-programvaresystemet (Becton Dickinson). Et minimum på 15.000 sorterte PMN ble analysert pr. prøve.

5

Klorokin-assay.

PMN isolert fra friske bloddonorer ble forhåndsbehandlet med 0,5, 5 og 10 µg/ml klorokin (Sigma Aldrich) i 30 min. ved 37 °C før stimulert med 10 µM av teststoffer i ytterligere 3 t. Overflate-ekspresjon av CXCR1 og CXCR2 ble deretter
10 analysert ved hjelp av strømningscytometri, som beskrevet ovenfor.

Kjemotakse-assay.

Kjemotakse av PMN ble undersøkt ved anvendelse av QCM™ 3 µm 24-brønners kolorimetrisk kjemotakse-assay (Millipore, Temecula, CA), i henhold til produsentens
15 instruksjoner. Kort sagt ble PMN preparert fra fullblod fra friske donorer og gjenoppslemmet i komplett cellemedium, som beskrevet ovenfor. PMN ble pre-inkubert i 48-brønners plater (Becton Dickinson) ved en konsentrasjon på 1×10^6 celler/ml, ved anvendelse av 250 µl celleduspensjon pr. brønn, med 0,5, 10 eller 25 µM av forbindelsene ifølge oppfinnelsen i 1 t. ved 37 °C i en fuktet celledyrknings-
20 inkubator (Thermo Scientific) med 5 % CO₂. Cellene ble deretter vasket i komplett cellemedium og cellene overført til toppinnsatsene på en 24-brønners cellemigreringsplate-sammensetning («assembly») som har en porestørrelse på 3 µm (Millipore). Til de nedre kamrene ble komplett cellemedium inneholdende 100 ng/ml rekombinant human IL-8 (Invitrogen) eller 500 nM LTB₄ (Sigma Aldrich) tilsatt. I ett
25 forsøk med testing av IDX9045 ble cellene ikke vasket før de ble tilsatt til toppinnsatsene på kjemotakseplaten, og i dette tilfellet ble IL-8 tilsatt sammen med IDX9045, ved samme konsentrasjon som anvendt for toppinnsatsen, til det nedre kammeret, dette for å eliminere risikoen for å skape en gradient forbindelsen. Cellene ble deretter tillatt å migrere gjennom filteret mot det kjemotiltrekkende stoffet i 3 t.
30 ved 37°C i en fuktet celledyrkningsinkubator (Thermo Scientific) med 5 % CO₂. Deretter ble cellene fra det nedre kammeret, det vil si migrerte celler, påvist ved inkubering med cellelevedyktighets-fargen WST-1 i 1 t., fulgt av mengdebestemmelse ved måling av absorbansen ved 450 nm ved anvendelse av en mikroplateleser (Tecan, Männedorf, Sveits).

35

Resultat og diskusjon.

PMN utgjør hovedandelen av leukocytene som blir tiltrukket til det iskemiske vev. Her bidrar nøytrofile granulocytter til vevsskade ved å frigjøre frie radikaler, proteolytiske enzymer, så som myeloperoksidase, og ved å stimulere cytokinfrigjøring fra lokale celler, noe som fører til økt inflammasjon. IL-8, ved å binde seg til sine reseptorer CXCR1 og CXCR2, og LTB₄, ved å binde seg til sin reseptor BLT1, på PMN-celleoverflaten, spiller en nøkkelrolle i rekrutteringen av nøytrofile granulocytter til stedet med inflammasjon (Kobayashi, 2008; Tager og Luster, 2003).

I denne studien ble effekten av oligonukleotidforbindelser på overflate-ekspresjonen av CXCR1, CXCR2 og BLT1 på PMN isolert fra friske bloddonorere, undersøkt. Etter 3 t. med stimulering med teststoffer, reduserte flere av forbindelsene ifølge oppfinnelsen den midlere fluorescensintensiteten (MFI) for CXCR1, det vil si mengden av CXCR1 uttrykt pr. celle (fig. 7a). Den største reduksjonen av CXCR1-ekspresjon ble induisert av IDX9052, IDX9054, IDX9005, IDX9030, IDX9059, IDX9022 og IDX9045 (SEKV. ID. NR. 14, 7, 1, 4, 8, 3 og 6, tabell 1), hvorved MFI ble redusert med henholdsvis 68%, 62%, 61%, 60%, 53%, 52% og 30%, når anvendt ved 25 µM. I tillegg var det en liten nedgang i prosentandelen av CXCR1+-celler i PMN stimulert med IDX9005, IDX9022, IDX9030, IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (SEKV. ID. NR. 1, 3, 4, 14, 7 og 8, tabell 1); imidlertid var reduksjonen ikke så vesentlig som for MFI (fig. 7b). CXCR2 ble også nedregulert som respons på oligonukleotidforbindelsene ifølge oppfinnelsen (fig. 7c), særlig når PMN ble stimulert med IDX9052 og IDX9054 (SEKV. ID. NR. 14 og 7, tabell 1), som induiserte en reduksjon av MFI for CXCR2 med henholdsvis 50 og 36 %. IDX9052 og IDX9054 induiserte også en liten reduksjon av prosentandelen av CXCR2+ PMN (fig. 7d). Reduksjonen av CXCR-ekspresjon var dose-avhengig, med den største effekten sett ved 25 µM av oligonukleotidforbindelse, og med mindre effekt sett ved 10 og 0,5 µM (fig. 7e). I tillegg, i et separat forsøk ved anvendelse av PMN fra friske bloddonorere, var IDX9074 (SEKV. ID. NR. 9, tabell 1) i stand til å nedregulere ekspresjonen av CXCR1 (fig. 7f).

For å undersøke kinetikken ved CXCR1-nedregulering, ble human PMN stimulert med 10 µM av IDX9059 (SEKV. ID. NR. 8, tabell 1) i 15 min., 30 min., 1 t., 2 t. og 3 t., hvoretter CXCR1-ekspresjon ble undersøkt med strømningscytometri. Allerede etter 15 min. kunne en liten reduksjon av CXCR1-overflate-ekspresjon observeres, og etter 2 t. hadde nedreguleringen nådd maksimalt nivå, idet ingen ytterligere reduksjon ble sett etter 3 t. (fig. 7g).

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen, IDX9052, IDX9054, IDX9059, IDX9005 og IDX9045 (SEKV. ID. NR. 14, 7, 8, 1 og 6), var alle meget effektive til å redusere CXCR1/2-ekspresjon, og har det til felles at de alle inneholder en G-flanke på sin 5'-

og/eller 3'-ende, noe som antyder at dette strukturelle motivet, sammen med sekvensen av oligonukleotidet, kan forbindes med en mer effektiv CXCR1/2-reducerende kapasitet hos oligonukleotidene. For ytterligere å understøtte dette: når PMN fra friske bloddonorere ble inkubert med kontroll-oligonukleotidene IDX0480 (T*G*C*TGCTTCTGCCATGCTG*C*T*T) og IDX9134 (G*A*T*GCTCTG*G*G*G), som har de samme sekvensene som henholdsvis IDX9022 og IDX9059, men uten CpG-motiver, var IDX0480 ikke i stand til å redusere overflate-ekspressjonen av CXCR1, som sett for IDX9022, mens IDX9134 hadde like mye kraft som IDX9059 til å redusere CXCR1-overflate-ekspressjon (fig. 7h). Uten å ønske å være bundet til noen teori, antar oppfinnerne at disse resultatene indikerer at IDX9022, som ikke har en G-flanke, medierer sin CXCR1- og CXCR2-reducerende effekt hovedsakelig gjennom sine CpG-motiver, mens IDX9059, som inneholder en G-flanke, har CpG-uavhengige effekter.

For å undersøke rollen til TLR9 i reduksjonen av CXCR overflate-ekspressjon induisert av teststoffene, ble PMN forhåndsbehandlet med klorokin før stimulert med teststoffer. Klorokin er et 4-aminkininmedikament som blokkerer endosomal fusjon og surgjøring og forebygger TLR9-aktivering og nedstrøms metabolske signaliseringsbaner. Klorokin kunne dose-avhengig hemme reduksjonen av CXCR1-overflate-ekspressjon induisert av IDX9059 og IDX9022 (SEKV. ID. NR. 8 og 3, tabell 1) (fig. 7i). 10 µg/ml klorokin blokkerte nesten fullstendig reduksjonen av CXCR1-ekspressjon induisert av disse to forbindelsene (fig. 7i). Imidlertid kunne klorokin ikke blokkere reduksjonen av CXCR1-overflate-ekspressjon induisert av IDX9054 eller IDX9052 (SEKV. ID. NR. 7 og 14, tabell 1) (fig. 7i). Disse resultatene indikerer at noen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen medierer sin CXCR-reducerende effekt gjennom endosomal TLR9-aktivering (det vil si IDX9022 og IDX9059), mens andre ikke gjør det (det vil si IDX9052 og IDX9054).

En dose-avhengig reduksjon av BLT1, reseptoren for det kjemotiltrekkende stoffet LTB₄, kunne også demonstreres etter inkubering med forskjellige konsentrasjoner (0,5, 10 og 25 µM) av forbindelsene ifølge oppfinnelsen (fig. 7j). En 87%, 80%, 64% og 57% reduksjon av MFI ble sett med forbindelsene ifølge oppfinnelsen, henholdsvis IDX9052, IDX9054, IDX9059 og IDX9022 (SEKV. ID. NR. 14, 7, 8 og 3, tabell 1), når anvendt ved 25 µM (fig. 7j). I tillegg reduserte IDX9052 og IDX9054 signifikant prosentandelen BLT1-positiv PMN (fig. 7k). Som vist på fig. 7j, var forbindelsene ifølge oppfinnelsen som inneholder en G-flanke på sin 5'- og/eller 3'-ende, det vil si IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (SEKV. ID. NR. 14, 7 og 8, tabell 1), mer effektive til å redusere BLT1-overflate-ekspressjon, sammenlignet med IDX9022, som ikke har en G-flanke.

For å undersøke om reduksjonen av CXCR1-, CXCR2- og BLT1-overflate-ekspressjon induisert av forbindelsene ifølge oppfinnelsen også fører til redusert migrering av PMN mot CXCR1- og CXCR2-liganden (IL-8) eller BLT1-liganden (LTB₄), ble PMN fra friske bloddonorer pre-inkubert i 1 t. med oligonukleotidforbindelsene ifølge oppfinnelsen. Cellene fikk deretter migrere mot IL-8 eller LTB₄ i en kjemotakseanalyse i 3 t. En dose-avhengig reduksjon av antallet migrerte PMN ble sett etter pre-inkubering med både IDX9022, IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (SEKV. ID. NR. 3, 14, 7 og 8, tabell 1), idet de mest effektive forbindelsene var IDX9052, IDX9054 og IDX9059, som ved 25 µM fullstendig, eller nesten fullstendig, blokkerte migreringen av PMN mot både IL-8 (fig. 7l) og LTB₄ (fig. 7n). I tillegg, i et separat forsøk, ved anvendelse av PMN fra to friske bloddonorer, reduserte IDX9045 (SEKV. ID. NR. 6, tabell 1) dose-avhengig IL-8-indusert migrering av PMN (fig. 7m).

Overflate-ekspressjonen av CXCR1 og 2 samsvarte med antallet migrerte PMN i den IL-8-induserte kjemotaksen, slik overflate-ekspressjonen av BLT1 og antallet migrerte PMN i den LTB₄-induserte kjemotaksen gjorde det (fig. 7o-q). Dette indikerer at reduksjonen av PMN-migrering skyldes en lavere overflate-ekspressjon av reseptorene.

Oppfinnerne viste en rask reduksjon av CXCR1-, CXCR2- og BLT1-ekspressjon på PMN inkubert med oligonukleotidforbindelser, som for CXCR1 ble vist å starte allerede etter 15 min. med stimulering. Dette er meget viktig, siden nøytrofile granulocytter er terminalt differensierte celler og derfor kortlivede, hvorfor en hurtig induert immunmodulerende effekt er ønsket. Hayashi et al viste, i 2003, en nedregulering av CXCR1-ekspressjon på PMN med CpG DNA bare i celler forhåndsbehandlet med GM-CSF (Hayashi et al., 2003), mens oligonukleotidstoffene ifølge oppfinnelsen, i denne studien, reduserte overflate-ekspressjon av CXCR1 og 2 uten cytokin-forbehandling, noe som understreker deres kraftig immunmodulerende egenskaper.

Oppfinnerne demonstrerer ikke bare en reduksjon av overflate-ekspressjonen av CXCR1, 2 og BLT1, men demonstrerer i tillegg en redusert respons hos cellene overfor de kjemotiltrekkende stoffene IL-8 og LTB₄, noe som resulterer i mindre migrasjon. Det er grunn til å forutsi at disse resultatene også reflekterer et *in vivo*-scenario, noe som følgelig fører til mindre kjemotakse av PMN inn i inflammete vev.

En redusert overflate-ekspressjon av CXCR1, CXCR2 og BLT1, så vel som redusert respons hos cellene overfor de kjemotiltrekkende stoffene IL-8 og LTB₄, ble observert i friske PMN behandlet med forbindelsene ifølge oppfinnelsen. Disse egenskapene ved oligonukleotidforbindelsene viser klart kraften som forbindelsene ifølge oppfinnelsen har til å påvirke egenskapene og adferden til PMN'er.

8. Effekten av immunmodulerende oligonukleotider på ekspresjonen av kjemokinreseptorer på polymorfonukleære celler fra astma- og MS-pasienter.

5 Introduksjon.

PMN er involvert i patogenesen ikke bare ved iskemi, men også ved mange andre inflammatoriske lidelser, og blokkering av PMN-funksjoner ville derfor være fordelaktig ved mange inflammatoriske sykdommer. Cellulær inflammasjon i luftveiene med PMN, det vil si eosinofile og nøytrofile granulocytter, er et karakteristisk trekk ved
10 astma. PMN har også vært beskrevet å være involvert i patogenesen ved multippel sklerose (MS). Målet for denne studien var å undersøke hvorvidt forbindelsene ifølge oppfinnelsen er i stand til redusere ekspresjonen av CXCR1/2 og BLT1, ikke bare i PMN fra friske individer, men også i PMN fra pasienter med en inflammatorisk tilstand, i dette tilfellet eksemplifisert med astma og MS.

15

Materialer og metoder.

Testforbindelser.

IDX9022, IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (SEKV. ID. NR. 3, 14, 7 og 8, tabell
20 1) ble undersøkt med tanke på deres effekt på CXCR1-, CXCR2- og BLT1-overflate-ekspresjon i PMN fra astma- og MS-pasienter. Alle oligonukleotider ble syntetisert av Biomerns.net (Ulm, Tyskland).

Formulering.

25 Oligonukleotidene ble justert med fosfatbufret saltoppløsning (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) for å nå en forråds konsentrasjon på 500 µM ved hjelp av UV-spektrofotometri (SmartSpec® 3000, BIO-RAD, Hercules, USA) og lagret ved -20 °C inntil anvendelse.

30 Cellepreparering og *in vitro*-stimulering med oligonukleotider.

Fullblod fra astma- og MS-pasienter ble anvendt for preparering av PMN. PMN ble isolert, tellet og gjenoppslemmet i komplett cellemedium, som beskrevet i Materialer og metoder under eksempel 7. PMN ble dyrket i 96-brønners vevs-
35 dyrkningsplater (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) ved en konsentrasjon på 2 x 10⁶ celler/ml med 0,5, 10 µM eller 25 µM av oligonukleotider, eller med medium alene som en negativ kontroll, i et totalt volum på 200 µl/brønn. Cellene ble inkubert i 3 t. ved 37 °C i en fuktet celledyrkningsinkubator (Thermo Scientific, Waltham, MA) med

5% CO₂, hvoretter cellene ble analysert med tanke på CXCR1-, CXCR2- og BLT1-ekspressjon ved anvendelse av strømningscytometri.

Strømningscytometri.

5 Celler inkubert med oligonukleotider ble høstet, vasket i PBS og gjenopp-
slemmet i PBS supplert med 2% FCS. Cellene ble farget med tanke på
granulocytmarkøren CD66b sammen med CXCR1 eller CXCR2 eller BLT1, som
beskrevet i Materialer og metoder under eksempel 7. Cellene ble deretter analysert
ved hjelp av et FACSarray-strømningscytometer (Becton Dickinson), og dataene ble
10 analysert ved anvendelse av FACSarray-programvaresystemet (Becton Dickinson). Et
minimum på 15.000 sorterte PMN ble analysert pr. prøve.

Resultat og diskusjon.

PMN er én av de viktigste cellene som medierer vevsskade under en
15 inflammatorisk respons. PMN migrerer fra blodet til steder med inflammasjon som
respons på lokalt produserte, kjemotiltrekkende stoffer. To av de viktigste
mediatorene av PMN-migrering er CXC-kjemokinet IL-8 og leukotrienet LTB₄. I denne
studien ville oppfinnerne undersøke om forbindelsene ifølge oppfinnelsen kunne
nedregulere reseptorene for IL-8, det vil si CXCR1 og CXCR2, så vel som reseptoren
20 for LTB₄, det vil si BLT1, på overflaten av PMN avledet fra pasienter med en
inflammatorisk sykdom.

Anvendelse av blod fra MS-pasienter indikerte en dose-avhengig reduksjon av
CXCR1, CXCR2 og BLT1 på PMN etter stimuleringer med forbindelsene ifølge
oppfinnelsen (fig. 8a-f). Lignende resultater ble sett når blod fra en astmapasient ble
25 anvendt (fig. 8g-i). Reduksjonen ble hovedsakelig sett for MFI, det vil si mengden av
reseptorer uttrykt pr. celle. IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (SEKV. ID. NR. 8, 7 og 14,
tabell 1) induserte en reduksjon av MFI for CXCR1 på PMN fra MS-pasienter med
henholdsvis 45%, 56% og 42%, når anvendt ved 25 µM (fig. 8a). I tillegg reduserte
IDX9052, IDX9054 og IDX9059 overflate-ekspressjonen av CXCR2 med henholdsvis
30 76%, 58% og 39% (fig. 8c), og overflate-ekspressjonen av BLT1 med henholdsvis
50%, 47% og 26% (fig. 8e). Ved stimulering av PMN fra en astmapasient med
forbindelsene ifølge oppfinnelsen, var reduksjonen av MFI for CXCR1 56%, 71 % og
62% med henholdsvis IDX9052, IDX9054 og IDX9059 (fig. 8g). IDX9052, IDX9054 og
IDX9059 reduserte også MFI for CXCR2 på PMN fra en astmapasient med henholdsvis
35 69%, 50% og 37% (fig. 8h), og MFI for BLT1 med henholdsvis 85%, 77% og 64%
(fig. 8i). Som sett med PMN fra friske donorer, var forbindelsene ifølge oppfinnelsen
som inneholder en flankerende oligo-G-sekvens, det vil si IDX9052, IDX9054 og

IDX9059 (SEKV. ID. NR. 14, 7 og 8, tabell 1), de mest effektive til å redusere CXCR1-, CXCR2- og BLT1-overflate-ekspresjon også i PMN avledet fra MS- og astmapasienter.

5 En redusert overflate-ekspresjon av CXCR1, CXCR2 og BLT1 ble også observert når PMN avledet fra pasienter med en inflammatorisk lidelse, det vil si astma- og MS-pasienter, ble behandlet med forbindelsene ifølge oppfinnelsen. Disse egenskapene til oligonukleotidforbindelsene kan være nyttige til å redusere infiltrering av PMN i inflammerte vev.

Referanser.

Cooper, et al., Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47), *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995 Apr 25, 92(9): 3978-82.

5 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 og 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.

10 Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther* 2007;116:173-91.

Hayashi F, Means TK og Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003;102: 2660-2669.

15 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 og ETB receptor alterations after cerebral ischaemia. *Exp Brain Res*. 2007: 178(4):470-6.

20 Kobayashi, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*, 2008 Jan 1; 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.

25 Lindberg et al., Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice, *Science*, 1996 Nov 1;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.*, 1996 Feb; 132(3): 437-50.
- Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT. Leucocyte adhesion molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997 ;8(4) :380-388.
- Pignataro G, Meller R, Inoue K, Ordonez AN, Ashley MD, Xiong Z, Gala R, Simon RP. *In vivo* and *in vitro* characterization of a novel neuroprotective strategy for stroke: 10 ischemic postconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28(2):232-41. Epub 2007 Sep 19. Erratum in: *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28(2):440. Gala, Rosaria [added].
- Rowland RT, Meng X, Cleveland JC Jr, Meldrum DR, Harken AH, Brown JM. LPS-induced delayed myocardial adaptation enhances acute preconditioning to optimize 15 postischemic cardiac function. *Am J Physiol.* 1997; 272:H2708-15.
- 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 og Luster AD. (2003). BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. 20 *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 69: 123-134.
- 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.
- 25 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 signaling mechanisms in adaptation to ischemia-induced myocardial damage. *Ann Med.* 2003;35:300-7.

Valen G, Vaage J. Pre- og 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.

- 5 Wang ZQ, Chen XC, Yang GY, Zhou LF. U0126 prevents ERK pathway phosphorylation and interleukin-1 beta mRNA production after cerebral ischemia. *Chin Med Sci J*. 2004 Dec;19(4):270-5.

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007; 13;357(11):1121-35.

SEKVENSLISTE

<110> INDEX PHARMACEUTICALS AB
 ZARGARI, Arezou
 AXELSSON, Lars-Göran
 ADMYRE, Charlotte
 VON STEIN, Oliver

<120> Compounds and methods for reducing the recruitment and/or
 migration of polymorphonuclear cells

<130> 59797PC

<150> US 61/111,284

<151> 2008-11-04

<150> SE 0802338-4

<151> 2008-11-04

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 1

tcgtccatgg tcagggtccc ggggg

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 2

tccaagagt cgtccagg

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 3

tcgtcgttct gccatcgtcg tt

<210> 4

<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 4
tcgtctgccca tggcggccgc c

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 5
tcgtcgattc gtctgccatg g

<210> 6
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 6
gggtcgagc tgg

<210> 7
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 7
ggggtcgtct gcggg

<210> 8
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 8
gatcgtccgg gg

<210> 9
<211> 19
<212> DNA

<213> Artificial

<400> 9
tcgttcgtct ttcgtctgc

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 10
tttcgtctgc tttcgtttcg ttt

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 11
tcgtctgctt tcgtctgc

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 12
gatcgtccga tcgtcc

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 13
ggaacagttc gtccatggc

<210> 14

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 14
ggggtcgtct gcgg

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 15
tgctgcttct gccatgctgc tt

<210> 16
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 16
gatgctctgg gg

P a t e n t k r a v

1. Isolert og rensset oligonukleotid som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].
2. Oligonukleotid ifølge krav 1, hvor minst ett nukleotid har en fosfatryggrad-modifisering.
3. Farmasøytisk preparat som omfatter et oligonukleotid ifølge et hvilket som helst av kravene 1-2.
4. Anvendelse av et oligonukleotid for fremstilling av et farmasøytisk preparat for å redusere rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon, hvor oligonukleotidet er som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].
5. Anvendelse ifølge krav 4, hvor nevnte reduserte rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon, er et resultat av en nedregulering av minst én av reseptorene CXCR1 og CXCR2.
6. Anvendelse ifølge krav 4, hvor nevnte reduserte rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler til et sted med inflammasjon, er et resultat av en nedregulering av reseptoren BLT1.
7. Anvendelse ifølge krav 4, hvor oligonukleotidet blir gitt på én av følgende måter for administrering: subkutan, intraperitoneal, mukosal, intestinal, oral, intravenøs, gastrisk, øsofageal, bukkal, nasal og pulmonal administrering.
8. Anvendelse ifølge krav 4, hvor oligonukleotidet blir administrert som et trinn i behandlingen av en inflammatorisk sykdom.
9. Anvendelse ifølge krav 5, hvor oligonukleotidet blir administrert til en pasient som har lidd av, eller som mistenkes for å ha lidd av, et myokardialt infarkt.
10. Anvendelse ifølge krav 4, hvor oligonukleotidet blir administrert til en pasient som har lidd av, eller som mistenkes for å ha lidd av, et slag.

11. Anvendelse ifølge krav 4, hvor oligonukleotidet blir administrert til en pasient som har lidd av traume eller brannskade, eller som etter planen skal gjennomgå kirurgi.
12. Anvendelse ifølge krav 4, hvor oligonukleotidet blir administrert til en pasient som har embolisme før, etter eller samtidig med fjerning av emboliet, eller før eller etter administrering av et trombolyttisk middel.
13. Anvendelse ifølge krav 4, hvor oligonukleotidet blir administrert til et organ utpekt for transplantasjon, enten *in situ*, før uttak fra donoren, *in transit*, før implantering i mottageren, eller *in vivo*, før eller på tidspunktet for gjenoppretting av blodstrømmen.
14. Teknisk løsning for lagring og/eller transport av transplantater, hvor nevnte løsning omfatter et oligonukleotid som er i stand til å påvirke egenskapene og adferden til polymorfonukleære celler, for eksempel undertrykking av endoteladhesjon og rekruttering og/eller migrering av polymorfonukleære celler, i en mengde som er tilstrekkelig til å forebygge og/eller lindre iskemisk skade, og nevnte oligonukleotid er som definert i SEKV. ID. NR. 8 [IDX9059].

Profylaktisk protokoll

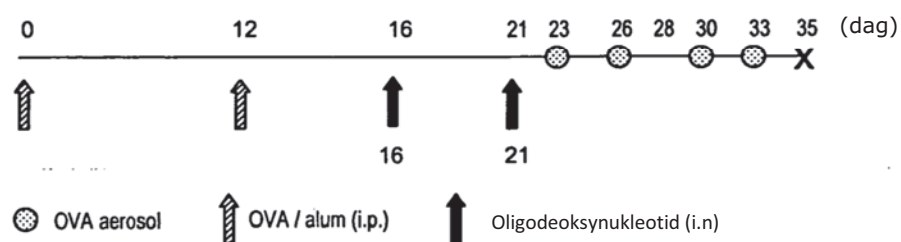


Fig. 1a

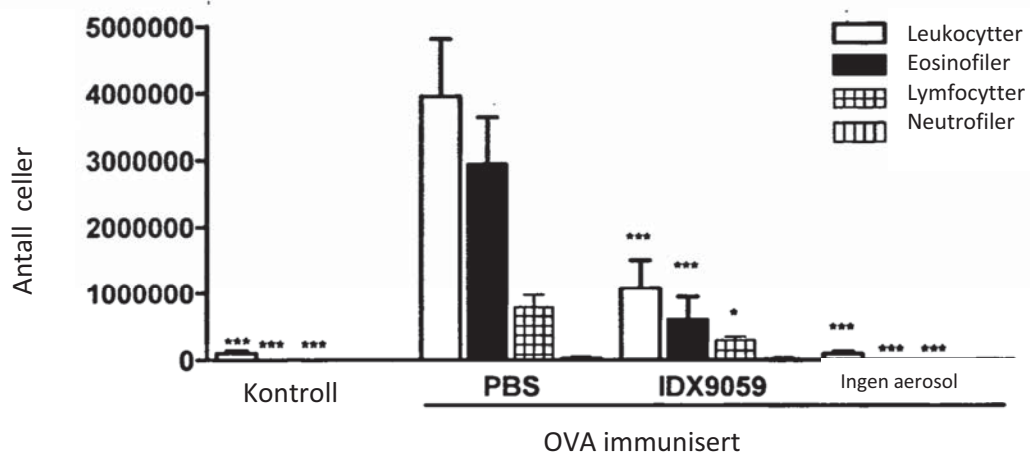


Fig. 1b

2/23

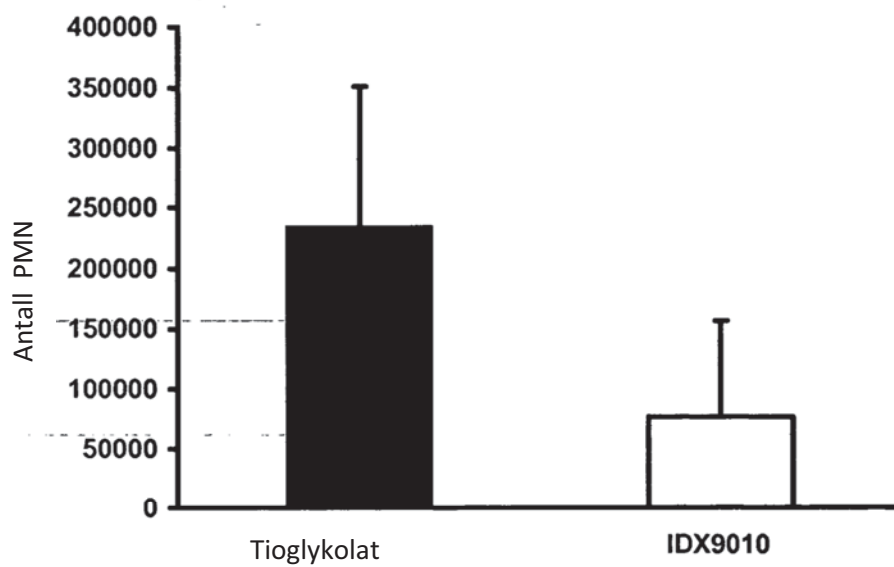


Fig. 2a

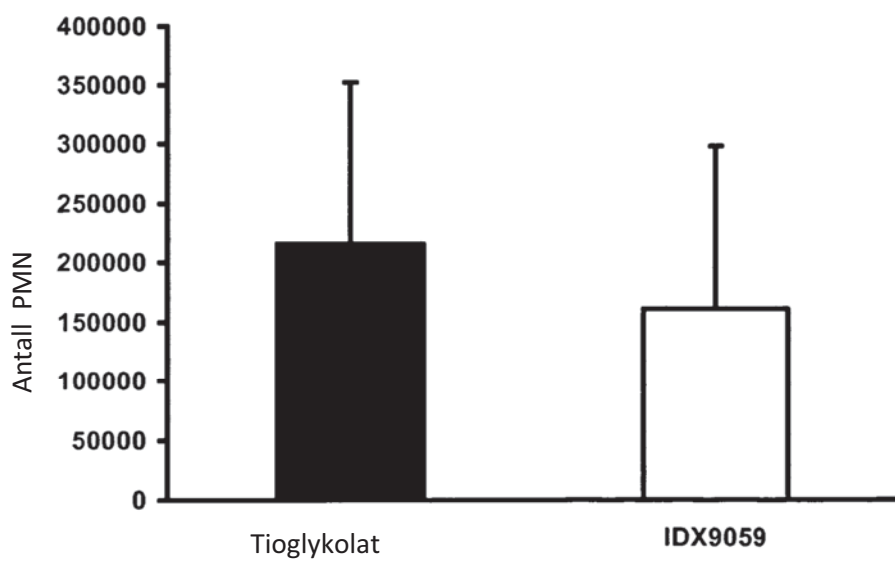


Fig. 2b

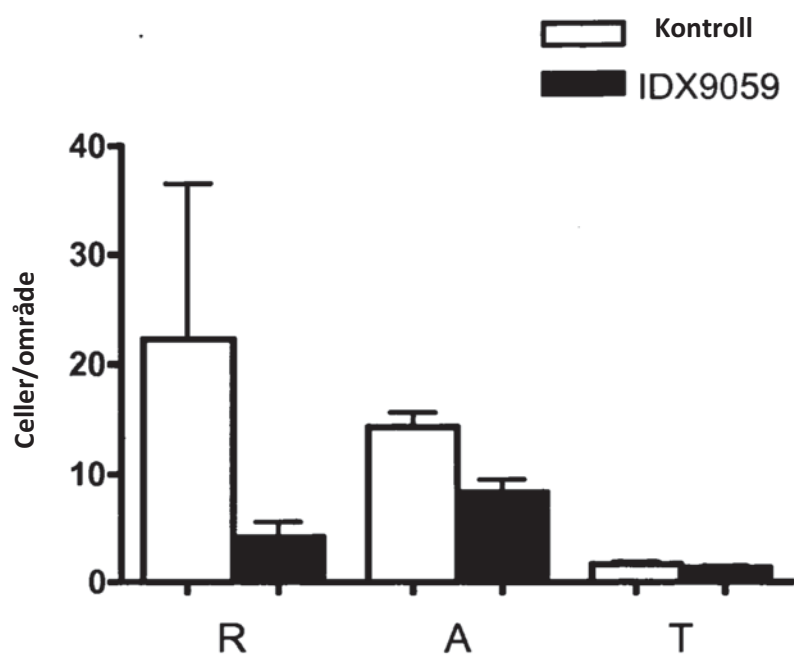


Fig. 3a

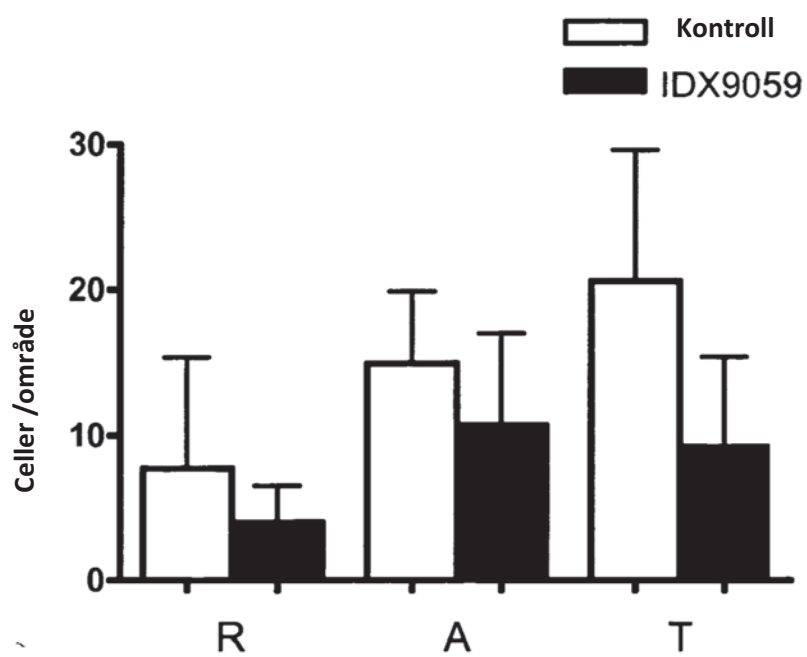


Fig. 3b

4/23

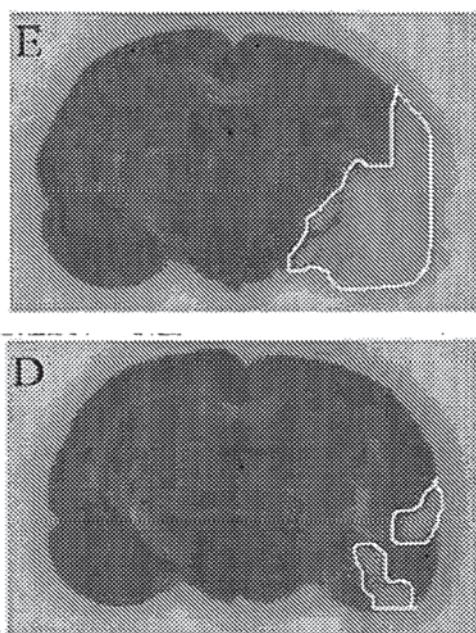


Fig. 4a

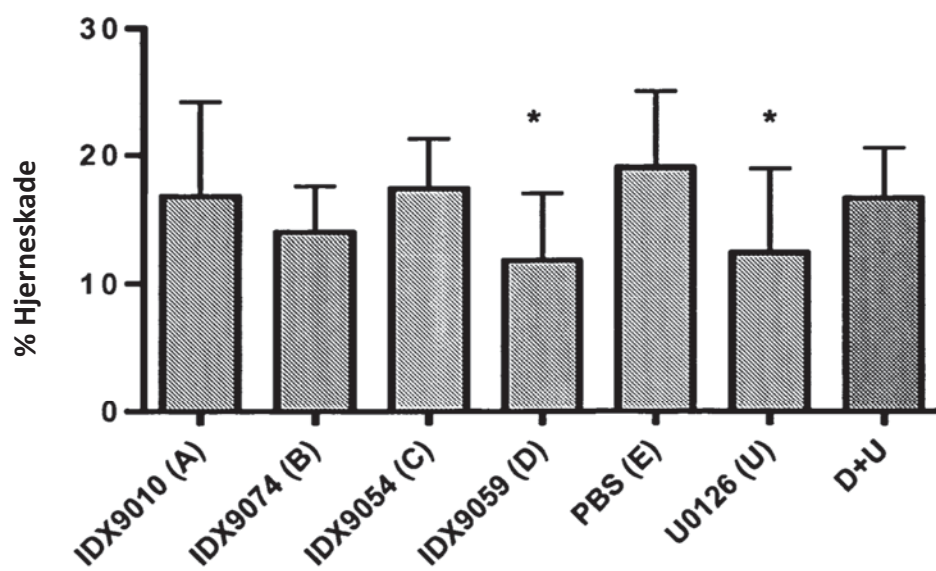


Fig. 4b

5/23

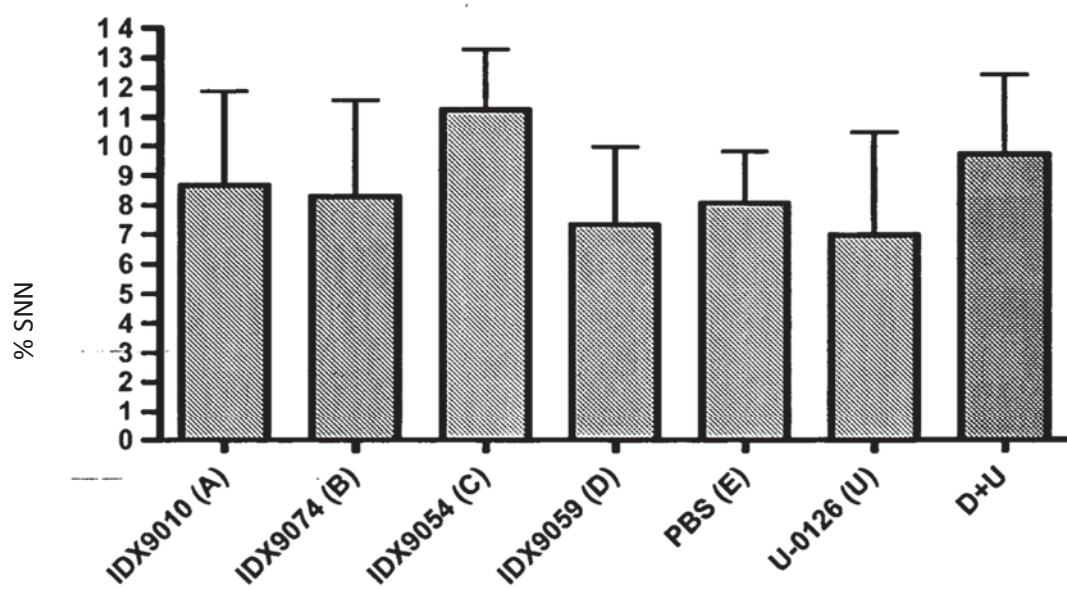


Fig. 4c

57

6/23

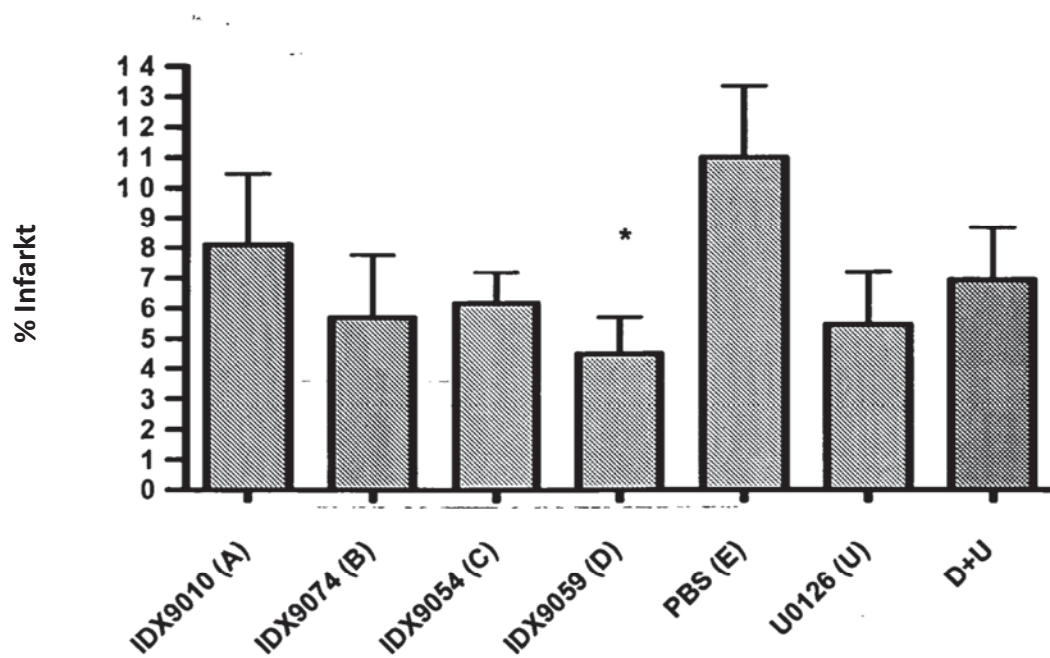


Fig. 4d

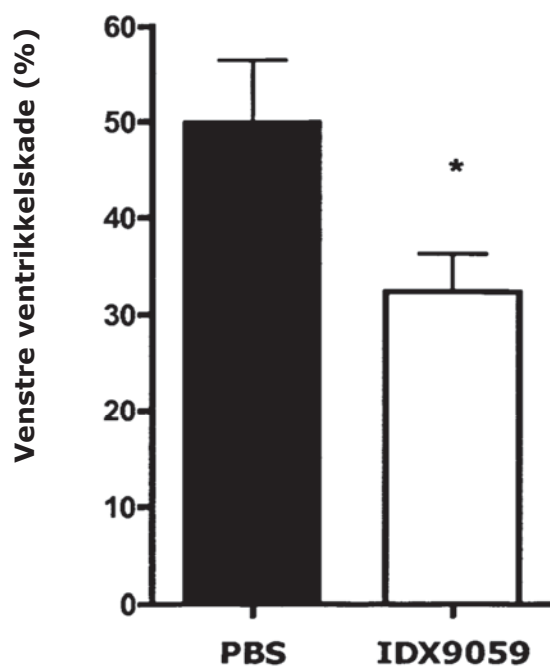
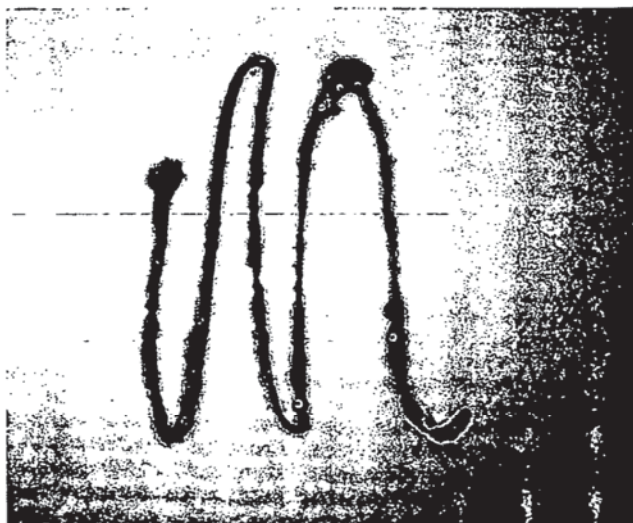
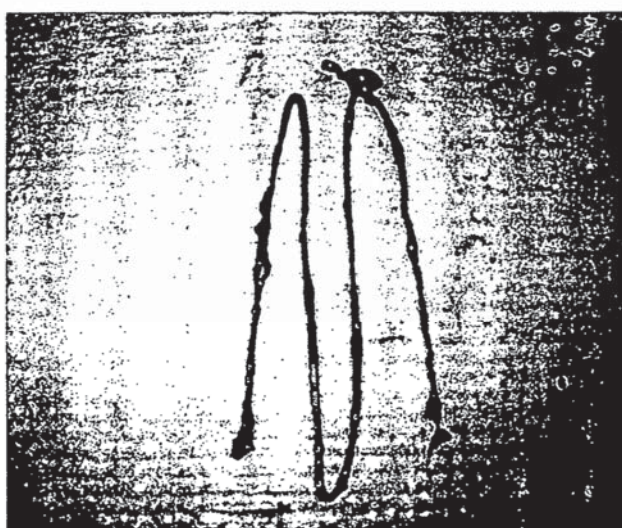


Fig. 5

7/23

**Fig. 6a****Fig. 6b**

8/23

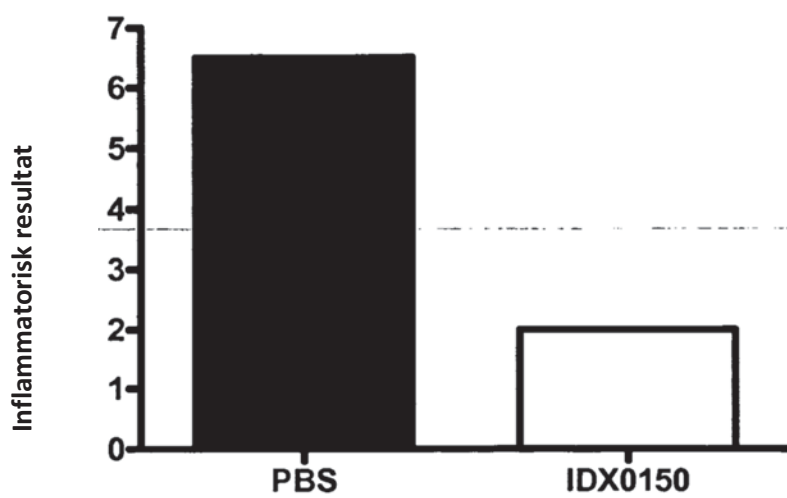


Fig. 6c

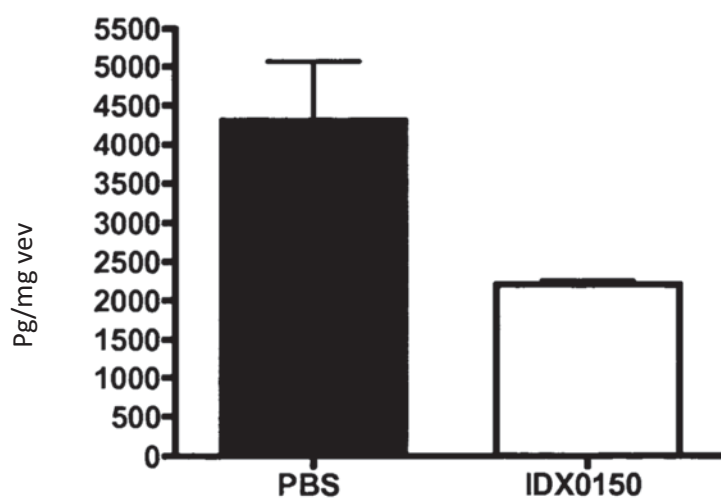


Fig. 6d

9/23

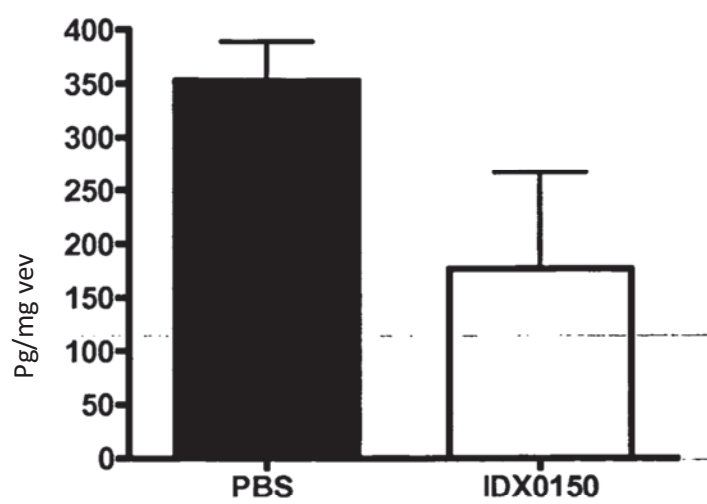


Fig. 6e

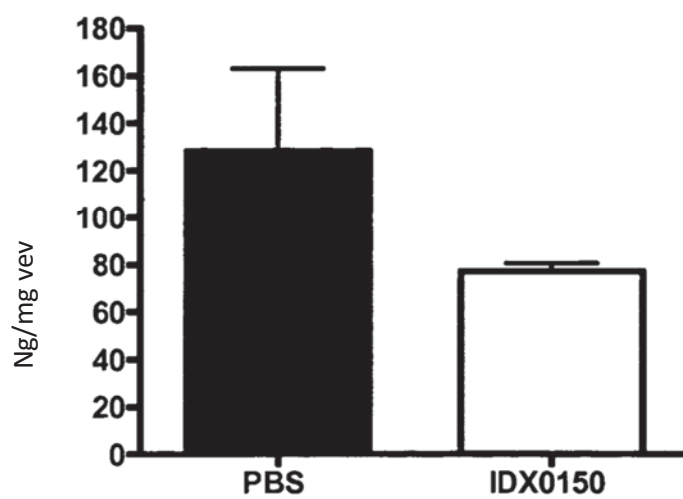


Fig. 6f

10/23

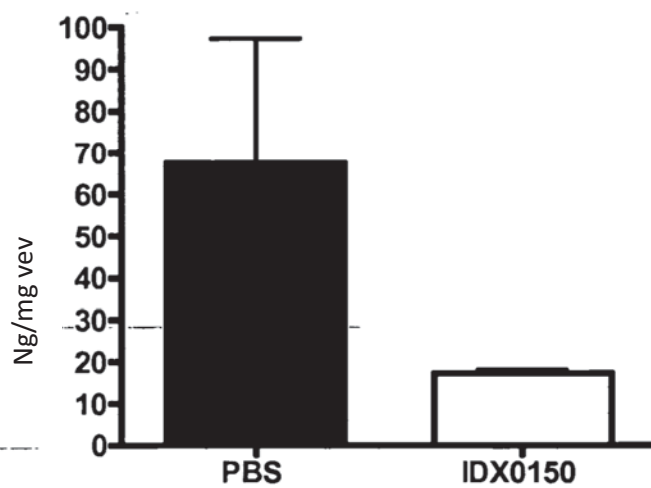


Fig. 6g

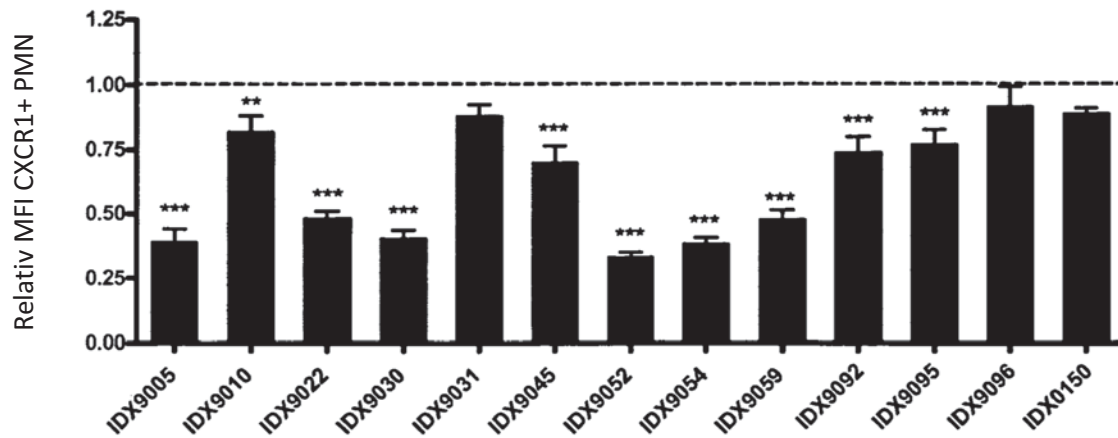


Fig. 7a

11/23

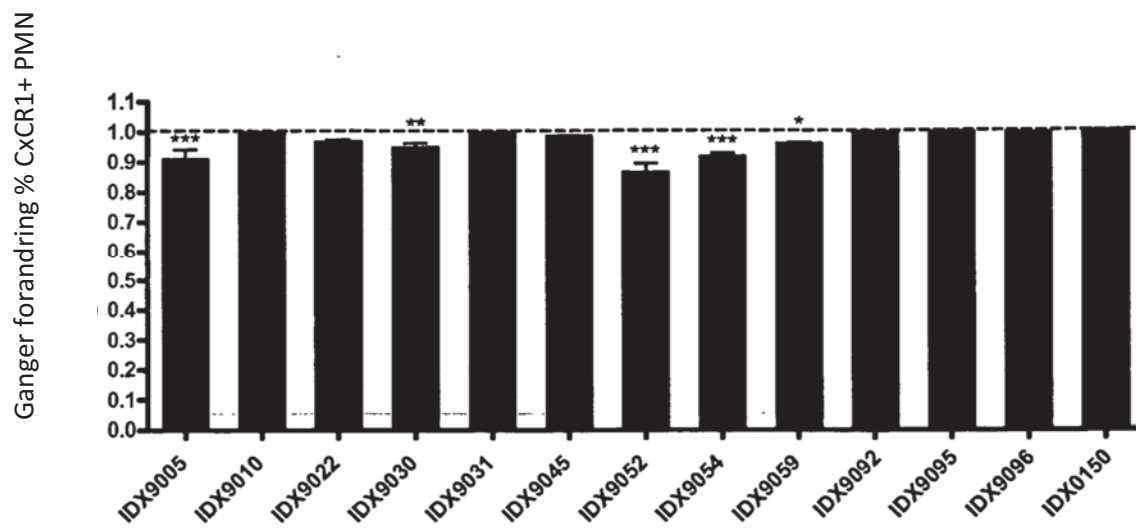


Fig. 7b

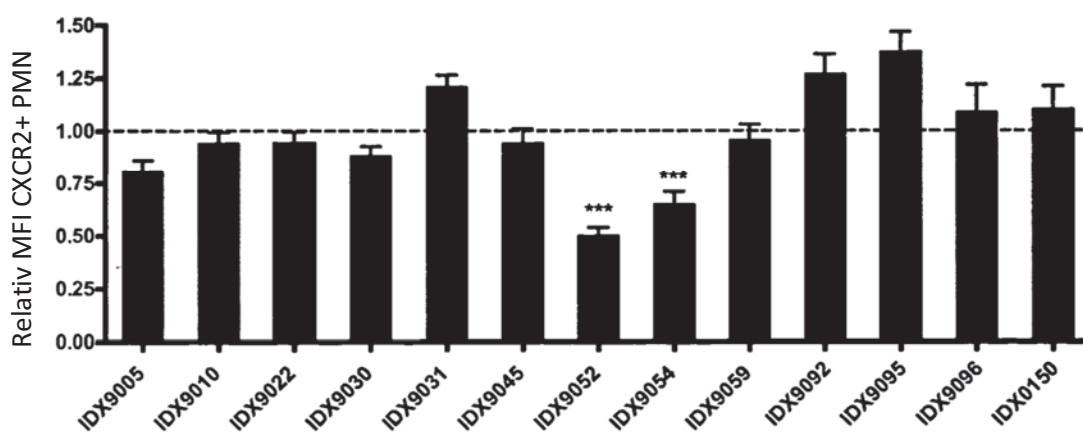


Fig. 7c

12/23

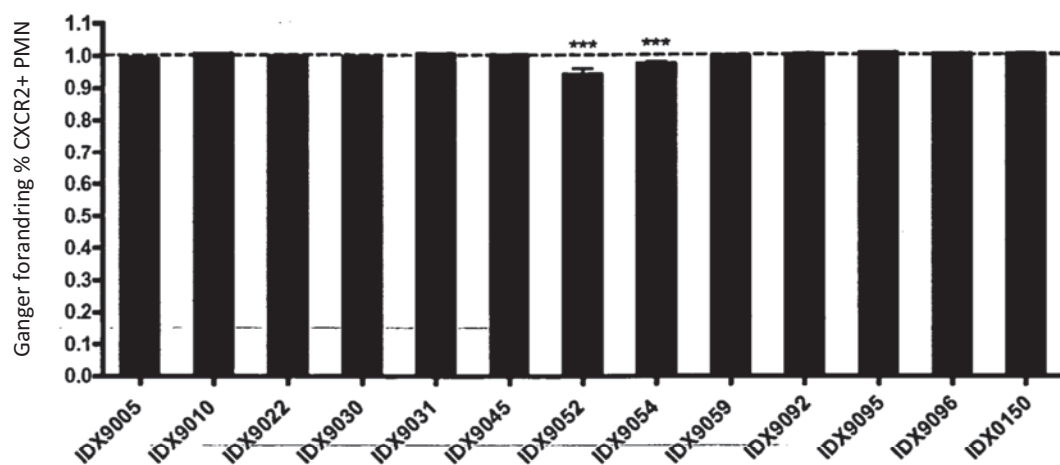


Fig. 7d

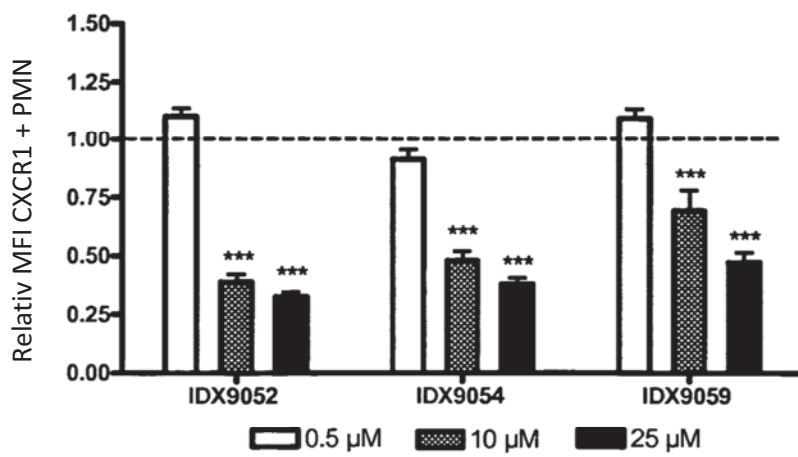


Fig. 7e

13/23

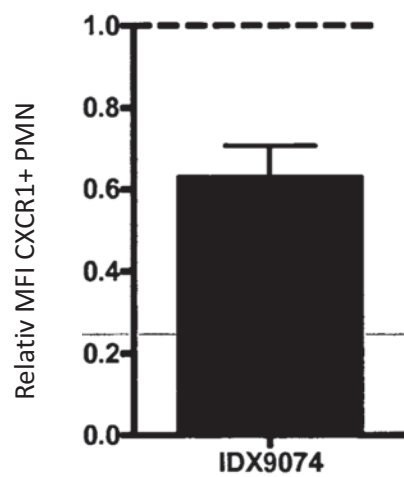


Fig. 7f

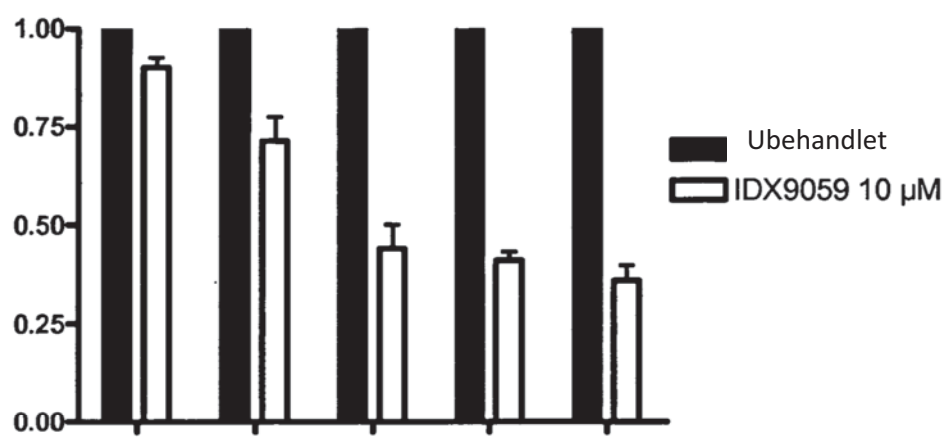


Fig. 7g

14/23

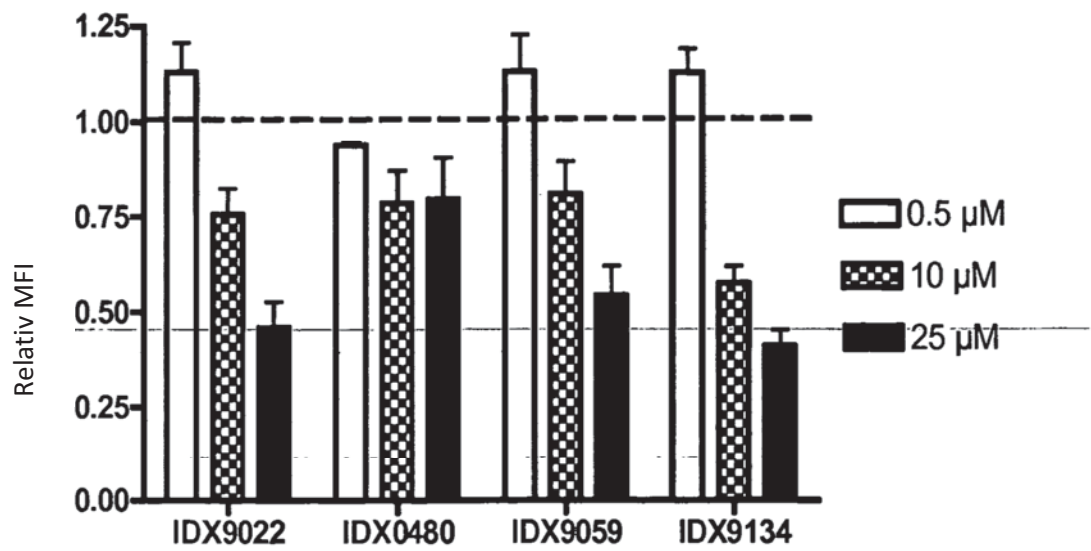


Fig. 7h

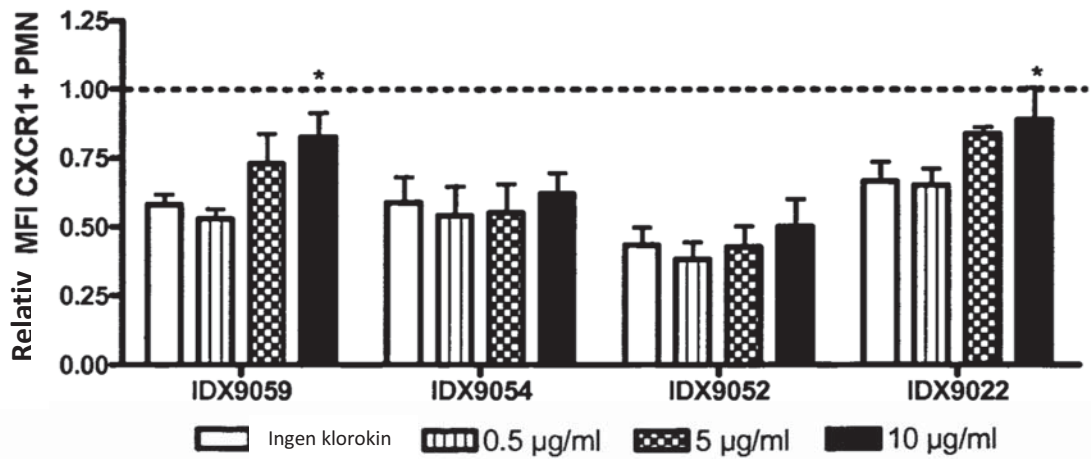


Fig.7i

15/23

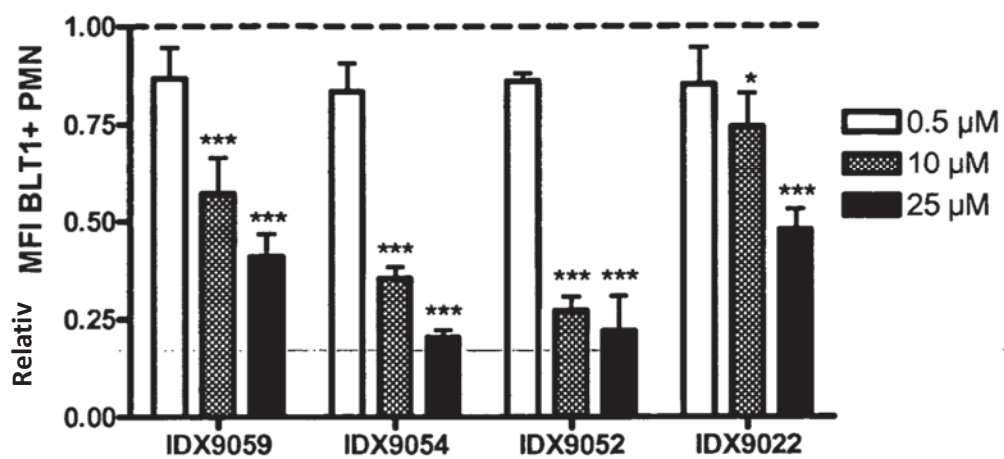


Fig. 7j

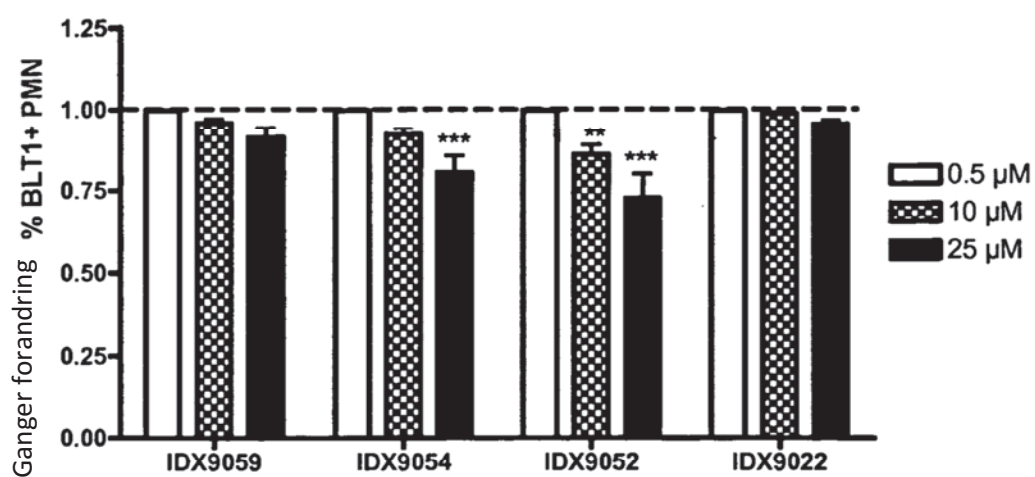
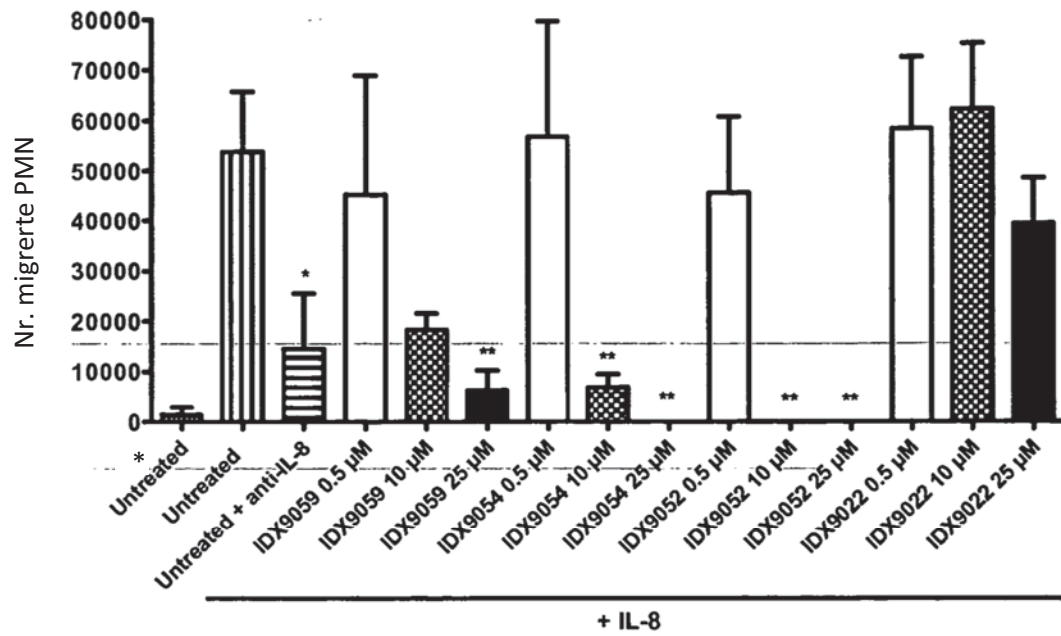


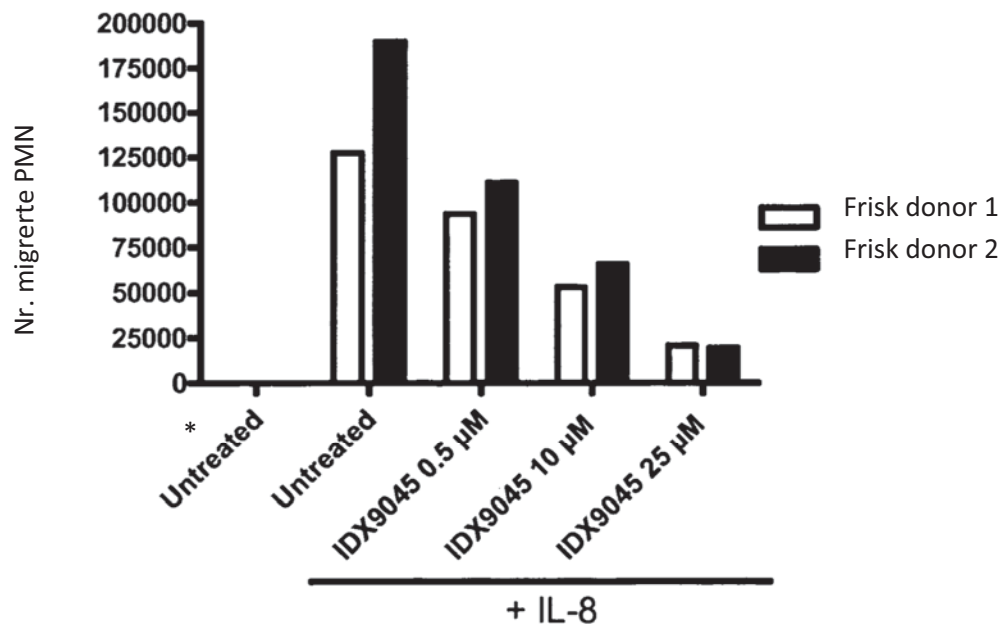
Fig. 7k

16/23



* Ubehandlet

Fig. 7l



* Ubehandlet

Fig. 7m

17/23

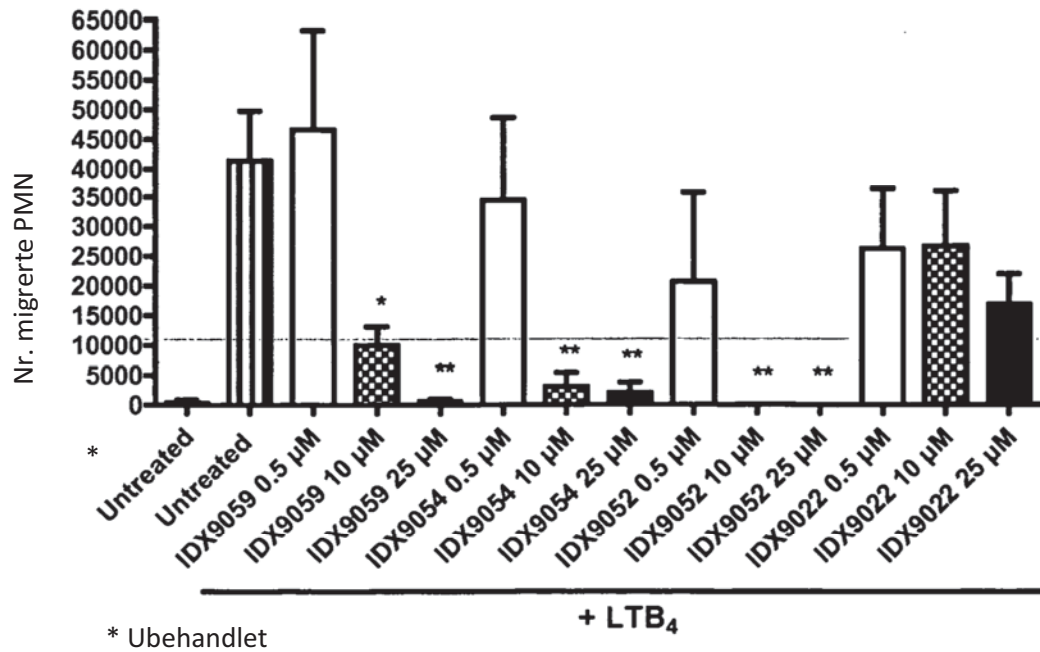


Fig. 7n

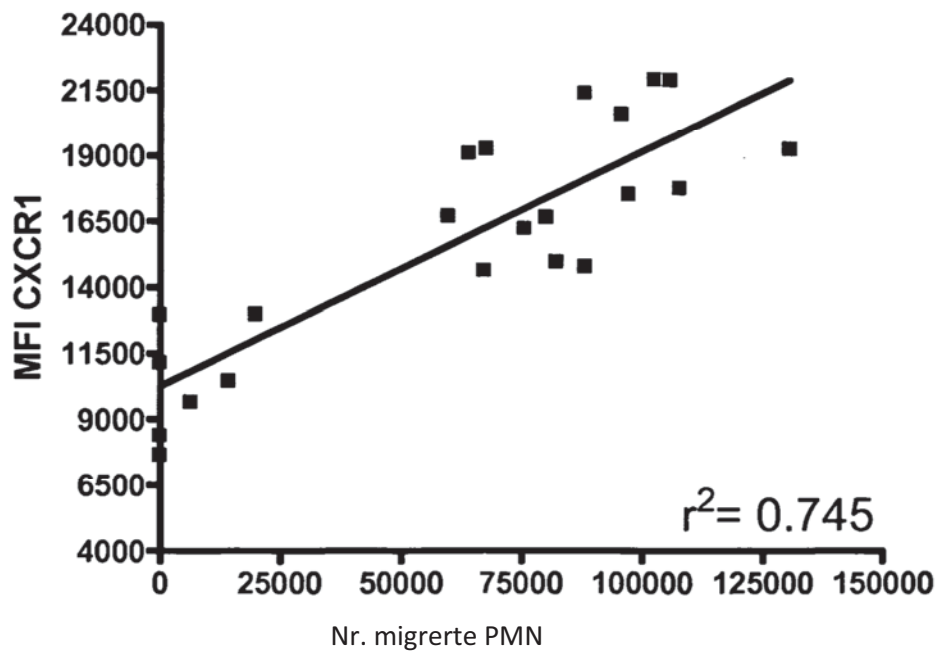


Fig. 7o

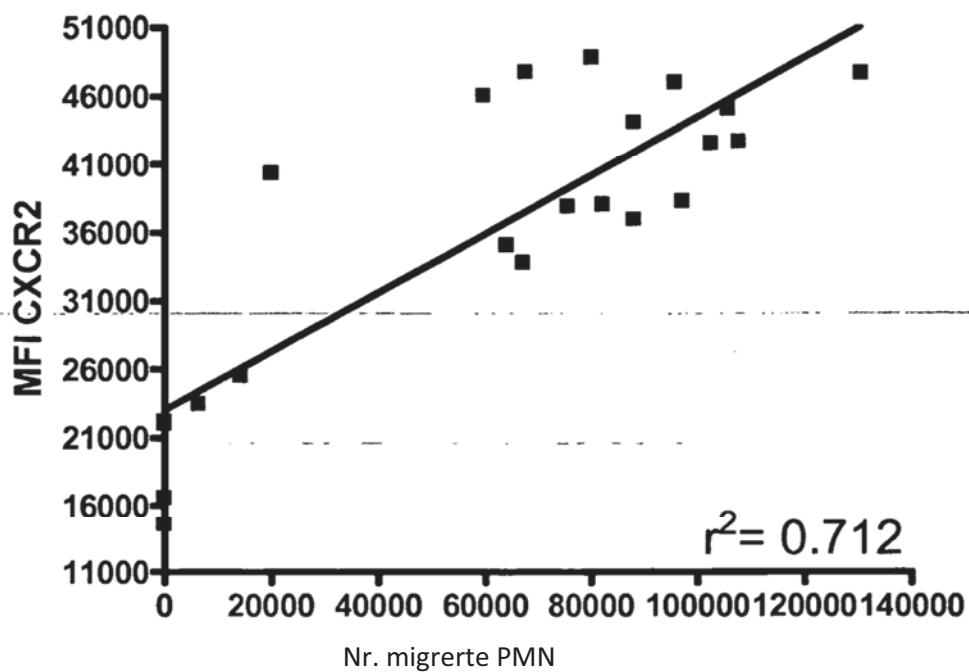


Fig. 7p

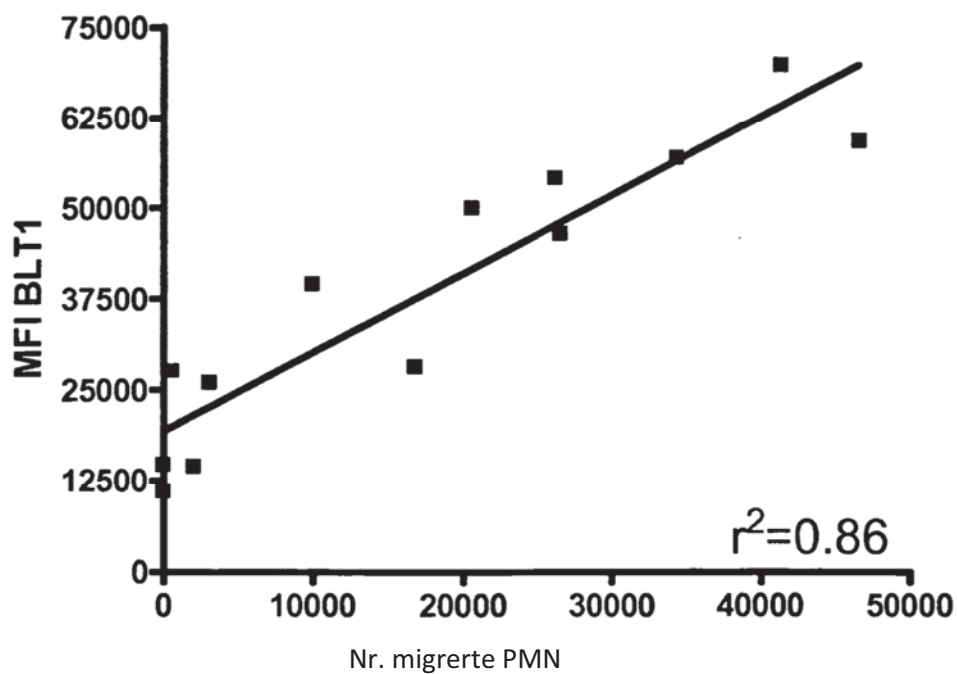


Fig. 7q

19/23

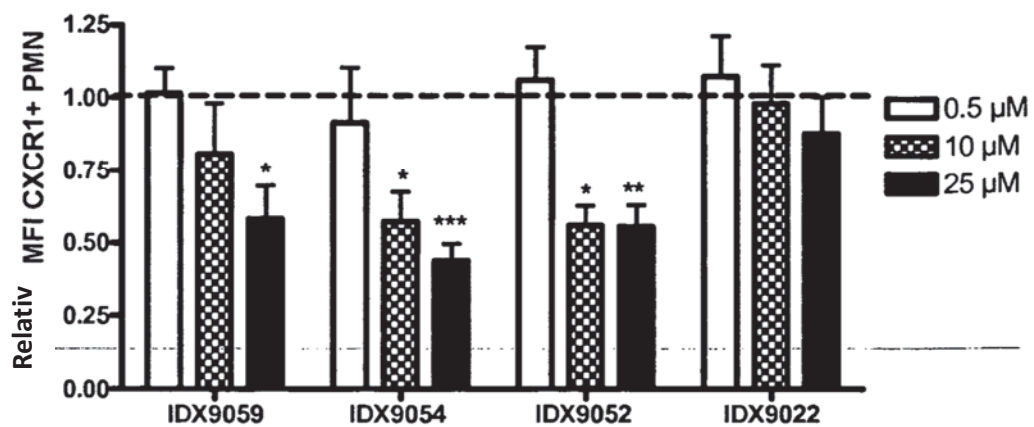


Fig. 8a

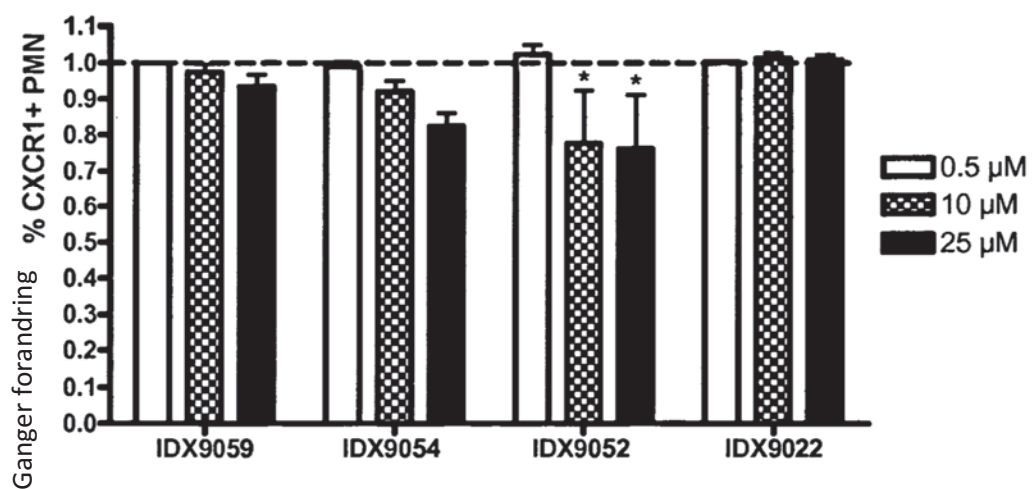


Fig. 8b

20/23

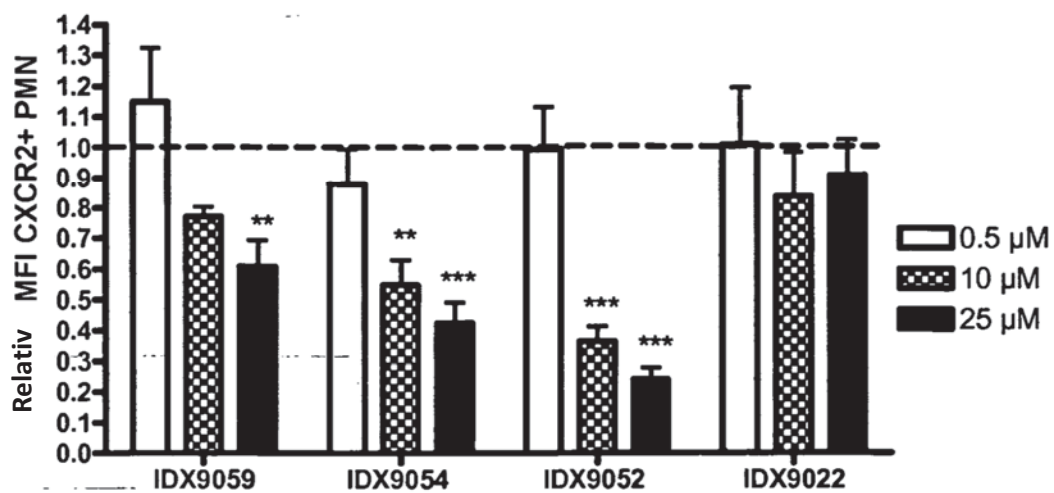


Fig. 8c

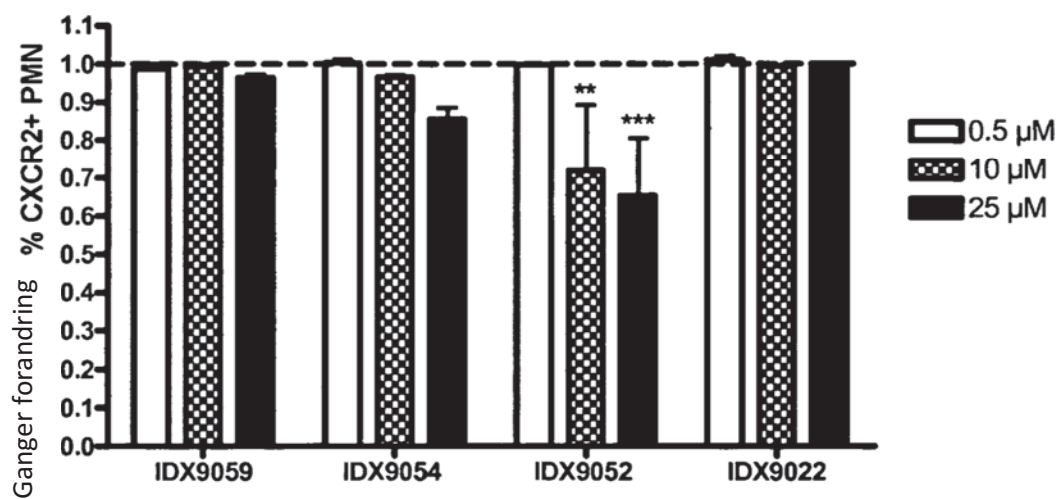


Fig. 8d

21/23

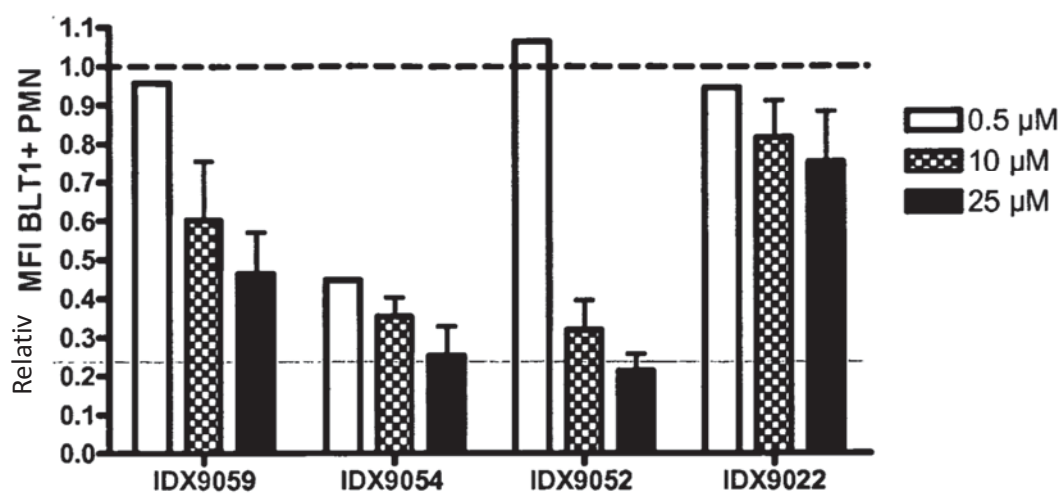


Fig. 8e

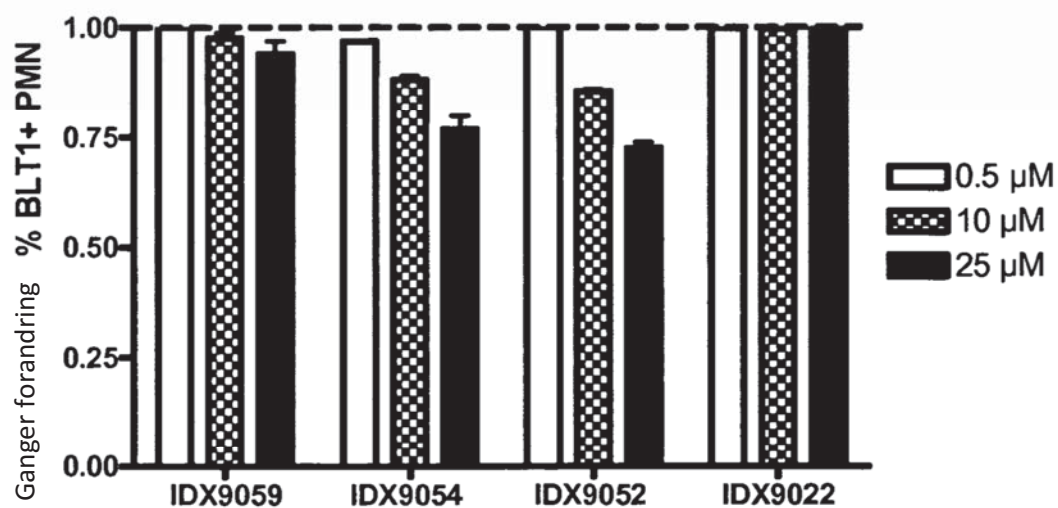


Fig. 8f

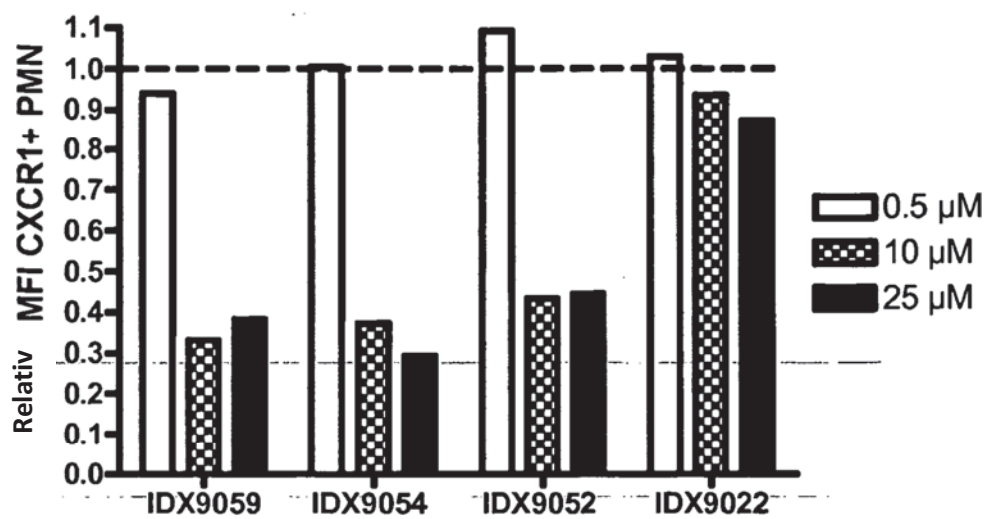


Fig. 8g

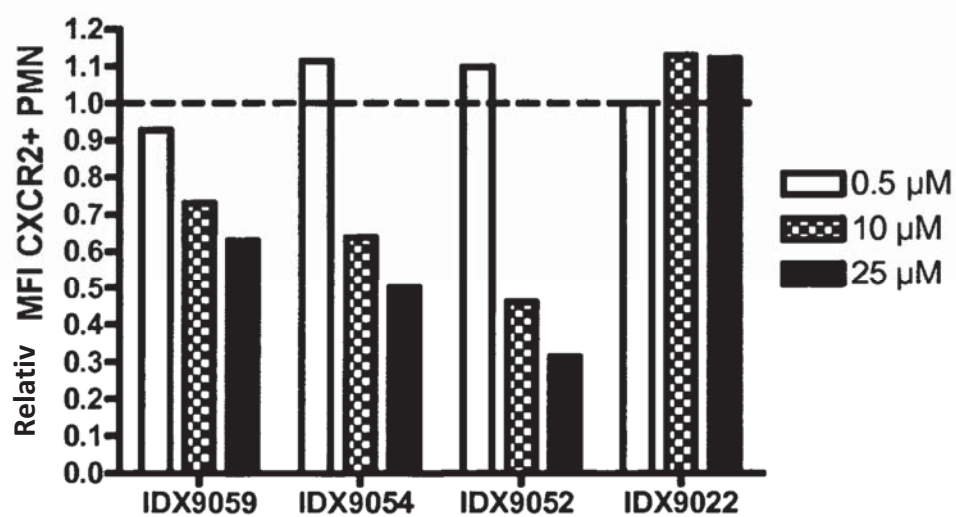


Fig. 8h

23/23

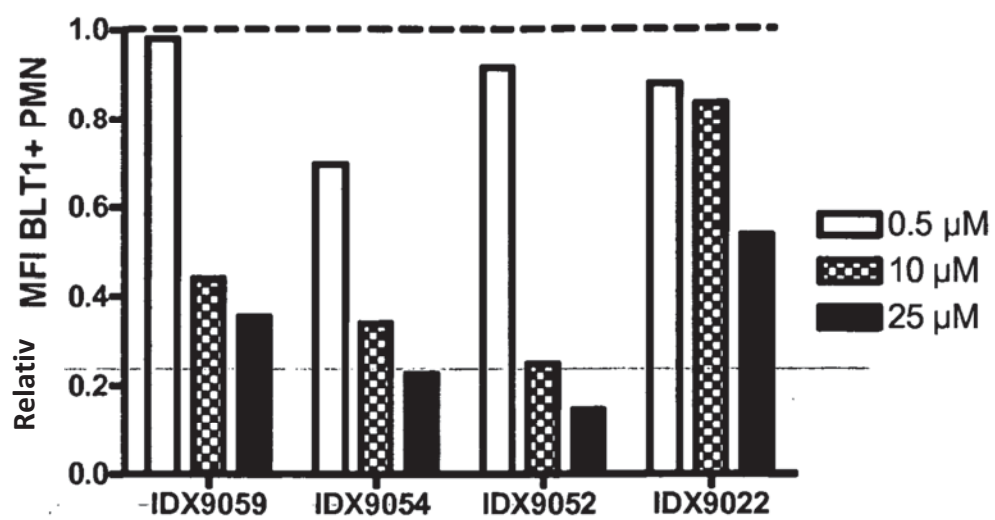


Fig. 8l