



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2503338 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

G01N 33/573 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.05.18
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.12.24
(86)	Europeisk søknadsnr	12002502.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.10.15
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.09.26
(30)	Prioritet	2007.10.24, FI, 20070795
(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 MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(62)	Avdelt fra	EP2201376, med inndato 2008.10.15
(73)	Innehaver	Faron Pharmaceuticals OY, Tykistökatu 6 B, 20520 Turku, FI-Finland
(72)	Oppfinner	Jalkanen, Sirpa, Reuvolantie 79, 20760 Piispanristi, FI-Finland Salmi, Marko, Anniitunkatu 22, 20900 Turku, FI-Finland jalkanen, Markku, Rauvolantie 79, 20760 Piispanristi, FR-Frankrike
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	CD73 som en biomarkør for å overvåke utviklingen av sykdommer og vurdere effektiviten av terapier
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-97/13875 WO-A1-2004/084933 US-A1- 2006 198 821 US-B1- 6 861 225 "OPL121 IFN-beta-treatment augments adenosine production via CD73 (ecto-5'-nucleotidase) upregulation both on cultured endothelial cells in vitro and in multiple sclerosis patients in vivo", JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING CO, AMSTERDAM, NL, vol. 238, 1 January 2005 (2005-01-01), page S77, XP005546120, ISSN: 0022-510X LAURA AIRAS ET AL: "Mechanism of action of IFN-beta in the treatment of multiple sclerosis: a special reference to CD73 and adenosine", NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. ANNALS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 1110, 27 September 2007 (2007-09-27), pages 641-648, XP008131944, ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1196/ANNALS.1423.067 S. LEDOUX ET AL: "Lovastatin Enhances Ecto-5'-Nucleotidase Activity and Cell Surface Expression in Endothelial Cells: Implication of Rho-Family GTPases", CIRCULATION RESEARCH, vol. 90, no. 4, 8 March 2002 (2002-03-08), pages 420-427, XP55051468, ISSN: 0009-7330, DOI: 10.1161/hh0402.105668 A. OSTAPKOWICZ: "Lipid rafts remodeling in estrogen receptor-negative breast cancer is reversed by histone deacetylase inhibitor", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 5, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 238-245, XP55051488, ISSN: 1535-7163, DOI:

10.1158/1535-7163.MCT-05-0226

BESKRIVELSE

OPPFINNELSESOMRÅDE

Den foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelsen av CD73 i vevsfluider som en
5 biomarkør for å vurdere effektiviteten av terapier.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

CD73 er et celleoverflateenzym som har en 5'-ectonukleotidaseaktivitet. Det medierer
således omdannelsen av monofosforylerte purin nukleotider til tilsvarende nukleosider.
10 Defosforylering av AMP til adenosin er f.eks. katalysert ved CD73. CD73 er også til
stede som en oppløselig form i plasmaet, og det oppløselige enzymet har den samme
enzymatiske aktiviteten som den membranbundne formen.

Adenosin er en av de fysiologiske regulatorene for endotelcelle permeabilitet [1, 2], og
15 kan således være involvert i patogenesen av en rekke lidelser slik som akutt
lungeskade, systemisk inflammatorisk respons syndrom, respiratorisk distress syn-
drom, høydesyke. Forandringer i endotel permeabilitet finner også sted ved inflamma-
sjon, ved traumer og ved cancer. CD73 kontrollerer endotel permeabilitet via en
adenosin-mediert mekanisme ved normale tilstander, hypoksi og ventilatorindusert
20 lungeskade [3-7].

CD73 induseres ved bestemte cytokiner. Viktigst er interferon-alfa og -beta blitt
rapportert til å øke ekspresjonen og aktiviteten av CD73 i mennesker (8, WO
2004/084933, 11). Disse cytokiner anvendes også klinisk for å behandle forskjellige
25 sykdommer. Interferon-alfa anvendes f.eks. for å behandle bestemte infeksjoner og
maligniteter, slik som hepatitt og hårcelle leukemi. Interferon-beta anvendes, på den
annen side, i omfattende grad for å dempe inflammasjon ved multippel sklerose. I en
rekke tilfeller ser man imidlertid kun den fordelaktige responsen overfor interferon-
behandling i en subpopulasjon av pasienter, og også de initialt responderende pasient-
30 er kan senere bli motstandsdyktige mot behandlingen. Der er således et behov for å
utvikle lett målbare biomarkører som reflekterer den biologiske responderbarheten
hos kroppen på behandlingen.

Patentpublikasjon WO 2004/084933 og det tilsvarende US 2006/198821 omhandler
35 bruken av cytokiner for å indusere endotel CD73 ekspresjon og for deretter å øke
adenosin nivået i et individ. Anvendelsen av interferon-beta i kombinasjon med
adenosin monofosfat (AMP) i behandling av multiorgan-svikt i rotter er beskrevet.

Patentpublikasjon WO 2007/042602 beskriver anvendelsen av ordinær interferon-beta for behandling eller forebygging av iskemi reperfusjonsskade eller multiorgansvikt.

Publikasjonene OPL 121, "IFN-beta-treatment augments adenosine production via
 5 CD73 (ecto-5'-nucleotidase) upregulation both on cultured endothelial cells in vitro
 and in multiple sclerosis patients in vivo", Journal of Neurological Sciences, Elsevier
 Scientific Publishing co. Amsterdam, vol. 328, 1 January 1995 and Laura Airas et al.,
 Ann.N.Y. Acad.Sci.1110:641-648 (2007) omhandler at interferon-beta administrering
 til pasienter som lider av multippel sklerose fører til en økning av CD73. Bruk av CD73
 10 som en markør for å måle utviklingen av sykdom er imidlertid ikke blitt foreslått.

US 6,861,225 omhandler en fremgangsmåte for å bestemme aktiviteten av 5'-
 nukleotidase i en biologisk prøve.

15 WO 97/13875 omhandler fremgangsmåter for å bestemme utbyttet av cytokinterapi i
 pasienter som lider av kroniske virusinfeksjoner. Kit for anvendelse i
 fremgangsmåtene er også omtalt.

S.Ledoox et al., "Lovastatin enhances Ecto-5'-nucleotidase activity and cell surface
 20 expresssion in endothelial cells: Implication of Rho-Family GPTases", Circ.res.
 2002;90:420-427, omhandler at extracellulær adenosinproduksjon ved GPI-forankret
 ecto-5'-nukleotidase spiller en viktig rolle i det kardiovaskulære systemet i forsvar mot
 hypoksi.

25 A Ostapkowicz et al., Mol Cancer Ther 2006; 5(2), February 2006, s. 238-245
 beskriver at under transisjon til invasiv brystcancer er der en signifikant strukturell
 reorganisering av lipidklynger og underliggende cytoskjelett som reverseres ved histon
 deacetylase inhibering.

30 Statiner, hypolipidemimidler som anvendes for å senke kolesterolnivå, er kjent til å
 indusere CD73 ekspresjon i pasientene.

Der er imidlertid ingen omtale innen den kjente teknikk som vedrører å måle CD73
 protein i serum eller noe annet vevsfluid for anvendelse som en biomarkør for å
 35 overvåke utviklingen av sykdommer eller for å fastslå effektiviteten av terapi.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

Man har vist at måling av oppløselig CD73 aktivitet kan anvendes for å overvåke sykdomsalvorlighet og responderbarhet på terapien. Man mener derfor at analyse av CD73 ekspresjonsnivå eller aktivitet ved en hvilken som helst teknikk kan tilveiebringe verdifull informasjon om forløpet til en sykdom eller behandlingsrespons.

5

Den foreliggende oppfinnelse vedrører således en fremgangsmåte for å vurdere effektiviteten av en cytokinterapi eller en statinterapi i en pasient som lider av en sykdom, hvor CD73 i et vevsfluid som er tatt fra nevnte pasient anvendes som biomarkør, hvor fremgangsmåten gjentas på to eller flere tidspunkter og hvor et
10 endret nivå av CD73 i prøven, sammenlignet med en tidligere analyse, anvendes for å estimere effektiviteten av terapien.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

15

Figur 1. Iskemi-reperfusjonsskaden i tarmen induserer primær og sekundær vevsskade. Den mesenteriske arterie ble okkludert i 30 minutter, og deretter ble den underkastet reperfusjon i 4 timer. Representative mikrokurver fra (A) tarmen og (B) lungene til villtype mus etter liksom(sham)-operasjon (kun laparotomi) og etter induksjon av IR-skaden.

20

Figur 2. Lunge CD73/5'NT aktivitet korrelerer inverst med sykdomsaktiviteten. CD73/5'NT^{-/-} mus og deres villtype (WT) kullinger gjennomgikk liksomoperasjon eller 30 minutter med intestinal iskemi etterfulgt av 240 minutter av reperfusjon (ALI). I ytterligere grupper ble dyr eksponert for ALI forbehandlet med IFN-β. (A) lunge CD73/5'NT aktivitet (gjennomsnitt ±SEM, nmol av AMP hydrolysert ved milligram protein per time) målt fra vevslysater ved TLC. (B) semikvantitative analyser av vaskulær lekkasje (eksudasjon av FITC-konjugert dekstran) i lunger som målt fra histologiske snitt ved å anvende bildeanalyse
25 (% av snittareal som utviser fluorescens over en arbitrært valgt bakgrunnsverdi, gjennomsnitt±SEM). Representative mikrokurver fra de indikerte gruppene er også vist. Bar, 50 μm. * p<0,05, ** p<0,01.

30

Figur 3. CD73/5'NT aktivitet i SIRS pasienter som lider av pankreatitt. Figuren viser CD73/5'NT aktivitet versus alvorlighetsgrad av pankreatitt: 0 = mild pankreatitt; 1 = alvorlig pankreatitt uten organsvikt; 2 = alvorlig pankreatitt med organsvikt; 3 = frisk kontroll.
35

Figur 4. CD73/5'NT aktivitet versus totalt opphold ved intensiv behandlings-enhet (ITU) for pasienter med alle stadier av pankreatitt.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

5

Definisjoner og foretrukne utførelsesformer:

Betegnelsen "pasient" eller "individ" refererer til et menneskeindivid eller til et dyreindivid.

10 Betegnelsen "å overvåke utviklingen av en sykdom" betyr at progresjonen av sykdommen (dvs. forverring av sykdom) eller regresjonen av sykdommen (dvs. en pasients bedring) kan gjennomføres ved å sammenligne et målt nivå av biomarkøren med en kontroll eller med en eller flere tidligere målinger, gjennomført ved forskjellige tidspunkter, av nivået av biomarkøren i den samme pasienten. Et nedsatt nivå av bio-
15 markøren, sammenlignet med resultatet fra en tidligere måling eller med en kontroll kan f.eks. anvendes for å indikere progresjonen av sykdommen, mens et økt nivå av biomarkøren, sammenlignet med resultatet fra en tidligere måling eller med en kontroll anvendes for å indikere regresjonen av sykdommen. Det er imidlertid sannsynligvis bestemte sykdommer som påvirker nivået av biomarkøren på annen måte.

20

Betegnelsen "vevsfluid" skal forstås til å inkludere et hvilket som helst fluid som bader og omgir cellene. Betegnelsen inkluderer f.eks. blodplasma, serum, lymfe, urin, eksudater (pleural, peritoneal) og cerebrospinalvæske.

25 Betegnelsen "inflammatorisk tilstand" er ment å inkludere en hvilken som helst skadelig eller uønsket inflammatorisk respons i et vev i et individ, hvor nevnte inflammatoriske tilstand kan være et resultat av en akutt tilstand slik som vevstraume, en reperfusjonsskade som resulterer fra hjerteinfarkt eller slag, organtransplantasjoner eller en annet kirurgisk inngrep, eller fra en kronisk tilstand som inkluderer allergiske
30 tilstander, autoimmune sykdommer og inflammatoriske sykdommer.

Sykdommene hvis utvikling kan overvåkes ved å anvende CD73 protein i vevsfluid velges typisk fra gruppen som består av

35

- a) vevstraume,
- b) en reperfusjonsskade som resulterer fra hjerteinfarkt eller slag, organtransplantasjoner eller et annet kirurgisk inngrep,

- c) cancer eller cancermetastaser, og
- d) en inflammatorisk tilstand.

Typiske sykdommer som fører til en forandring i pasientens CD73 nivå i vevsfluid, særlig i serum er: vevstraume; reperfusjonsskader som er et resultat av hjerteinfarkt eller slag, organtransplantasjoner eller andre kirurgiske operasjoner; cancer eller cancermetastaser; eller inflammatoriske tilstander som resulterer fra ovennevnte traumer eller reperfusjonsskader eller fra kroniske tilstander som inkluderer allergiske tilstander, autoimmune sykdommer og inflammatoriske sykdommer. Som eksempler på slike kroniske tilstander kan man nevnte artritt, allergiske tilstander slik som astma, inflammatoriske tilstander slik som inflammatorisk tarmsykdom eller en inflammatorisk tilstand i huden, psoriasis, Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom, autoimmune sykdommer, type I eller type II diabetes, arteriosklerose, multipel sklerose, Crohns sykdom eller avstøtningsreaksjoner på grunn av organtransplantasjoner. De inflammatoriske sykdommer systemisk inflammatorisk responsyndrom (SIRS), akutt lungeskade (ALI), multiorgansvikt (MOF), iskemi reperfusjonsskade (IRI) og skadelig legemiddelreaksjon (ADRS) vil særlig føre til endringer av vevsfluid CD73 protein.

Betegnelsen "cytokin" inkluderer et hvilket som helst protein eller peptid anvendt i organismer som signalforbindelser. Denne betegnelse refererer spesielt til et interferon eller et interleukin, men er ikke begrenset dertil. I det tilfellet at cytokinet er et interferon, kan interferonet være alfa-, beta-, gamma-, omega- eller et hvilket som helst annet interferon og det kan være en hvilken som helst subtype av de ovennevnte interferoner. Interferoner anvendes i behandlingen av de ovennevnte sykdommer. Som eksempler på interleukiner kan man nevnte IL-4, IL-10, IL-13 og IL-20.

"Statiner" utgjør en gruppe av hypolipidemimidler som anvendes for å senke kolesterolnivåene i individer, særlig for å redusere risikoen for kardiovaskulære sykdommer. Også inflammatoriske tilstander, demens, cancer, nukleær katarakt og pulmonal hypertensjon kan respondere på behandling med statiner.

Bestemmelse av CD73 protein i en prøve som er tatt fra vevet til et individ kan gjennomføres ved en immundeteksjon ved å kvantifisere nivået av CD73 proteinet i nevnte prøve ved å underkaste prøven for et bindemiddel som gjenkjenner CD73 proteinet, og kvantifisere nevnte bindemiddel.

Alternativt kan deteksjonen gjennomføres ved å detektere aktiviteten av CD73 proteinet i nevnte prøve ved å anvende tynnsjikt-kromatografi eller ved å underkaste nevnte prøve for et CD73 substrat, og overvåke forandringen av nevnte substrat.

- 5 Betegnelsen "bindemiddel" skal forstås til å inkludere antistoffer, som kan være monoklonale eller polyklonale eller genmanipulerte; hvilke som helst antistofffragmenter; aptamerer og affibodies, og et hvilket som helst annet bindemiddel som er i stand til å binde til en epitop på CD73 proteinet. CD73 antistoffer er vel kjent innen teknikken, se f.eks. <http://www.biocompare.com/matrixse/3194/6/67151/CD73.html>.
- 10 Affibodies representerer en ny type av bindemidler, små og særlig stabile proteiner, utviklet av Affibody Ab.

- Bindingsanalysen kan være kompetitiv eller ikke-kompetitiv. Den foretrukne analyse er en sandwich analyse hvor et oppfangingsantistoff (eller annen type av
- 15 bindemiddel) immobilisert til en fast bærer utsettes for prøven som omfatter antigenet, som ved en første epitop binder til oppfangingsantistoffet og tilsetning av et merket antistoff (eller annen type bindemiddel), rettet mot en annen epitop av antigenet. Det merkede antistoffet kvantifiseres enten direkte (homogen analyse) eller etter separasjon av ikke-immobiliserte merkede antistoffer. Markøren kan være en
- 20 radioaktiv isotop, en fluorescerende farge, et enzym eller en annen detekterbar markør.

- For formålet av immunodeteksjon, kan f.eks. et hvilket som helst passende anti-CD73 spesifikt antistoff anvendes for å oppfange oppløselig CD73 fra prøven, og deretter
- 25 kan mengden av bundet protein kvantifiseres ved å anvende en rekke teknikker. En sandwich ELISA kan f.eks. benyttes hvor ett anti-CD73 antistoff er immobilisert til bunnen av multibrønnplater, prøven tilsettes, og bundet CD73 detekteres ved å anvende et annet anti-CD73 antistoff. Anti-CD73 antistoffet detekteres deretter ved å anvende hvilken som helst av de mange teknikker som er egnet for antistoffdeteksjon,
- 30 slik som merkede andre-trinn antistoffer. CD73 spesifisitet for reaksjonen kontrolleres ved å inkludere et irrelevant antistoff som et oppfangningsantistoff eller deteksjonsantistoff og ved å sammenligne signalene mellom disse negative kontroller og anti-CD73 antistoffer.

- 35 Bestemmelse av CD73 aktivitet:

CD73 aktivitet kan måles ved å anvende tynnsjikt-kromatografi i henhold til publiserte protokoller. CD73 aktivitet kan også måles ved å anvende en hvilken som helst enzymatisk analyse som måler omdannelsen av AMP, eller annet purin mononukleotid som kan anvendes som et CD73 substrat, til det tilsvarende nukleosid. Analysen kan f.eks. være basert på omdannelsen av radioaktivt merkede eller fluorescens-merkede substrater. Deteksjonsmetoder kan være avhengig av kvantifiseringen av fallet i en substratkonsentrasjon, eller en økning i produktkonsentrasjonen eller frigivelse av fosfatgruppen. CD73 avhengighet av reaksjonen kan bestemmes ved å gjennomføre analysen i nærvær eller fravær av en kjent CD73 inhibitor, slik som AMPCP.

Passende substrater for CD73 er f.eks. nukleosid-5'-monofosfater som inkluderer adenosin-5'-monofosfat (AMP), inosin-5'-monofosfat (IMP) og lignende. Oppfinnelsen skal nå belyses ved den etterfølgende ikke-begrensede eksperimentelle del.

EKSPERIMENTELL DEL

Materialer og metoder

ALI modell og vaskulær lekkasje

CD73^{-/-} mus, som var tilbakekrysset til C57BL/6 bakgrunn for 8 generasjoner, og C57BL/6 villtype (WT) mus ble anvendt. De mangler CD73 mRNA, protein- og enzymaktivitet [3]. Dyrene ble matchet med hensyn til vekt, kjønn og alder. Alle mus hadde tilgang til standard musefôr og vann inntil forsøket. Musene ble bedøvet med ketaminhydroklorid (100 mg/kg kroppsvekt, i.p.) og xylazin (10 mg/kg kroppsvekt, i.p.). Under bedøvelsen ventilerte musene spontant normal luft. Før operasjon mottok dyrene 1 ml sterilt saltvann subkutan for å kompensere for peroperativt fluidtap. Øvre mesenterialarterie ble dissekert via midtlinje laparotomi og ble okkludert med en mikrovaskulær klemme i 30 minutter. Sham-dyr gjennomgikk øvre mesenterialarterie disseksjon uten vaskulær okklusjon. Såret ble sydd i ett lag. Kroppstemperaturen til dyrene ble opprettholdt gjennom iskemifasen med en varmelampe. Etter iskemi, ble den mikrovaskulære klemmen løsnet, såret ble sydd og dyrene mottok i tillegg 1 ml saltvann subkutan. Etter 235 minutters reperfusjon mottok musene FITC-konjugert dekstran (25 mg/kg kroppsvekt i 0,2 ml sterilt saltvann; molekylvekt 70 000 D, molekylære prober). Mus ble avlivet etter 240 minutters reperfusjon og vevsprøvene ble samlet. 30 minutters iskemi-240 minutters reperfusjonsprotokollen er en etablert

og reproducerbar ALI modell [9]. Protokollen ble godkjent av the Committee on Animal Ethics of Turku University (tillatelse nr 1597/05 til Sirpa Jalkanen).

Effekten av IFN- β på CD73 aktivitet og permeabilitet ble studert ved å anvende pre- og post-behandlingsprotokoller. Subgrupper av mus ble forbehandlet med rekombinant mus IFN- β (6000 IU s.c. en gang daglig i 3 døgn før iskemi). I etterbehandlingsgruppen mottok dyrene en enkel bolus av IFN- β (20 000 IU) intravenøst etter den iskemiske fasen på begynnelsen av reperfusjonsperioden.

Alle musene ble injisert i.v. med FITC-konjugert dekstran (70 kDa) 5 minutter før eutanasi. Vaskulær lekkasje ble bestemt fra tre fargebilder som ble tatt fra lungekryosnitt ved å anvende dataavbildingsanalyse (Image J).

Analyser av CD73 aktivitet

Ecto-5'-nukleotidaseaktivitet ble analysert ved TLC, som beskrevet tidligere [10]. Kort, inneholdt standard enzymanalysen i et sluttvolum på 120 μ l RPMI 1640, lungelysat, 5 mmol/l β -glyserofosfat, og de indikerte konsentrasjoner av AMP med tracer [2- 3 H]AMP (sp. act., 18.6 Ci/mmol; Amersham. Little Chalfont, U.K.). Inkubasjonstider ble valgt for å sikre lineariteten av reaksjonen med tid, slik at mengden av omdannet AMP ikke overskredet 7-10 % av det initialt introduserte substrat. Prøver av blandingen ble påført på Alugram SIL G/UV₂₅₄ TLC ark (Macherey-Nagel, Düren, Tyskland) og separert med isobutanol/isoamylalkohol/2-etoksyetanol/amoniak/H₂O (9:6:18:9:15) som løsningsmiddel. 3 H-merket AMP og dets fosforylerte nukleosidderivater ble visualisert i UV lys og kvantifisert ved å anvende et Wallac-1409 β -spektrometer. CD73 aktivitet ble uttrykt som nM av AMP hydrolysert per milligram av protein per time. Proteinkonsentrasjon i lysatene ble bestemt ved BCA protein analysekit (Pierce, Rockford, IL) i henhold til produsentens instruksjoner.

Statistiske analyser

Ikke-parametrisk enveis ANOVA (Kruskall-Wallis and Mann-Whitney U tests) ble anvendt.

Resultater

CD73 aktivitet korrelerer med sykdomsaktiviteten

Intestinal iskemi-reperfusjon (IR) førte til markert vevsforandring både i tarmen og i lungene (fig. 1). I lungene til de sham-opererte villtypemusene var CD73 aktiviteten

lav (figur 2A). De mikroskopiske analysene av FITC-dekstran i lungene viste at der kun var marginal lekkasje i WT mus som gjennomgikk sham-operasjon (figur 2B).

Når ALI ble indusert til wt dyr, ble CD73 aktiviteten redusert med 25 %. Samtidig økte vaskulær lekkasje signifikant. Forandringer i vaskulær permeabilitet korrelerer direkte med sykdomsalvorligheten, da lekkasjen av intravaskulære fluider til lungeparenkym og ytterligere til alveolene er den viktigste årsaken til ødeleggelse av lungefunksjon og svekket luftbytte.

Som forventet, var CD73 aktiviteten udetekterbar eller ved ekstremt lave nivåer i CD73 manglende mus både etter sham-operasjon og etter intestinal IR. I CD73 manglende mus var lekkasjen i de sham-opererte dyrene lett økt sammenlignet med villtype sham-opererte mus. Særlig når ALI ble indusert viste CD73 manglende mus omtrent 80 % mere lekkasje i lungene enn WT mus fra samme kull ($p=0,03$).

Disse data viser at det er en invers korrelasjon mellom CD73 aktiviteten og vaskulær permeabilitet, som et mål på sykdomsalvorlighet.

CD73 aktivitet korrelerer med behandlingsresponsen

IFN- β behandling i 3 døgn (ved en dose som anvendes klinisk i behandlingen av multippel sklerose) førte til en 230 % økning i CD73 aktivitet i WT lunger under ALI ($p=0,002$, figur 2A). Mest slående ble lekkasjeområdet i WT mus etter introduksjon av ALI redusert med mer enn 90 % etter IFN- β forbehandlingen, sammenlignet med ikke-behandlede mus av samme kull ($p=0,0001$, figur 2B). Den var faktisk ikke forskjellig fra dyr som gjennomgikk kun sham-operasjonen. Slående hadde IFN- β også ingen beskyttende effekter på ALI i CD73 manglende mus. Disse data viser at interferon-beta behandling nedsetter vaskulær lekkasje på en strengt CD73 avhengig måte. Dessuten kan økning i CD73 aktivitet i villtype mus anvendes for å forutsi fordelaktig resultat som svar på IFN- β behandling.

Man testet deretter om IFN- β behandling kunne reversere en allerede etablert kapillærskade. Med dette som formål behandlet man musene med kun IFN- β etter iskemiperioden på tidspunktet for reperfusjon. Særlig den enkelte IFN- β dosen forbedret signifikant i stor grad vaskulær barrierefunksjon i løpet av den etterfølgende 4 timers reperfusjonsperioden. Lekkasjen av FITC dekstran ble redusert med 90 ± 9 % i etterbehandlingsgruppen sammenlignet med kontrollene ($n=8-13$ mus/gruppe, $p<0,001$). Samtidig økte CD73 aktivitet målt fra serumprøver med mer enn 30 % (fra

427 ± 22 i ALI gruppe uten behandling til 561 ± 48 i ALI gruppe behandlet med IFN-β; p=0,04, n=4/gruppe). Således korrelerer induksjonen av CD73 aktivitet positivt med en behandlingsrespons. Dessuten kan måling av CD73 aktivitet i en blodprøve gi anvendbar informasjon om IFN-β responderbarhet.

5

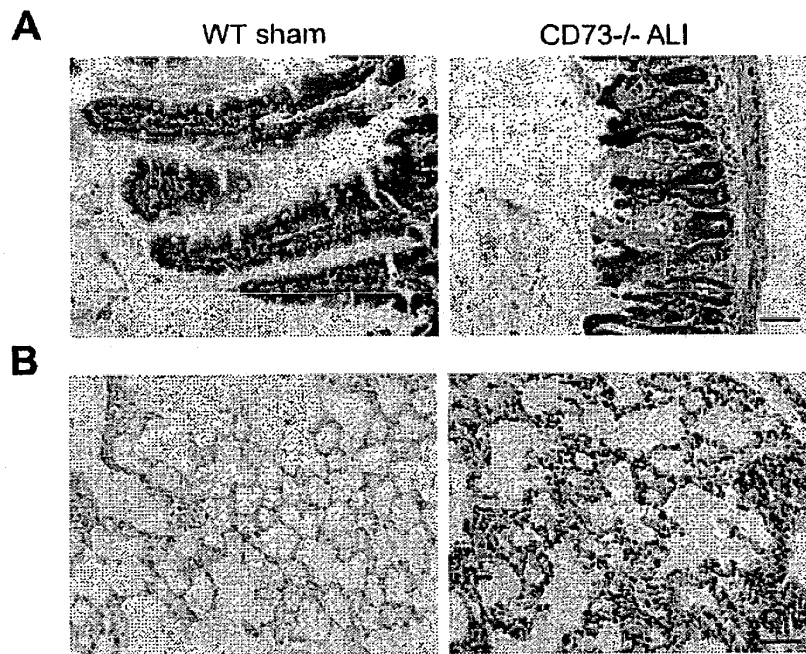
Referanser

- 1 Hasko, G. and Cronstein, B. N., Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 2004. 25: 33-39.
- 10 2 Ohta, A. and Sitkovsky, M., Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001. 414: 916-920.
- 3 Thompson, L. F., Eltzschig, H. K., Ibla, J. C., Van De Wiele, C. J., Resta, R., Morote-Garcia, J. C. and Colgan, S. P., Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* 2004. 200: 1395-1405.
- 15 4 Lennon, P. F., Taylor, C. T., Stahl, G. L. and Colgan, S. P., Neutrophil-derived 5'-adenosine mono-phosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J. Exp. Med.* 1998. 188: 1433-1443.
- 20 5 Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzschig, H. K., Hansen, K. R., Thompson, L. F. and Colgan, S. P., Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 2002. 110: 993-1002.
- 25 6 Henttinen, T., Jalkanen, S. and Yegutkin, G. G., Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2003. 278: 24888-24895.
- 7 Eckle, T., Fullbier, L., Wehrmann, M., Khoury, J., Mittelbronn, M., Ibla, J., Rosenberger, P. and Eltzschig, H. K., Identification of Ectonucleotidases CD39 and CD73 in Innate Protection during Acute Lung Injury. *J. Immunol.* 2007. 178: 8127-8137.
- 30 8 Niemela, J., Henttinen, T., Yegutkin, G. G., Airas, L., Kujari, A. M., Rajala, P. and Jalkanen, S., IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J. Immunol.* 2004. 172:1646-1653.
- 35 9 Ohara, M., Unno, N., Mitsuoka, H., Kaneko, H. and Nakamura, S., Peritoneal lavage with oxygenated perfluorochemical preserves intestinal mucosal barrier function after ischemia-reperfusion and ameliorates lung injury. *Crit. Care Med.* 2001. 29: 782-788.

- 10 Yegutkin, G. G., Henttinen, T. and Jalkanen, S., Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *Faseb J.* 2001. 15: 251-260.
- 11 Airas, L., Niemelä, J., Yegutkin, G. and Jalkanen, S., Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1110: 641-648 (2007).
- 5 12 S. M. Johnson, S. Patel, F. E. Bruckner and D. A. Collins, 5'- Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology*, 1999; 38: 391-396.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for å vurdere effektiviteten av en cytokinterapi eller en statinterapi i en pasient som lider av en sykdom, hvor CD73 i et vevsfluid som er tatt
5 fra pasienten anvendes som biomarkør, hvor fremgangsmåten gjentas på to eller tre tidspunkter og hvor et endret nivå av CD73 i prøven, sammenlignet med en tidligere analyse, anvendes for å estimere effektiviteten av terapien.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor cytokinterapien anvendes for å behandle en
10 sykdom valgt fra gruppen som består av
 - a) vevstraume,
 - b) en reperfusjonsskade som resulterer fra hjerteinfarkt eller slag, organtransplantasjoner eller andre kirurgiske inngrep,
 - c) cancer eller cancermetastaser, og
 - 15 d) en inflammatorisk tilstand.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor statinterapien anvendes for å behandle en sykdom valgt fra gruppen bestående av en kardiovaskulær sykdom, en inflammatorisk tilstand, demens, cancer, nukleær katarakt og pulmonal hypertensjon.

**FIG. 1**

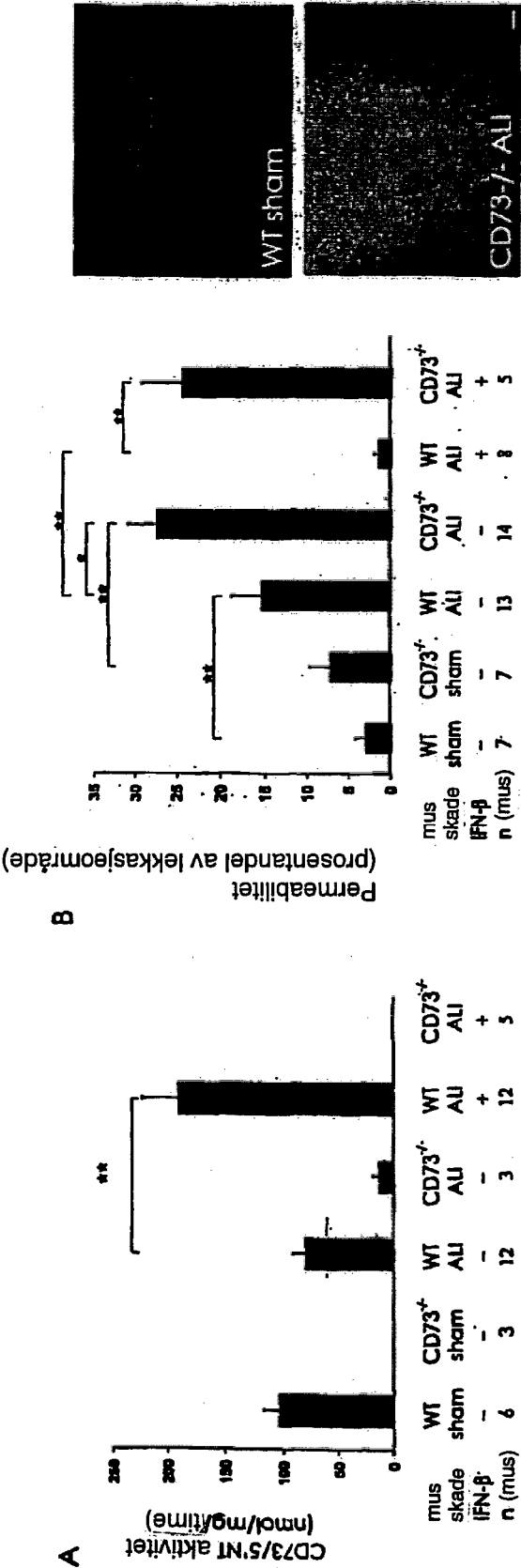


FIG. 2

CD73 aktivitet i SIRS pasienter

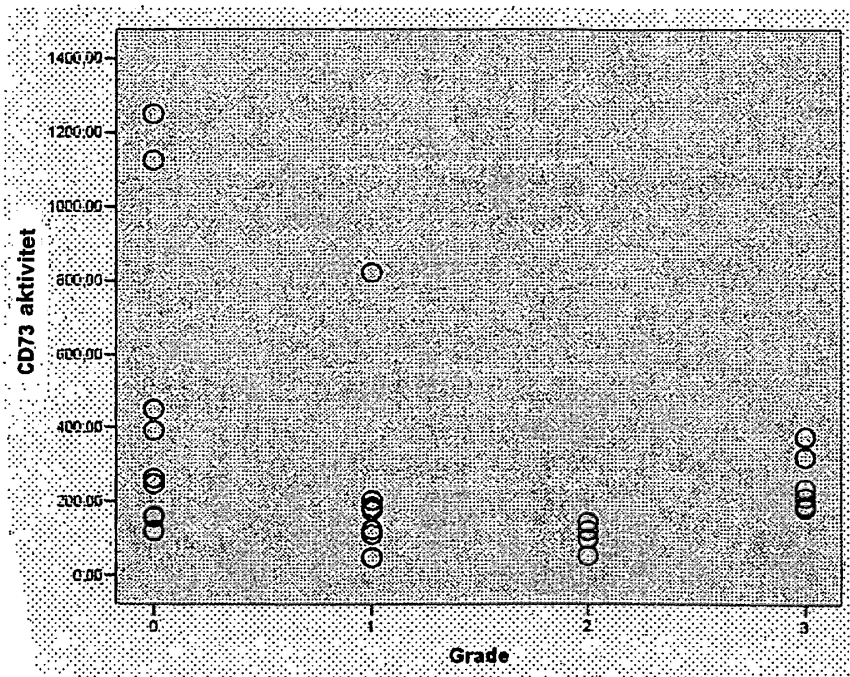


FIG. 3

CD73 aktivitet versus totalt opphold ved ITU (alle stadier)

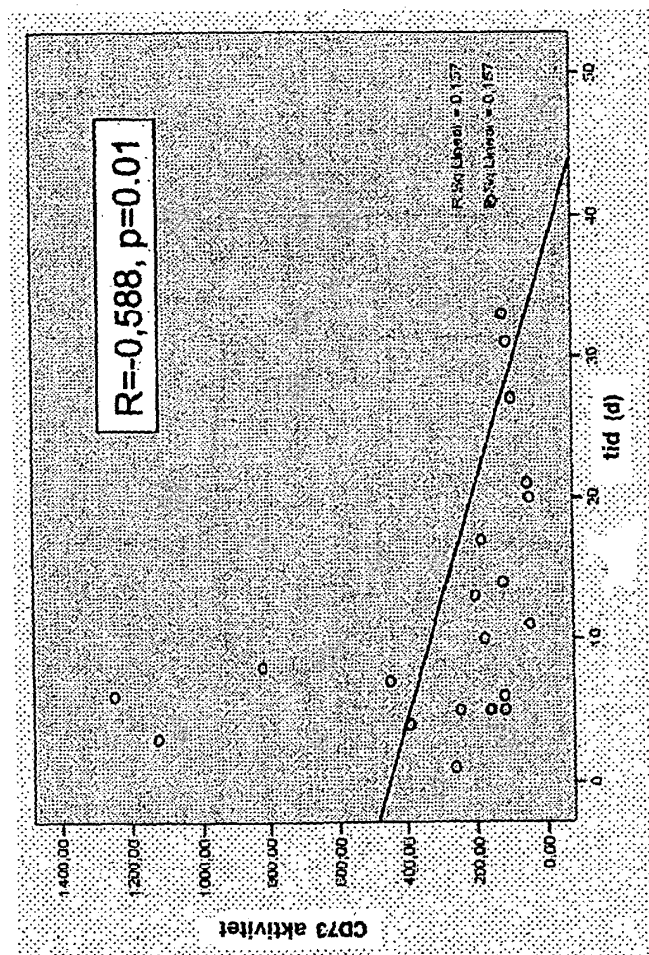


FIG. 4