



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 902**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03793596 .2**
86 Fecha de presentación : **02.09.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1537210**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Inhibición por oligonucleótido señuelo de la expresión de CD40.**

30 Prioridad: **02.09.2002 DE 102 40 417**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Avontec GmbH**
Fraunhofer Strasse 15
82152 Martinsried, DE

72 Inventor/es: **Hecker, Markus y**
Wagner, Andreas, H.

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 266 902 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibición por oligonucleótido señuelo de la expresión de CD40.

5 La presente invención se refiere a oligonucleótidos señuelo con la secuencia de ácido nucleico según la ID SEC N°: 1 a 36 así como a su uso como medicamentos.

10 El trasplante de órganos sólidos representa por lo general la *última ratio* en la terapia de enfermedades, en el que el órgano que se reemplaza en el organismo del receptor está gravemente dañado o bien su función ya no puede cumplirse de forma satisfactoria. Esto es el caso, por ejemplo, del estadio terminal de la insuficiencia cardiaca, pero también en el fallo agudo o crónico de riñón o hígado. Sin embargo, rutinariamente se trasplantan con poca frecuencia además de los órganos citados también páncreas, pulmón e intestino delgado. También es posible un trasplante combinado de varios órganos. Además de los órganos sólidos se trasplantan también la córnea de lo ojos así como células madre hemapoyéticas de la médula ósea.

15 En Alemania se llevaron a cabo en el año 2000 un total de 3130 trasplantes de órganos sólidos (eurotrasplantes), en los que representó como principal problema el rechazo agudo del órgano del donante por parte del organismo del receptor. Esta reacción de rechazo (reacción huésped contra injerto) es tanto más remarcada cuanto menos coincidan las características inmunológicas del donante con las del receptor (falta de compatibilidad histológica). En concreto, da buen resultado en general con suficiente compatibilidad histológica contener la reacción de rechazo mediante medicamentos correspondientes (inmunosupresores), pero el tratamiento de larga duración con estos medicamentos puede provocar fuertes efectos secundarios. De esta forma los pacientes trasplantados desarrollan a consecuencia de su resistencia inmunológica limitada frecuentemente tumores e infecciones; además se refuerza el rechazo crónico de los órganos trasplantados. Esto así como también la degeneración denominada vasculopatía de arterias y arteriolas que suministran al órgano trasplantado se trata de una forma especial acelerada de aterosclerosis (aterosclerosis por trasplante), que conduce sucesivamente mediante una limitación progresiva de la función al fallo del órgano trasplantado. En caso de no ser posible un re-trasplante (por ejemplo, falta de disponibilidad de órgano), el rechazo al trasplante crónico tiene como consecuencia en tanto que irremediable la muerte del paciente en cuestión.

30 Desde el punto de vista inmunológico el rechazo agudo de órganos trasplantados (no confundir con la esencialmente extraña reacción de rechazo hiperaguda, que es mediada por anticuerpos) representa una reacción de hipersensibilidad del tipo IV (tipo de reacción retardada o *hipersensibilidad de tipo retardado*). El antígeno (por lo general antígenos de histocompatibilidad sobre las células del endotelio que revisten los vasos sanguíneos del órgano del donante) es fagocitado por los macrófagos (de tejido), procesado y presentado a células cooperadoras nativas (CD4 positivas); la sensibilización de las células cooperadoras dura varios días. En el segundo contacto las células cooperadoras así sensibilizadas se transforman en células Th1; a este respecto la co-estimulación mediada por el ligando CD154 de las células que presentan antígeno (este expresa el receptor CD40 correspondiente) juega un importante papel, ya que mediante esta ruta de señal se llega a la liberación de interleuquina-12 de los macrófagos. La interleuquina-12 inicia la diferenciación y proliferación de células cooperadoras. Las células Th1 por su parte inducen mediante factores de crecimiento determinados (por ejemplo, *factor de estimulación de colonia de granulocitos-macrófagos*) la formación de monocitos en la médula ósea, reclutan estos con ayuda de quimioquinas determinadas (por ejemplo *factor inhibitorio de migración de macrófago* [MIF]) y los activan mediante la liberación de interferona- γ . La fuerte reacción de inflamación resultante de esto puede destruir el tejido trasplantado en gran extensión. En el rechazo al trasplante participan además células T citotóxicas CD8 positivas, que destruyen sus células diana mediante histólisis y/o inducción de muerte celular programada. Como las células Th1 CD4 positivas son células T citotóxicas tienen la posibilidad de reconocer ya con la presentación de antígeno previa su diana (la superficie celular extraña) y correspondientemente "armarse". A este respecto la co-estimulación mediada por CD40 de CD154 es en todo caso significativa. Los conocimientos más recientes evidencian que posiblemente las células del endotelio del órgano del donante presenten propiedades de presentación del antígeno y co-estimuladoras.

50 En comparación con el rechazo al trasplante, pero en el sentido inverso, la *enfermedad injerto contra huésped* (EICH) se da en el curso de trasplantes alogénos de médula ósea (entre individuos genéticamente no idénticos) en aproximadamente el 40% de los receptores. En la fase aguda de hasta tres meses de duración las células T transmitidas con las células madre del donante atacan al organismo del huésped, la fuerte reacción de inflamación resultante bajo estas circunstancias se manifiesta preferiblemente en la piel, raramente en el tracto gastrointestinal y en el hígado. Entre tanto en estos pacientes se induce igualmente una inmunosupresión con los primeros efectos secundarios potenciales ya descritos. En el comienzo de esta reacción de inflamación participan de nuevo células del endotelio, esta vez las del organismo receptor. Además de la EICH aguda se da también la forma que transcurre crónicamente, que necesita de una inmunosupresión más prolongada.

60 Los inmunosupresores usados para evitar el rechazo al trasplante agudo varían por lo general en función del tipo de órgano o bien son permitidos sólo para la inmunosupresión tras el trasplante de determinados órganos. Una terapia típica para el receptor de un trasplante de corazón la representa la combinación de ciclosporina A con azatioprina y cortisona, en donde recientemente la ciclosporina A se reemplaza de forma creciente con tacrolimus y azatioprina con micofenolatmofetilo. La ciclosporina A, rapamicina y tacrolimus inhiben la activación de células T, la azatioprina y micofenolatmofetilo son antimetabolitos y los corticosteroides actúan antiinflamatoriamente mediante inhibición de la expresión génica. Sin embargo, su efecto terapéutico indiscutida no permite la terapia sistémica durante la vida con estos medicamentos sin causar efectos secundarios graves. En esto se consideran especialmente la mielotoxicidad,

neurotoxicidad, nefrotoxicidad, trastornos del metabolismo hasta la inducción de una diabetes mellitus, hipertono arterial, infecciones y malignoma. También la EICH se trata por lo general con los medicamentos previamente citados, frecuentemente en combinación.

5 Las células que presentan el antígeno y las células T se comunican, entre otros, por el receptor CD40 y el ligando CD154 y esta co-estimulación juega un importante papel en la reacción de inflamación mediada por células Th1 o bien en la activación de células T citotóxicas en el marco del rechazo al trasplante al igual que la EICH. Como las células que presentan el antígeno también las células del endotelio expresan constitutivamente el receptor CD40. La interacción de las células del endotelio con células cooperadoras que expresan CD154 (células cooperadoras nativas y/o células Th1 activadas) da lugar a una expresión de quimioquina y moléculas de adhesión creciente de estas células. A consecuencia de esto se llega a un reclutamiento y activación múltiples de monocitos circulantes, estos emigran a la pared del vaso y se diferencian para dar macrófagos. Además de esto las células del endotelio liberan, al contrario que otras células que presentan antígeno, exclusivamente tras activación de CD40 interleuquina-12 biológicamente activa. La interleuquina-12 es el factor más importante para la diferenciación de células cooperadoras nativas en células Th1 y fomenta la expansión clonal siguiente (proliferación) de las células Th1. La formación reforzada de interferón- γ por las células Th1 diferenciadas no estimula sólo la actividad de los macrófagos infiltrados, sino que refuerza también la expresión de CD40 en las células del endotelio. En lo sucesivo se puede desarrollar un círculo vicioso en el que las células del endotelio, células cooperadoras y macrófagos se estimulen recíprocamente y así se retiene la reacción de inflamación que daña el trasplante (rechazo al trasplante) o al organismo del receptor (EICH).

20 Entre tanto el bloqueo de la co-estimulación mediada por CD154/CD40 representa un fin muy prometedor para el debilitamiento o inhibición del rechazo al trasplante agudo. De este modo hay indicios por experimentos en animales que conducen a que la neutralización apoyada por anticuerpo de CD154 puede producir inmediatamente a continuación del trasplante incluso una inmunotolerancia. Además se ve influenciado favorablemente el rechazo al trasplante crónico (ateroesclerosis por trasplante) mediante esta intervención terapéutica. Una desventaja de esta terapia con anticuerpos consiste, entre otros, en el peligro de reacciones de hipersensibilidad (contra los anticuerpos), sobre todo en aplicación repetida, así como la peor accesibilidad al menos para antígenos presentes en el tejido (por ejemplo, células T emigradas a la pared de los vasos sanguíneos del órgano del donante), ya que los anticuerpos se deben aplicar por lo general en el lado de la sangre y luego se deshacen en la barrera celular del endotelio.

30 Por tanto la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar agentes para una prevención y/o terapia del rechazo al trasplante agudo y crónico, incluyendo la EICH y las consecuencias asociadas a estos en cuanto a movilidad y mortalidad de los pacientes en cuestión. El objetivo se consigue mediante el objeto definido en las reivindicaciones.

35 La invención se aclara más detalladamente mediante las siguientes figuras:

La figura 1 muestra en un diagrama de barras las repercusiones de un señuelo de AP-1 elemento cis (ID SEC N°: 3) y un oligonucleótido de control mutado (mut) sobre la expresión de proteína CD40 basal en células del endotelio humanas en reposo, que se incubaron durante 8 horas con el oligonucleótido correspondiente (10 μ M) (n = 7 a 10, resumen estadístico, referido al % de la expresión basal, *P < 0,05 frente a basal, [†]P < 0,05 frente a señuelo de elemento cis). El análisis por Western Blot representativo muestra las repercusiones (incubación de 4 u 8 horas) de los ácidos nucleicos usados sobre el contenido en proteína CD40 basal en células en reposo. La β -actina (patrón interno) sirve para la comprobación de que se analizaron las mismas cantidades de proteína.

45 La figura 2 muestra en un análisis Western Blot representativo los efectos de señuelos de AP-1 elemento cis seleccionados (ID SEC N°: 3, 5, 11, 13 y 35) y un oligonucleótido de control mutado (mut) sobre la expresión de proteína CD40 basal en células del endotelio humanas en reposo, que se incubaron durante 8 horas con el señuelo de elemento cis correspondiente (10 μ M). Las intensidades relativas (%) dadas, determinadas mediante valoración densitométrica (software One-Dscan-Gel Analysis, Scanalytics, Billerica, MA, Estados Unidos), se refieren al valor máximo del contenido en proteína CD40 en células del endotelio, que no se incubaron con un señuelo de AP-1 elemento cis.

55 La figura 3 muestra en un diagrama de barras y en un análisis por Western Blot representativo con β -actina como patrón interno el efecto del señuelo de AP-1 elemento cis ID SEC N°: 3 en comparación con el efecto fallido de un señuelo de elemento cis NAFT (*factor nuclear de células T activadas*) sobre la expresión de proteína CD40 basal en células del endotelio humanas en reposo, que se incubaron durante 8 horas con el oligonucleótido correspondiente (10 μ M). Resumen estadístico (n = 4, referido al % de la expresión basal, *P < 0,05 frente a basal, [†]P < 0,05 frente a señuelo de AP-1 elemento cis).

60 La figura 4 muestra en un diagrama de líneas el efecto de una exposición prolongada (círculos huecos) o de una pre-incubación en dos etapas (círculos sólidos) con el señuelo de AP-1 elemento cis ID SEC N°: 3 (10 μ M) sobre la expresión de proteína CD40 basal en células del endotelio humanas en reposo durante un periodo de tiempo de 24 horas (n = 3 a 7).

65 La figura 5 muestra en un diagrama de barras y en un análisis por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa) las repercusiones de una pre-incubación (4 horas, 10 μ M) con el señuelo de AP-1 elemento cis ID SEC N°: 3 o de un oligonucleótido de control mutado (mut) sobre la expresión de ARNm de IL-12p40 inducida por ligando CD40 consiguiente (exposición frente a células Jurkat T que expresan el ligando CD40; CD154) en células del

ES 2 266 902 T3

endotelio humanas (n = 3). Análisis por RT-PCR representativo y resumen estadístico (referido al % del valor máximo de la expresión de IL-12-p40 en estimulación con CD154, *P < 0,05 frente a CD154; †P < 0,05 frente a señuelo de AP-1 elemento cis).

5 La figura 6 muestra en un diagrama de barras el efecto del señuelo de AP-1 elemento cis ID SEC N°: 3 en comparación con el oligonucleótido de control (mut) sobre la adhesión de monocitos THP-1 humanos en células del endotelio humanas, que se pre-incubaron durante 8 horas con el oligonucleótido correspondiente (10 μ M) y a continuación se cultivaron durante 12 horas con células del mieloma de ratón transfectadas con CD154 humano (P3xTB.A7, CD154) (resumen estadístico, n = 10 a 13, *P < 0,05 frente a CD154; †P < 0,05 frente a señuelo de AP-1 elemento cis). Se incorporaron células P3xTP.A7 no transfectadas (-CD154) como control negativo. Antes del comienzo de la perfusión de células THP-1 se separaron casi completamente las células del mieloma de las células del endotelio mediante una etapa de lavado con medio.

15 La figura 7 muestra en un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) representativo el efecto de un exceso de 50 veces del señuelo de AP-1 elemento cis seleccionado (ID SEC N°: 3, 5, 11, 13 y 35) en comparación con un oligonucleótido de control mutado (mut) sobre la formación de complejos de ADN-proteína entre un oligonucleótido marcado con 32 P (11 fmol), que se une de forma específica al factor de transcripción AP-1, y una preparación de proteína nuclear de monocitos THP-1 humanos en una mezcla de reacción de 15 μ l.

20 La figura 8 muestra en un EMSA representativo el efecto del señuelo de AP-1 elemento cis seleccionado (ID SEC N°: 3, 5 y 13) y de un oligonucleótido de control mutado (mut) sobre la translocación de AP-1 en el núcleo de células del endotelio humanas, que se incubaron durante 4 horas con el señuelo de AP-1 elemento cis correspondiente (10 μ M). EMSA representativo confirma que la captación celular (y efecto) de los distintos señuelos de elemento cis tiene lugar en células del endotelio humanas. Se obtuvieron resultados comparables en al menos otros dos experimentos independientes.

25 La figura 9 muestra en una RT-PCR representativa las repercusiones de una pre-incubación (4 horas, 10 μ M) con señuelo de AP-1 elemento cis seleccionado (ID SEC N°: 3, 5 y 11) sobre la expresión de MCP-1 (*proteína 1 quimioatrayente de monocitos*) en células del endotelio humanas, que se incubaron durante 6 horas con 60 U/ml de interleuquina-1 β (IL-1 β). Las intensidades relativas (%) dadas de RT-PCR representativa, determinadas mediante valoración densitométrica, se refieren al valor máximo en estimulación de IL-1 β .

30 El dibujo 10 muestra en un diagrama de barras y un análisis por Western Blot representativo el efecto de un señuelo de AP-1 elemento cis (ID SEC N°: 3) y un oligonucleótido de control mutado (mut) sobre la expresión de proteína CD40 basal en segmentos intactos del endotelio aislados de la aorta de rata, que se incubaron en medio de Waymouth. Después de 1 hora de pre-incubación se añadieron los señuelos de elementos cis (10 μ M) al medio de incubación y se incubaron durante 11 horas con los segmentos de vasos (6 a 8 segmentos de 5 animales distintos, resumen estadístico, referido al % de la expresión basal, *P < 0,05 frente a basal; †P < 0,05 frente a señuelo de elemento cis). El análisis por Western Blot representativo muestra a modo de ejemplo que la proteína CD40 en los segmentos de vasos investigados está localizada primordialmente en las células del endotelio y su expresión se puede aumentar claramente mediante la adición de factor de necrosis tumoral α de citoquina (TNF α , 1000 U/ml) e interferona- γ (IFN γ , 100 U/ml) al medio de incubación durante 12 horas. La detección de β -actina (patrón interno) sirve para la comprobación de que se analizaron las mismas cantidades de proteína.

45 El término aquí usado “oligonucleótido señuelo” o “señuelo de elemento cis” designa una molécula de ADN de doble hélice que presenta una secuencia, a la que se une el factor de transcripción AP-1 en las células, y que corresponde o se parece (derivado) a la secuencia de unión al núcleo de AP-1 natural en el genoma. El señuelo de elemento cis actúa por tanto como molécula para la inhibición competitiva (neutralización) de AP-1.

50 Los factores de transcripción son proteínas que se unen a ADN, que se adicionan en el núcleo celular a la región promotora de uno o varios genes y con ello controlan su expresión, es decir, la nueva formación de proteínas que codifican estos genes. Además del control fisiológicamente importante de procesos de desarrollo y diferenciación en el cuerpo humano, los factores de transcripción tienen, sobre todo cuando activan la expresión génica en un momento de tiempo equivocado, un potencial de enfermedad elevado. Adicionalmente los factores de transcripción pueden (en las mismas circunstancias) bloquear genes con función de protección y actúan con predisposición para el desencadenamiento de una enfermedad.

55 Por tanto la presente invención consiste en la preparación de un oligonucleótido señuelo, que se pueda unir de forma específica de la secuencia al *activador o proteína 1 de activación* (AP-1) del factor de transcripción y tenga una de las siguientes secuencias, en donde sólo respectivamente una hélice del oligonucleótido señuelo se repite y está comprendida igualmente la hélice complementaria:

5' -VTGAGTCAS-3' (ID SEC N°: 1), en donde significa V = A, C o G y S = C o G.

5' -STGACTAB-3' (ID SEC N°: 2), en donde significa S = C o G y B = G, C o T

ES 2 266 902 T3

	5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3'	(ID SEC Nº: 3),
	5'-GTGCTGACTCAGCAC-3'	(ID SEC Nº: 5),
	5'-GTGGTGACTCACCAC-3'	(ID SEC Nº: 7),
5	5'-AGTGGTGACTCACCAC-3'	(ID SEC Nº: 9),
	5'-TGTGCTGACTCAGCACA-3'	(ID SEC Nº: 11),
	5'-TTGTGCTGACTCAGCACAA-3'	(ID SEC Nº: 13),
	5'-TGGTGAGTCACCA-3'	(ID SEC Nº: 15),
	5'-ATGGTGAGTCACCAT-3'	(ID SEC Nº: 17),
10	5'-TATGGTGAGTCACCATA-3'	(ID SEC Nº: 19),
	5'-CTATGGTGAGTCACCATAG-3'	(ID SEC Nº: 21),
	5'-CCTATGGTGAGTCACCATAGG-3'	(ID SEC Nº: 23),
	5'-TGTTGAGTCACCA-3'	(ID SEC Nº: 25),
15	5'-GTGTTGAGTCACCAC-3'	(ID SEC Nº: 27),
	5'-TGTGTTGAGTCACCACA-3'	(ID SEC Nº: 29),
	5'-CTGTGTTGAGTCACCACAG-3'	(ID SEC Nº: 31),
	5'-ACTGTGTTGAGTCACCACAGT-3'	(ID SEC Nº: 33),
20	5'-GTCGCTTAGTGACTAAGCGAC-3'	(ID SEC Nº: 35).

Secuencias según ID SEC Nº: 3 a 6, 11 a 14, 35 y 36 se conocen del documento JP 2001095573 como oligonucleótidos de ADN que se unen al factor de transcripción AP-1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades de los vasos.

Los inventores han observado de forma sorprendente que la neutralización del factor de transcripción AP-1 con ayuda de oligonucleótidos señuelo correspondientes en el periodo de unas pocas horas conduce a una caída de la expresión de CD40 en células del endotelio cultivadas humanas (figura 1 a 4) al igual que en células del endotelio nativas de rata (figura 10). Este efecto tuvo lugar tras aproximadamente 4 horas y se mantuvo durante al menos 10 horas (figura 1 y 4). Fue además inesperado y sorprendente que este efecto fuese visible casi simultáneamente y en extensión sensiblemente idéntica sobre el ARNm y plano de la proteína. Los oligonucleótidos señuelo, que van dirigidos contra otros factores de transcripción (por ejemplo, *factor nuclear de células T activadas*, NAFTA), no influyen por el contrario en la expresión de CD40 constitutiva (figura 3) Tampoco los oligonucleótidos de control, que presentan hasta sobre una o dos bases una secuencia idéntica con la secuencia de unión al núcleo de consenso AP-1 (ID SEC Nº: 1 y 2), mostraron este efecto (figura 1 y 2). Además fue suficiente una exposición en dos etapas de las células del endotelio frente al oligonucleótido señuelo de AP-1 para la supresión de la expresión de CD40 (figura 4).

Una consecuencia de la reducción mediada por oligonucleótido señuelo de AP-1 del contenido de proteína CD40 en las células del endotelio fue una inhibición remarcada de la nueva formación inducida por CD154 de interleuquina-12 p40 (figura 5), la etapa que determina la velocidad en la síntesis de interleuquina-12 biológicamente activa (Lienenlücke y col. (2000) Eur. J. Immunol. 30, 2864). También la expresión inducida por CD154 de la *molécula-1 de adhesión celular vascular* (VCAM-1) se redujo en una extensión comparable (inhibición del 58%), y en concordancia con ello la adhesión reforzada inducida por CD154 (y en primer lugar mediada por VCAM-1) de monocitos THP-1 en las células del endotelio (figura 6).

El AP-1 (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess33?request=FCT-DBRTRV-Accno&key=T00029>) pertenece al grupo que comprende cerca de 46 componentes de los denominados factores de transcripción región básica con cremallera de leucina o bZIP. Por lo general el factor de transcripción activo consiste en un homodímero Jun/Jun o un heterodímero Jun/Fos. Tanto el Fos (número de acceso al banco de genes V01512) como también Jun (número de acceso al banco de genes J04111) deben ser fosforilados para ello en el marco de la activación celular sobre proteinquinasas correspondientes, en donde la activación de estas quinasas Fos o Jun depende de nuevo de la actividad de la otra, de modo que la ruta de transducción de señal depende de otras proteinquinasas dispuestas por encima (por ejemplo proteinquinasa C o *proteinquinasa activada por estrés*, SEK-1). El AP-1 juega, en general junto con otros factores de transcripción, un importante papel en la expresión de una multiplicidad de genes de importancia inmunológica como, por ejemplo, interleuquina-2, interleuquina-4, interleuquina-8, interferona- γ , MCP-1, MIF y factor de necrosis tumoral α . Un bloqueo de la actividad de AP-1 puede por tanto interferir, por ejemplo, con la estimulación autocrina dependiente de la interleuquina-2 de células T y su expansión clonal.

Para no generar debilitamiento general de la defensa inmune específica (celular o humoral), se aplica el oligonucleótido señuelo de acuerdo con la invención preferiblemente no de forma sistémica sino local. El tratamiento *ex vivo* de un órgano de donante o de una donación de médula ósea antes del trasplante representa indicaciones preferidas.

A este respecto es de especial importancia que los oligonucleótidos señuelo de acuerdo con la invención lleguen a ser activos inmediatamente tras la captación en las células diana, a la vez que la actividad de los oligonucleótidos antisentido o de interferencia con ARN sea dependiente en primer lugar de la generación de la proteína en las células y con ello de su re-síntesis.

ES 2 266 902 T3

Si se usa un oligonucleótido señuelo de acuerdo con la invención contra AP-1 en células del endotelio humanas, entonces se reduce la expresión de CD40, en contraposición al uso de un oligonucleótido señuelo de control correspondiente, claramente en más del 50%. Además una exclusión de la actividad de AP-1 tiene como consecuencia una inhibición altamente significativa de la expresión estimulada de CD154 de interleuquina-12 p40 o VCAM-1. Esto conduce a un debilitamiento claro de la interacción entre células del endotelio-células T o células del endotelio-monocitos pero también de la interacción de células T con otras células que presentan antígeno (por ejemplo, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) en el marco del rechazo al trasplante o ElCh).

Estos efectos de un oligonucleótido señuelo contra AP-1 (ID SEC N°: 3) se podrían comprobar inequívocamente en un modelo de rechazo al trasplante agudo (trasplante de corazón heterótopo en ratas). El oligonucleótido de control mutado correspondiente (ID SEC N°: 47) no mostró por el contrario efecto terapéutico alguno y por tanto tampoco la especificidad de este preparado terapéutico. Aún más impresionante y en esta medida inesperado fue la inhibición en más del 60% del rechazo al trasplante crónico en el mismo modelo experimental en animales mediante exposición breve de las arterias coronarias del trasplantado al señuelo de AP-1 elemento cis previamente al implante.

Entre tanto el uso de los oligonucleótidos de ADN de doble hélice de acuerdo con la invención, también denominado oligonucleótido señuelo o señuelo de elemento cis, que contienen un sitio de unión del núcleo de consenso para AP-1, representa el procedimiento preferido para la inhibición específica de la actividad de AP-1. La incorporación exógena de un gran número de sitios de unión del factor de transcripción a una célula, especialmente en mucho mayor número que el disponible en el genoma, genera una situación en la que la multiplicidad de un factor de transcripción determinado se une de forma específica al señuelo de elemento cis respectivo y no a sus sitios de unión diana endógenos. Este hecho para la inhibición de la unión de factores de transcripción en sus sitios de unión endógenos se designa también como silenciamiento. El silenciamiento (o también neutralización) de factores de transcripción con uso de señuelos de elementos cis se usó con éxito para inhibir el crecimiento de células. A este respecto se usaron fragmentos de ADN que contenían los sitios de unión específicos para el factor de transcripción E2F (Morishita y col., PNAS (1995) 92, 5855).

La secuencia de un ácido nucleico que se usa para evitar la unión del factor de transcripción AP-1 es por ejemplo la secuencia a la que se une el AP-1 de forma natural en las células. El AP-1 se une de forma específica al motivo con la secuencia 5'-VTGAGTCAS-3' (ID SEC N°: 1) en la que significa V = A, C o G y S = C o G. Para una unión efectiva de AP-1 se requiere la coincidencia exacta con esta secuencia, en donde la hélice complementaria 5'-STGACTCAB-3' (ID SEC N°: 2) con S = C o G y B = G, C o T puede unirse igualmente de forma eficiente al factor de transcripción. El señuelo de elemento cis puede ser además mayor que la secuencia de unión del núcleo 9-mer y se alargan en los extremos 5' y/o en los extremos 3'. Mutaciones correspondientes en la zona de la secuencia de unión al núcleo (por ejemplo, 5'-VTGACTCAA-3' o 5'-VTTACTTAG-3') conducen a una pérdida parcial o completa de la unión de VP-1 al oligonucleótido señuelo (figura 7).

Además de esto una secuencia sensiblemente palindrómica favorece a las dos hélices de ADN el transporte a las células diana sin ayuda. Sin tener en cuenta la hipótesis fundamental de que los oligonucleótidos señuelo de acuerdo con la invención neutralizan el factor de transcripción AP-1 de forma efectiva *in vitro*, es decisivo para la actividad terapéutica que la molécula de ADN sea captada rápidamente y en una extensión suficiente en las células diana. Esto se demuestra mediante la neutralización distintamente efectiva de AP-1 por los mismos oligonucleótidos señuelo en un sistema libre de células (figura 7) en comparación con células intactas (figura 8) o su efecto sobre la expresión génica en estas células (inhibición de la expresión estimulada con IL-1 β de MCP-1; figura 9). Además de lo anterior el señuelo de elemento cis de acuerdo con la invención no supera una determinada longitud, ya que esto es limitante para el transporte a las células diana. Es adecuado que cada oligonucleótido señuelo tenga una longitud de al menos 9 pb (secuencia de consenso de unión al núcleo) hasta una longitud de aproximadamente 45 pb, preferiblemente hasta una longitud de aproximadamente 27 pares de bases, con especial preferencia hasta una longitud de aproximadamente 23, con especial preferencia una longitud de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 pares de bases.

Debido a que el señuelo de elemento cis es un ácido nucleico de doble hélice, el oligonucleótido de ADN de acuerdo con la invención comprende respectivamente no sólo la secuencia en sentido o hacia adelante sino también la secuencia anti-sentido o inversa complementaria. Los oligonucleótidos de ADN de acuerdo con la invención preferidos presentan una secuencia de unión al núcleo de 9-mero para AP-1, como está contenida en la ID SEC N°: 1. El señuelo de elemento cis puede presentar sin embargo también una secuencia discrepante con la secuencia previa y que sea más larga que un 9-mero. Son especialmente preferidas las secuencias como las que están contenidas en ID SEC N°: 3 a ID SEC N°: 36. Esta enumeración de las secuencias preferidas no es definitiva. Es manifiesto para el especialista en la técnica que se pueden usar una multiplicidad de secuencias como inhibidor para AP-1, en tanto estas presenten las condiciones previamente indicadas de la secuencia de unión al núcleo de consenso de 9-mero y una afinidad con AP-1.

La afinidad de la unión de una secuencia de ácido nucleico a AP-1 se puede determinar mediante el uso del ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) (Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Krzesz y col. (1999) FEBS Lett. 453, 191). Este sistema de ensayo es adecuado para el control de calidad de ácidos nucleicos, que se plantean para el uso en el procedimiento de la presente invención, o las determinaciones de la longitud óptima de un sitio de unión. Esto es también adecuado para la identificación de otras secuencias que se une mediante AP-1.

ES 2 266 902 T3

El procedimiento de la presente invención modula la transcripción de un gen o de genes en una forma tal que el gen o los genes, por ejemplo CD40, no se expresan o lo hacen de forma reducida. La expresión reducida o restringida en el marco de la presente invención significa que la velocidad de transcripción es reducida en comparación con células que son tratadas con un oligonucleótido señuelo de acuerdo con la invención. Una reducción de este tipo se puede determinar, por ejemplo, mediante Northern Blot (Sambrook y col., 1989) o RT-PCR (Sambrook y col., 1989). De forma típica una reducción de este tipo es una reducción de al menos 2 veces, especialmente de al menos 5 veces, especialmente de al menos 10 veces.

La pérdida de activación se puede conseguir, por ejemplo, si AP-1 actúa en un gen determinado como activador de transcripción y por tal motivo el silenciamiento del activador conduce a la pérdida de la expresión del gen diana. Sin embargo es también igualmente posible una inhibición indirecta mediante modulación del ARNm (efecto post-transcripcional) o de la estabilidad de la proteína (efecto post-traducciona) del gen diana. En este caso la neutralización de AP-1 tendría como consecuencia, por ejemplo, una expresión reducida de proteínas, que evita la descomposición del ARNm del gen diana mediante ARNasas y/o la degradación proteolítica de la proteína diana. Un efecto de este tipo parece ser que toma parte en el efecto descrito del señuelo de AP-1 elemento cis sobre la expresión de CD40 en las células del endotelio humanas.

Los oligonucleótidos se descomponen por lo general rápidamente mediante endo- o exonucleasas, en las ADNasas y ARNasas especiales en las células. Por este motivo los oligonucleótidos de ADN se pueden modificar para estabilizarlos contra la descomposición, de modo que durante un periodo de tiempo prolongado se conserva una elevada concentración de oligonucleótidos en las células. De forma típica se puede obtener una estabilización de este tipo mediante la inclusión de uno o varios enlaces internucleótido modificadas.

Un oligonucleótido de ADN estabilizado con éxito no contiene de forma necesaria una modificación en cada enlace internucleótido. Preferiblemente los enlaces internucleótidos están modificadas en los extremos respectivos de ambos oligonucleótidos del señuelo de elemento cis. A este respecto pueden estar modificados los últimos seis, cinco, cuatro, tres, dos o el última o uno o varios enlaces internucleótido dentro de los últimos seis enlaces internucleótido. Además se pueden incorporar distintas modificaciones de los enlaces internucleótido en el ácido nucleico y los oligonucleótidos señuelo generados de estas se ensayan en cuanto a la unión específica de secuencia en AP-1, con uso de la rutina sistema de ensayo EMSA. Este sistema de ensayo permite la determinación de la constante de unión del señuelo de elemento cis y de este modo la determinación de si cambió la afinidad con la modificación. Los señuelos de elementos cis modificados que muestran una unión suficiente se pueden seleccionar de forma que una unión suficiente significa al menos aproximadamente el 50% o al menos aproximadamente el 75%, y con especial preferencia aproximadamente el 100% de la unión del ácido nucleico no modificado.

Los señuelos de elementos cis con enlace internucleótido modificado que muestran todavía suficiente unión, se puede comprobar si son más estables en las células que señuelos de elementos cis no modificados. Las células "transfectadas" con los señuelos de elemento cis de acuerdo con la invención se estudian en distintos momentos en cuanto a la cantidad de señuelos de elementos cis aún presentes. A este respecto se usa a continuación preferiblemente un señuelo de elemento cis marcado con un colorante de fluorescencia (por ejemplo, rojo texas) o un señuelo de elemento cis marcado radiactivamente (por ejemplo, ^{32}P o ^{35}S) con microscopía de fluorescencia digital o autorradiografía o escintigrafía. Un señuelo de elemento cis modificado con éxito tiene un semiperiodo de vida en las células que es mayor que el del señuelo de elemento cis no modificado, preferiblemente de al menos aproximadamente 48 horas, más preferiblemente de al menos aproximadamente 4 días, los más preferiblemente de al menos aproximadamente 7 días.

Se resumen enlaces internucleótido modificados adecuados en Uhlmann y Peyman ((1990) Chem. Rev. 90, 544). Restos de internucleótido-fosfato modificados y/o puentes no fósforo en un ácido nucleico, que se pueden usar en un procedimiento de la presente invención, contienen por ejemplo fosfonato de metilo, tioato de fósforo, ditioato de fósforo, amidato de fósforo, éster fosfato, mientras que los análogos de internucleótido no fósforo contienen, por ejemplo, puentes de siloxano, puentes de carbonato, puentes de éster carboximético, puentes de acetamidato y/o puentes de tioéter. En el uso de enlaces internucleótido modificados con tioato de fósforo estos no deberían encontrarse preferiblemente entre las bases citosina y guanina, ya que esto puede llevar a una activación de las células diana del señuelo de elemento cis.

Una forma de realización adicional de la invención es la estabilización de ácido nucleicos mediante la introducción de características estructurales en el ácido nucleico, que aumentan el semiperiodo de vida del ácido nucleico. Tales estructuras, que contienen ADN en horquilla y de campana, se dan a conocer en el documento US 5.683.985. Al mismo tiempo se pueden incorporar restos de internucleótido-fosfato modificados y/o puentes no fósforo, junto con las estructuras citadas. Los ácidos nucleicos resultantes de estos se pueden ensayar en el sistema de ensayo descrito anteriormente en cuanto a la unión y estabilidad.

Un señuelo de elemento cis de la presente invención es captado rápidamente en las células. Una captación suficiente se caracteriza por la modulación de la expresión de uno o varios genes, que se someten a un control mediante AP-1, (por ejemplo CD40). El señuelo de elemento cis de la presente invención modula de forma preferida la transcripción de un gen o genes tras aproximadamente 4 horas del contacto con las células, más preferiblemente tras aproximadamente 2 horas, tras aproximadamente 1 hora, tras aproximadamente 30 minutos y lo más preferiblemente tras aproximadamente 10 minutos. Una mezcla típica que se usa este estudio contiene 10 $\mu\text{mol/l}$ de señuelo de elemento cis.

La presente invención se refiere además al uso del oligonucleótido señuelo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento, especialmente para la prevención y/o terapia del rechazo de trasplante agudo y crónico, de la *enfermedad injerto contra huésped* (EICH) así como de los daños por isquemia/reperfusión de órganos en una intervención quirúrgica.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la modulación de la transcripción de al menos un gen en células, especialmente en células del endotelio y células que presentan antígeno (monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B), en donde el procedimiento comprende la etapa de poner en contacto las células citadas con una mezcla, que contiene uno o varios ácido(s) nucleico(s) de doble hélice de acuerdo con la invención, que se pueden unir de forma específica a la secuencia al factor de transcripción AP-1. Un procedimiento preferido es, por ejemplo, el tratamiento *ex vivo* de un órgano de donante antes de introducirlo en el cuerpo del receptor, de modo que la mezcla que contiene ácido nucleico se aplique a los vasos sanguíneos del órgano del donante (ortógrado o retrógrado).

La mezcla que contiene el señuelo de elemento cis de acuerdo con la invención se pone en contacto con las células diana (por ejemplo, células del endotelio, células de epitelio, leucocitos, células del músculo liso, queratinocitos o fibroblastos). La finalidad de esta puesta en contacto es la transferencia de los señuelos de elemento cis, que se unen al AP-1, en las células diana (es decir, por ejemplo, las células que expresan CD40 dependiendo de AP-1). Por este motivo se pueden usar la modificación del ácido nucleico y/o aditivos o coadyuvantes, como es conocido, de modo que aumente la penetración de membranas, en el marco de la presente invención (Uhlmann y Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 544).

Una mezcla según la invención contiene en una forma de realización preferida esencialmente sólo ácido nucleico y tampón. Una concentración adecuada del señuelo de elemento cis se encuentra en el intervalo de al menos 0,1 a 100 μM , preferiblemente en 10 μM , en donde se añaden uno o varios tampones adecuados. Un ejemplo de un tampón de este tipo es una solución de Ringer modificada que contiene 145 mmol/l de Na^+ , 5 mmol/l de K^+ , 50 mmol/l de Cl^- , 2 mmol/l de Ca^{2+} , 1 mmol/l de Mg^{2+} , 10 mmol/l de Hepes, 106 mmol/l de isetionato, 10 mmol/l de D-glucosa, pH 7,4.

En una forma de realización adicional de la invención la mezcla contiene además al menos un aditivo y/o coadyuvante. Se proponen aditivos y coadyuvantes como lípidos, lípidos catiónicos, polímeros, liposomas, nanopartículas, aptámeros de ácido nucleico, péptidos y proteínas, que están unidos a ADN, o moléculas de péptido-ADN sintéticas, para aumentar por ejemplo el aporte de ácidos nucleicos en las células, para enriquecer la mezcla en sólo un subgrupo de células, para evitar la descomposición del ácido nucleico en las células, para facilitar el almacenamiento de la mezcla de ácido nucleico antes del uso. Ejemplos de péptidos y proteínas o moléculas de péptido-ADN sintéticas son, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ligandos, moléculas de adhesión, que puede estar modificadas o no modificadas.

Aditivos que estabilizan los señuelos de elementos cis en las células son, por ejemplo, sustancias que condensan ácido nucleico como polímeros catiónicos, poli-L-lisina o poli-etilenimina.

La mezcla que se usa en el procedimiento de la presente invención se aplica preferiblemente localmente mediante inyección, infusión, catéter, geles plurónicos, polímeros, que liberan los medicamentos retenidos, o cualquier otro dispositivo que haga posible el acceso local. También la aplicación *ex vivo* de la mezcla (infusión o incubación), usada en el procedimiento de la presente invención, permite un acceso local.

Las siguientes figuras y ejemplos sirven sólo para la aclaración y no limitan el alcance de la invención en modo alguno.

1. Cultivo celular

Se aíslan células del endotelio humanas mediante tratamiento con 1,6 U/ml de dispasa en solución de tiroides modificada con Hepes durante 30 minutos a 37°C de las venas del cordón umbilical y se cultivan sobre placas de cultivo de tejido de 6 pocillos recubiertos de gelatina (2 mg/ml de gelatina en HCl 0,1 M durante 30 minutos a temperatura ambiente) en 1,5 ml de medio M199 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Alemania), que contiene suero bovino fetal al 20%, 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina, 10 U/ml de nistatina, HEPES 5 mM y TES 5 mM, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de heparina y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de factor de crecimiento del endotelio. Estas se identificaron por su morfología de adoquín típica, coloración inmune positiva para la detección por factor de Willebrandt (vWF) y fluorométrica (FACS) de PECAM-1 (CD13) así como coloración inmune negativa para α -actina del músculo liso (Krzysz y col. (1999) FEBS Lett. 453, 191).

La línea celular de monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB 202), la línea celular Jurkat humana D1.1 (ATCC CRL-10915) así como la línea celular del mieloma de ratón P3xTB.A7 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies), que contiene suero bovino fetal al 10%, 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina y 10 U/ml de nistatina.

ES 2 266 902 T3

2. Análisis por RT-PCR

El ARN completo del endotelio se aisló con el kit Qiagen RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), a continuación de esto se llevó a cabo una ADNc-sintasa con un máximo de 3 µg de ARN y 200 U de transcriptasa inversa Superscript™ II (Life Technologies) en un volumen total de 20 µl en correspondencia a las indicaciones del fabricante. Para el equilibrio de la carga en ADNc se usaron 5 µl (aproximadamente 75 ng de ADNc) de la solución de ADNc resultante y el par cebador (Gibco) para el factor-1 de elongación (F-1)-PCR con 1 U de Taq ADN-polimerasa (Gibco) en un volumen total de 50 µl. El EF-1 sirvió como patrón interno para la PCR. Los productos de PCR se separaron sobre geles de agarosa al 1,5% que contienen bromuro de etidio al 0,1% y se determinó la intensidad de las bandas densitométricamente con un sistema de cámara CCD y el software One-Dscan Gelanalyse de Scanalytics (Billerica, MA, Estados Unidos), para ajustar en los análisis por PCR siguientes el volumen de ADNc.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo individualmente para cada par cebador en un termociclo Hybaid OmnE (AWG, Heidelberg, Alemania). Las condiciones de PCR individuales para el ADNc de células del endotelio humanas fueron como siguen: CD40 (tamaño del producto 381 pb, 25 ciclos, temperatura del material dispuesto 60° C, (cebador directo) 5'-CAGAGTTCCTGAAACGGAATGCC-3' (ID SEC N°: 37), (cebador inverso) 5'-TGCCTGCCTGTTGCACAACC-3' (ID SEC N°: 38); EF-1 (tamaño del producto 220 pb, 22 ciclos, temperatura del material dispuesto 55° C, (cebador directo) 5'-TCTTAATCAGTGGTGGAAAG-3' (ID SEC N°: 39), (cebador inverso) 5'-TTTGGTCAAGTTGTTTCC-3' (ID SEC N°: 40); IL-12p40 (tamaño del producto 281 pb, 30 ciclos, temperatura del material dispuesto 62° C, (cebador directo) 5'-GTACTCCACATTCCTACTTCTC-3' (ID SEC N°: 41), (cebador inverso) 5'-TTTGGGTCTATTCGTTGTGTC-3' (ID SEC N°: 42); MCP-1 (tamaño del producto 330 pb, 22 ciclos, temperatura del material dispuesto 63° C, (cebador directo) 5'-GCGGATCCCCTCCAGCATGAAAGTCTCT-3' (ID SEC N°: 43), (cebador inverso) 5'-ACGAATTCTTCTTGGGTTGTGGAGTGAG-3' (ID SEC N°: 44); VCAM-1 (tamaño del producto 523 pb, 26 ciclos, temperatura del material dispuesto 63° C), (cebador directo) 5'-CATGACCTGTTCCAGCGAGG-3' (ID SEC N°: 45), (cebador inverso) 5'-CATTACGAGGCCACCACTC-3' (ID SEC N°: 46).

3. Ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA)

Se llevaron a cabo con los extractos nucleares y oligonucleótidos de consenso de doble hélice marcados con [³²P] (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizada, autorradiografía y análisis de superdesplazamiento como describen Krzesz y col. (1999) FEBS Lett. 453, 191. A este respecto se usó un oligonucleótido de ADN de doble hélice con la siguiente secuencia de hélice simple (se subraya la secuencia de unión al núcleo): AP-1, 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3' (ID SEC N°: 3). Para el análisis de la contención de AP-1 endógeno en extractos nucleares de las células del endotelio mediante los distintos señuelos de elemento cis se seleccionó en la formulación para unión EMSA una relación de 50:1 de señuelo de AP-1 elemento cis:oligonucleótido AP-1 marcado con [³²P] (11 fmol).

4. Técnica de oligonucleótido señuelo

Se prepararon oligonucleótidos señuelo de doble hélice de los oligonucleótidos unidos a tioato de fósforo de hélice simple complementarios (Eurogentec, Colonia, Alemania) como describen Krzesz y col. (1999) FEBS Lett. 453, 191. Se incubaron las células del endotelio humanas cultivadas durante al menos 2 horas con el oligonucleótido señuelo respectivo en una concentración de 10 µM. Acto seguido se reemplazó el medio que contenía el oligonucleótido señuelo en general por medio fresco. Las secuencias de hélice simple de los oligonucleótidos eran como sigue (letras subrayadas señalan bases que se unen a tioato de fósforo):

AP-1	5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3'	(ID SEC N°: 3),
AP-1	5'-GTGCTGACTCAGCAC-3'	(ID SEC N°: 5),
AP-1	5'-TGTGCTGACTCAGCACA-3'	(ID SEC N°: 11),
AP-1	5'-TTGTGCTGACTCAGCACAA-3'	(ID SEC N°: 13),
AP-1	5'-GTCGCTTAGTGACTAAGCGAC-3'	(ID SEC N°: 35),
AP-1 mut	5'-CGCTTGATTACTTAGCCGGAA-3'	(ID SEC N°: 47)
NFAT	5'-CGCCCAAAGAGGAAAATTTGTTTCATA-3'	(SEC ID N°: 48)

5. Análisis por Western Blot

Las células del endotelio de venas del cordón umbilical humanas se descompusieron mediante cinco congelaciones sucesivas en nitrógeno líquido y descongelaciones a 37°C. Los extractos proteicos se prepararon como describen Hecker y col. (1994) Biochem J. 229, 247. Se separaron de 20 a 30 µg de proteína con ayuda de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones de desnaturalización en presencia de SDS según el protocolo estándar y se transfirieron a una membrana de transferencia de poli(fluoruro de vinilideno) BioTrace™ (Pall Corporation, RoBdorf, Alemania). Para la detección inmunológica de la proteína CD40 se usó un anticuerpo CD40 anti-humano primario policlonal de Research Diagnostics Inc., Flanders NJ, Estados Unidos. Las bandas proteicas se detectaron tras adición de un IgG anti-conejo acoplado con peroxidasa (1:3000, Sigma, Deisenhofen, Alemania) con ayuda del procedimiento de quimioluminiscencia (SuperSignal Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL, Estados Unidos)

ES 2 266 902 T3

5 y autorradiografía subsiguiente (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra). La ejecución y transferencia de iguales cantidades de proteína se mostró tras “extracción” de la membrana de transferencia (5 minutos, NaOH 0,2 N, seguido de lavado 3 veces durante 10 minutos con H₂O) con detección de las mismas bandas de proteína de β -actina con un anticuerpo monoclonal primario y una IgG anti-ratón acoplada con peroxidasa (ambos de Sigma-Aldrich, dilución 1:3000).

6. Efecto de interacción de células del endotelio - leucocitos

10 Células del endotelio humanas cultivadas primarias, criadas sobre cubreobjetos hasta una densidad celular del 100%, se lavaron con tampón Hepes-tiroides (datos en mmol/l: NaCl 137, KCl 2,7, CaCl₂ 1,4, MgCl₂ 0,25, NaH₂PO₄ 0,4, Hepes Na 10, D-glucosa 5), que contenía polivinilpirrolidona al 1,5% (PVP; Sigma-Aldrich), y se aplicaron al fondo de una cámara de perfusión (altura de 2,5 mm y volumen de 260 μ l, Warner Instrument, Hamden, CT, Estados Unidos). La cámara se fijó a un microscopio S100 TV Axiovert (Zeiss, Goettingen, Alemania) sobre una
15 plataforma calentable (Warner Instruments) y se perfundió con el tampón descrito calentado a 37° C (*calentador de solución en-línea*, Warner Instruments). La fuerza de empuje producida con ayuda de una bomba (Ismatec, Zürich, Suiza) fue de 5 din/cm² a una relación de cizalla de 10 s⁻¹. Las células del endotelio se perfundieron al comienzo durante 10 minutos con Hepes-Tiroides/PVP, seguido de una superfusión de 10 minutos con 1,5x10⁶ células THP-1 (5 x 10⁵ células THP-1/ml) en Hepes-tiroides/PVP. A continuación se lavó la cámara de perfusión con Hepes-tiroides/PVP. La documentación de los efectos de interacción célula-célula se realizó con amplificación de 20 veces
20 con una cámara SPOT RT Farb-CCD (Diagnostics Instruments, Burroughs St. Sterling Heights, Michigan, Estados Unidos). Por formulación de ensayo se valoraron tres tomas de distintos campos visuales con el programa MetaMorph V3.0 (Universal Imaging, West Chester, PA, Estados Unidos).

7. Análisis estadístico

25 Si no se indica de otra forma, todos los datos en las figuras se dan como valores medios \pm SEM de n experimentos. La valoración estadística se realizó mediante análisis de la varianza parcial (ANOVA) seguido de un ensayo Dunnett Post. Se apreció un valor P < 0,05 como diferencia estadística más significativa.

30 8. Detección experimental del efecto del oligonucleótido señuelo

Para la detección de la actividad del preparado para terapia basado en el oligonucleótido señuelo desarrollado en la presente solicitud se llevó a cabo para la indicación de rechazo al trasplante agudo un estudio *prueba de concepto*
35 experimental en animales con ratas (combinación de razas Wistar Furth auf Lewis; para detalles experimentales véase Hölschermann y col. (1999) Am. J. Pathol. 154, 211). La aplicación una sola vez de 10 μ mol/l del oligonucleótido señuelo de AP-1 (ID SEC N°: 3), pero no del oligonucleótido de control mutado (AP-1 mut (ID SEC N°: 47), sin diferencia en comparación con los animales de control), a los vasos coronarios del trasplantado coronario heterótopo (incubación de 30 minutos antes del implante) alargó sus supervivencias sin toma de un inmunosupresor de 6,2 \pm 0,2 a 7,6 \pm 0,4 días (n = 5, P < 0,05). Este efecto estaba asociado con un debilitamiento significativo de la expresión de
40 la molécula de adhesión (por ejemplo, VCAM-1) en el endotelio de los vasos coronarios del corazón del donante así como con la infiltración de monocitos y células T en el día 1 y 3 post-operatorio.

También en el modelo de la vasculoterapia del trasplante (rechazo crónico) se comprueba como extraordinariamente efectiva la aplicación de una sola vez del oligonucleótido señuelo de AP-1. En variación de los modelos de rechazo
45 agudos descritos hasta ahora, se trataron los animales receptores por vía intraperitoneal con el inmunosupresor ciclosporina A (5 mg por kg de peso corporal y día) y se explantaron los corazones de los donantes tras 100 días. El grado de vasculopatía en las arterias coronarias se determinó morfométricamente según los criterios de Adams y dio lugar al siguiente cuadro: control de isotipo (n = 7), puntuación 0,97 \pm 0,11; control de ciclosporina A (n = 6), puntuación 2,08 \pm 0,16 (P > 0,001 frente al control de isotipo); oligonucleótido señuelo de AP-1 (n = 6), puntuación 1,39 \pm 0,16
50 (P > 0,01 frente al control de ciclosporina A).

55

60

65

ES 2 266 902 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Oligonucleótidos de ADN de doble hélice, en donde una o ambas hélices de ADN presentan una secuencia según ID SEC N° 1, 2, 7 a 10 ó 15 a 34 y la hélice de ADN complementaria presenta la secuencia complementaria a esta.

2. Oligonucleótidos de ADN de doble hélice según la reivindicación 1 como medicamentos.

10 3. Uso de oligonucleótidos de ADN de doble hélice que se unen al factor de transcripción AP-1 de doble hélice y de oligonucleótidos de ADN de doble hélice según la ID SEC N° 1 a 36 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o terapia del rechazo al trasplante agudo y crónico, de la *enfermedad injerto contra huésped* aguda y crónica (EICH) así como de los daños por isquemia/reperfusión de órganos tras una intervención quirúrgica.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

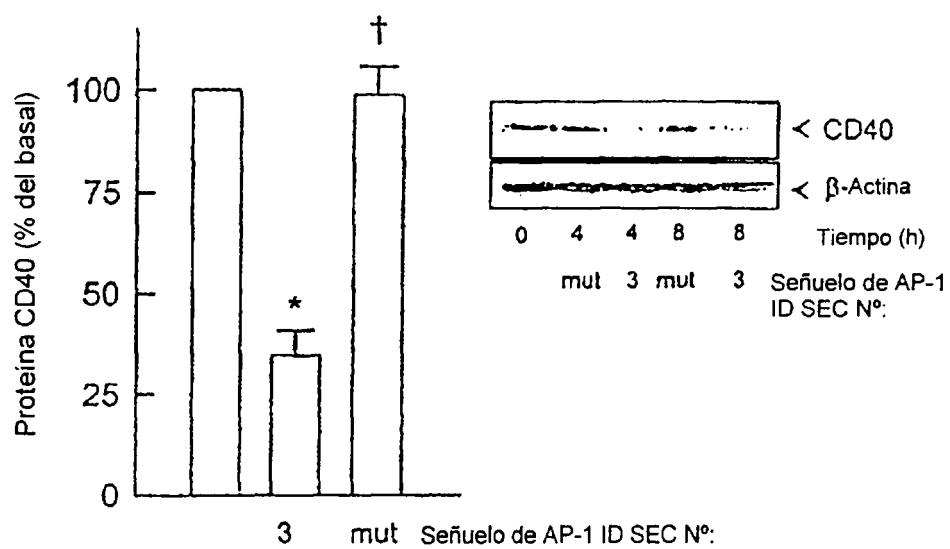


Fig. 2

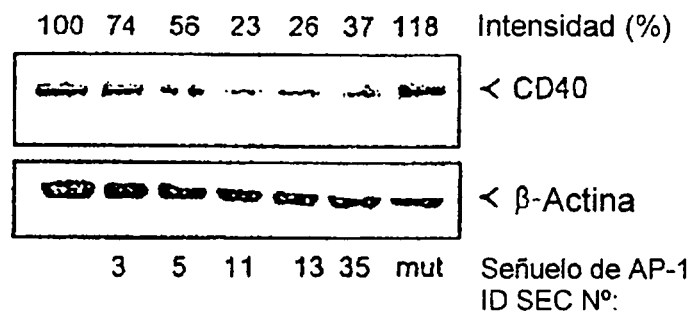


Fig. 3

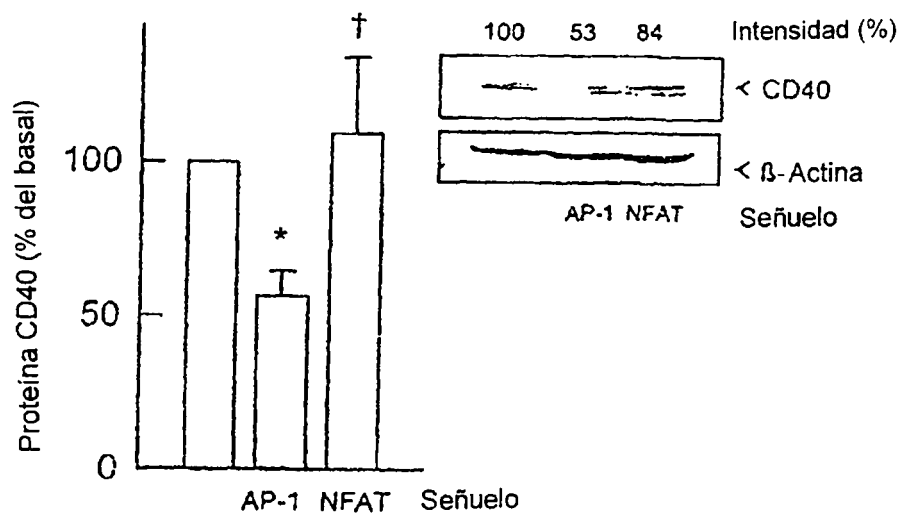


Fig. 4

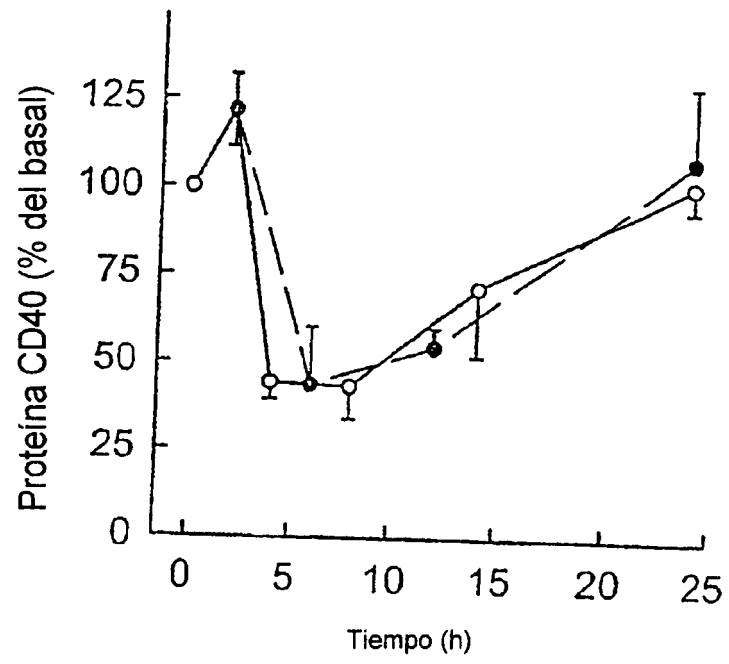


Fig. 5

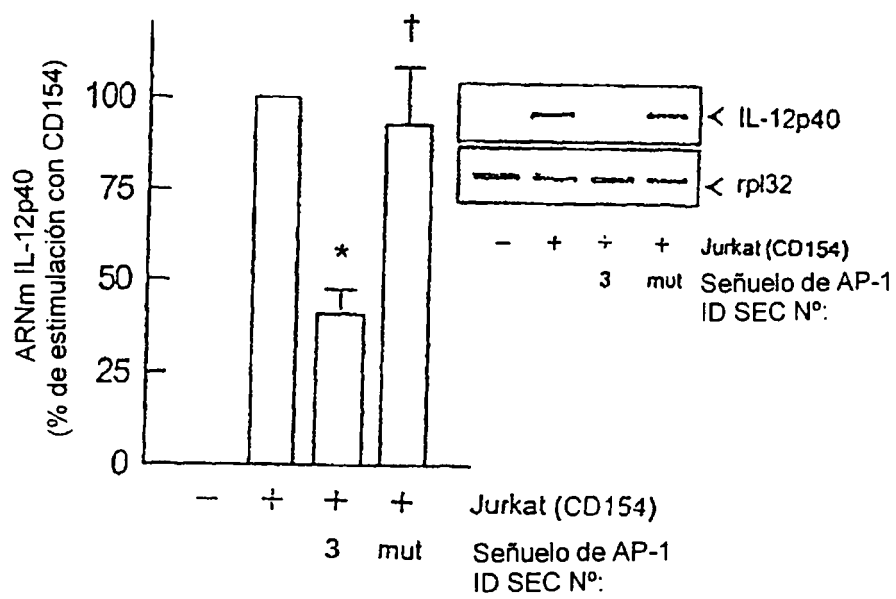


Fig. 6

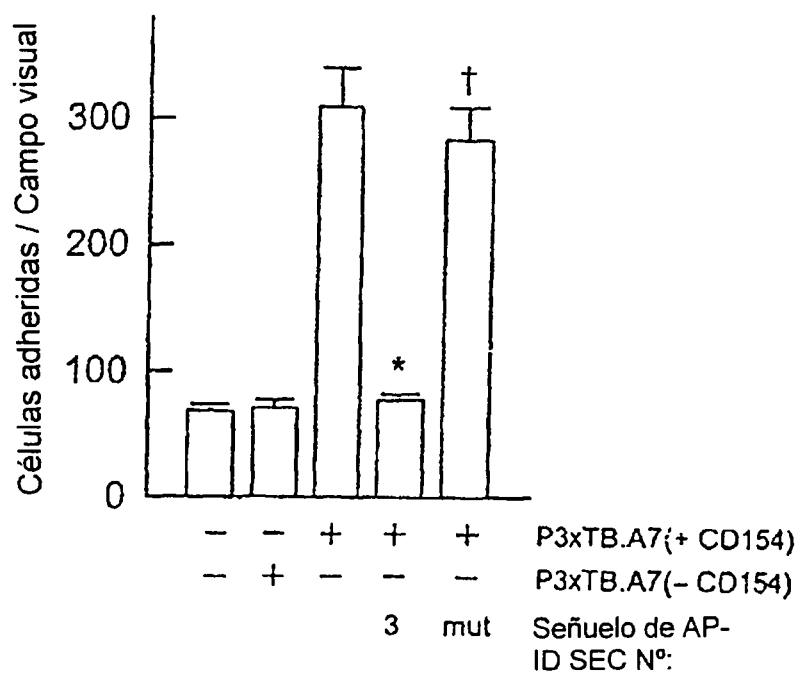


Fig. 7

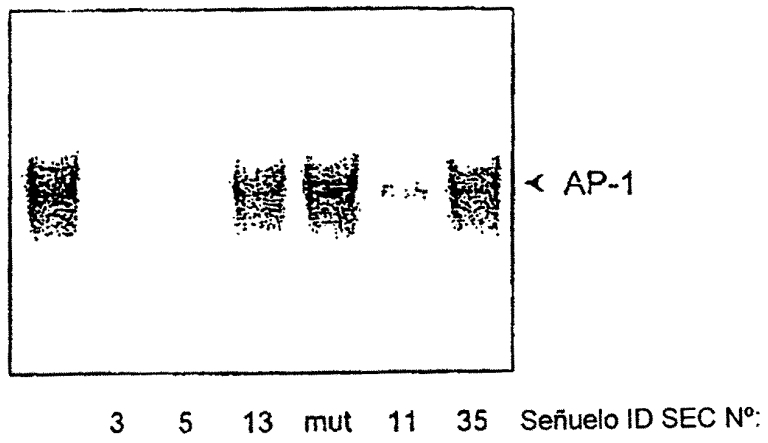


Fig. 8

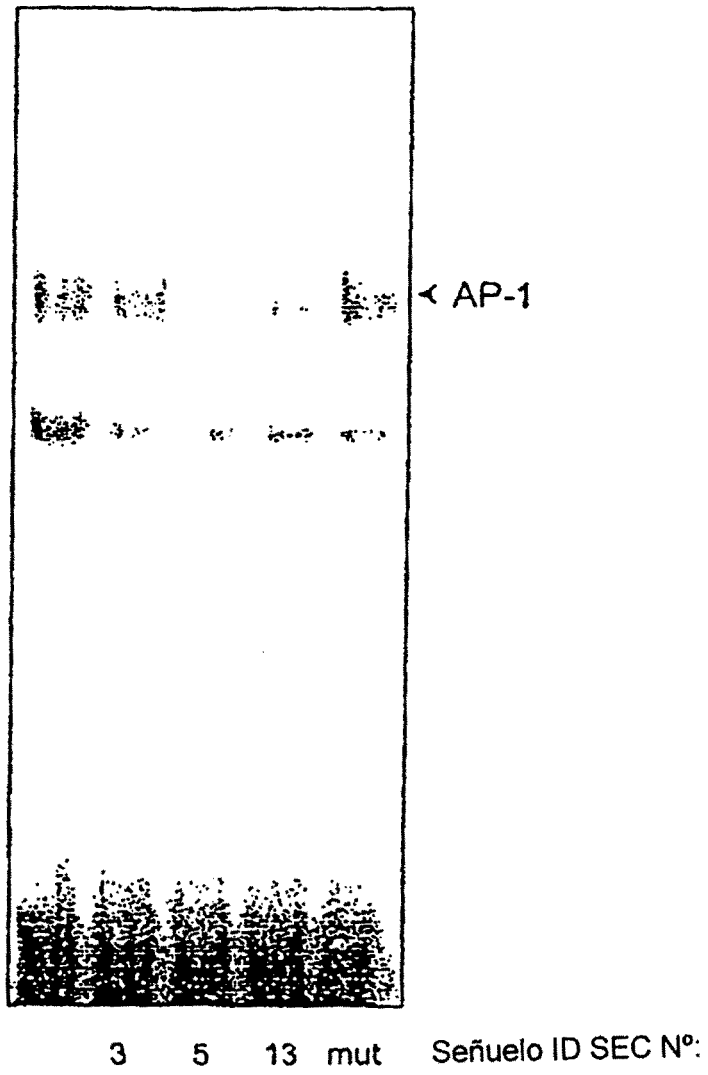


Fig. 9

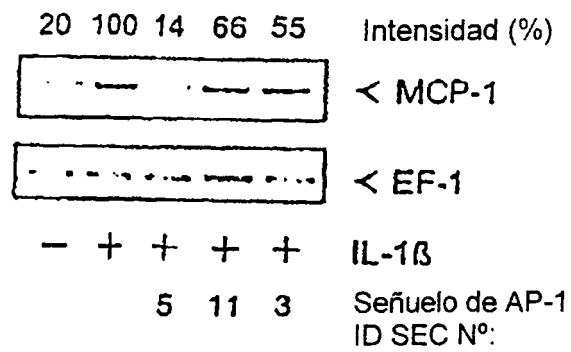
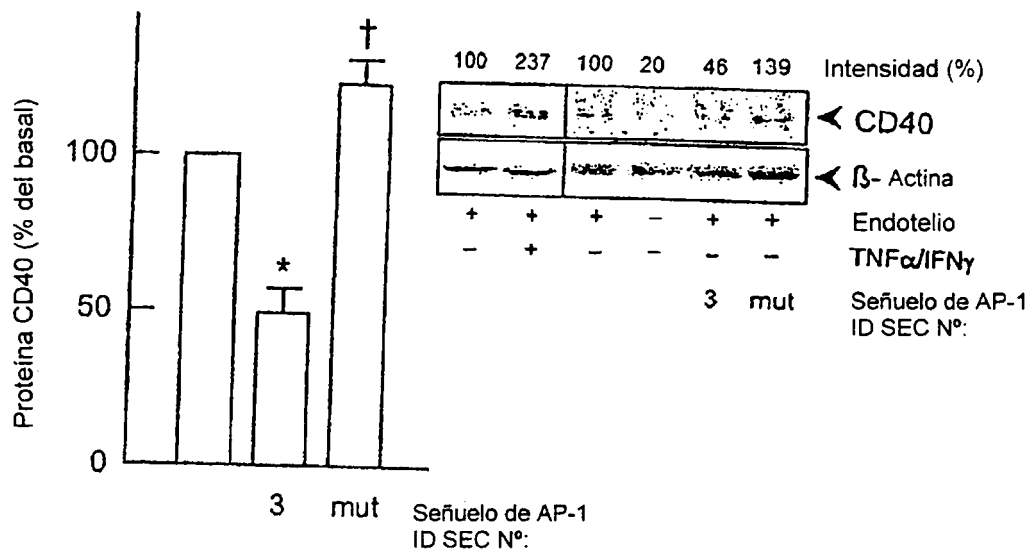


Fig. 10



ES 2 266 902 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Avontec GmbH
- 5 <120> Inhibición por oligonucleótido señuelo de la expresión de CD40
- <130> HEC-006 PCT
- 10 <140> Desconocido
<141> 2003-09-02
- <150> 102 40 417,8
- 15 <151> 2002-09-02
- <160> 48
- 20 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
<211> 9
- 25 <212> ADN
<213> secuencia sintética
- <220>
- 30 <221> misc-feature
<222> (1) . . (1)
<223> V = g ó c ó a
- 35 <220>
<221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (9)
- 40 <223>
- <220>
<221> misc-feature
- 45 <222> (9) . . (9)
<223> S = g ó c
- <400> 1
- 50
vtgagtcas
- <210> 2
- 55 <211> 9
<212> ADN
<213> secuencia sintética
- 60 <220>
<221> misc-feature
<222> (1) . . (1)
- 65 <223> S = g ó c
- <220>

ES 2 266 902 T3

	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (9)	
	<223>	
5	<220>	
	<221> misc-feature	
	<222> (9) . . (9)	
10	<223> B = g ó t ó c	
	<400> 2	
15	stgastcab	9
	<210> 3	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
25	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (21)	
	<223>	
30	<400> 3	
	cgcttgatga ctcagccgga a	21
35	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
45	<222> (1) . . (21)	
	<223>	
	<400> 4	
50	ttccggctga gtcatcaagc g	21
	<210> 5	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
60	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (15)	
65	<223>	

ES 2 266 902 T3

	<400> 5	
	gtgctgactc agcac	15
5	<210> 6	
	<211> 15	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
15	<222> (1) . . (15)	
	<223>	
	<400> 6	
20	gtgctgagtc agcac	15
	<210> 7	
25	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
30	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (15)	
35	<223>	
	<400> 7	
40	gtggtgactc accac	15
	<210> 8	
	<211> 15	
45	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
50	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (15)	
	<223>	
55	<400> 8	
	gtggtgagtc accac	15
60	<210> 9	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
65	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	

ES 2 266 902 T3

<222> (1) . . (17)
<223>

5 <400> 9
agtggtgact caccact 17

10 <210> 10
<211> 17
<212> ADN
<213> secuencia sintética

15 <220>
<221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (17)
20 <223>

<400> 10

25 agtggtgagt caccact 17

<210> 11
<211> 17
30 <212> ADN
<213> secuencia sintética

<220>
35 <221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (17)
<223>

40 <400> 11
tgtgctgact cagcaca 17

45 <210> 12
<211> 17
<212> ADN
50 <213> secuencia sintética

<220>
<221> Oligonucleótido señuelo
55 <222> (1) . . (17)
<223>

<400> 12

60 tgtgctgagt cagcaca 17

<210> 13
65 <211> 19
<212> ADN
<213> secuencia sintética

ES 2 266 902 T3

<220>
<221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (19)
5 <223>

<400> 13

10 ttgtgctgac tcagcaca 19

<210> 14
<211> 19
15 <212> ADN
<213> secuencia sintética

<220>
20 <221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (19)
<223>

25 <400> 14

ttgtgctgag tcagcaca 19

30 <210> 15
<211> 13
<212> ADN
35 <213> secuencia sintética

<220>
<221> Oligonucleótido señuelo
40 <222> (1) . . (13)
<223>

<400> 15
45 tggtagtca cca 13

<210> 16
50 <211> 13
<212> ADN
<213> secuencia sintética

55 <220>
<221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (13)
<223>
60

<400> 16

tggtagtca cca 13
65

<210> 17
<211> 15

ES 2 266 902 T3

	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
5	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (15)	
	<223>	
10	<400> 17	
	atggtgagtc accat	15
15	<210> 18	
	<211> 15	
	<212> ADN	
20	<213> secuencia sintética	
	<220>	
25	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (15)	
	<223>	
30	<400> 18	
	atggtgactc accat	15
35	<210> 19	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
40	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (17)	
45	<223>	
	<400> 19	
50	tatggtgagt caccata	17
	<210> 20	
	<211> 17	
55	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
60	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (17)	
	<223>	
65	<400> 20	
	tatggtgact caccata	17

ES 2 266 902 T3

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
5 <213> secuencia sintética

<220>
<221> Oligonucleótido señuelo
10 <222> (1) . . (19)
<223>

<400> 21
15
ctatggtgag tcaccatag 19

<210> 22
20 <211> 19
<212> ADN
<213> secuencia sintética

25 <220>
<221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (19)
30 <223>

<400> 22
35 ctatggtgac tcaccatag 19

<210> 23
<211> 21
40 <212> ADN
<213> secuencia sintética

<220>
45 <221> Oligonucleótido señuelo
<222> (1) . . (21)
<223>

50 <400> 23
cctatggtga gtcaccatag g 21

55 <210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia sintética
60

<220>
<221> Oligonucleótido señuelo
65 <222> (1) . . (21)
<223>

ES 2 266 902 T3

	<400> 24	
	cctatggtga ctcacatag g	21
5	<210> 25	
	<211> 13	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
15	<222> (1) . . (13)	
	<223>	
	<400> 25	
20	tgttgagtca cca	13
	<210> 26	
25	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
30	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (13)	
35	<223>	
	<400> 26	
40	tggtgactca aca	13
	<210> 27	
	<211> 15	
45	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
50	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (15)	
	<223>	
55	<400> 27	
	gtgttgagtc accac	15
60	<210> 28	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
65	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	

ES 2 266 902 T3

	<222> (1) . . (15)	
	<223>	
5	<400> 28	
	gtggtgactc aacac	15
10	<210> 29	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
15	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (17)	
20	<223>	
	<400> 29	
25	tgtgttgagt caccaca	17
	<210> 30	
	<211> 17	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
35	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (17)	
	<223>	
40	<400> 30	
	tgtgttgact caacaca	17
45	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> ADN	
50	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
55	<222> (1) . . (19)	
	<223>	
	<400> 31	
60	ctgtgttgag tcaccacag	19
	<210> 32	
65	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	

ES 2 266 902 T3

	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (19)	
5	<223>	
	<400> 32	
10	ctgtggtgac tcaacacag	19
	<210> 33	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
20	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (21)	
	<223>	
25	<400> 33	
	actgtgttga gtcaccacag t	21
30	<210> 34	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
40	<222> (1) . . (21)	
	<223>	
	<400> 34	
45	actgtggtga ctcaacacag t	21
	<210> 35	
50	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
55	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (21)	
	<223>	
60	<400> 35	
	gtctcttagt gactaagcga c	21
65	<210> 36	
	<211> 21	

ES 2 266 902 T3

	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
5	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	
	<222> (1) . . (21)	
	<223>	
10	<400> 36	
	gtcgcttagt cactaagcga c	21
15	<210> 37	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> secuencia sintética	
	<220>	
25	<221> Cebador	
	<222> (1) . . (24)	
	<223>	
30	<400> 37	
	cagagttcac tgaacggaa tgcc	24
35	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
40	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1) . . (20)	
45	<223>	
	<400> 38	
50	tgctgctg ttgcacaacc	20
	<210> 39	
	<211> 19	
55	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
60	<221> Cebador	
	<222> (1) . . (19)	
	<223>	
65	<400> 39	
	tcattaacag tggggaag	19

ES 2 266 902 T3

	<400> 43	
	gcggatcccc tccagcatga aagtctct	28
5	<210> 44	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Cebador	
15	<222> (1) . . (28)	
	<223>	
	<400> 44	
20	acgaattctt ctgggtgt ggagtgag	28
	<210> 45	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
30	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1) . . (20)	
35	<223>	
	<400> 45	
40	catgacctgt tccagcgagg	20
	<210> 46	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
50	<221> Cebador	
	<222> (1) . . (20)	
	<223>	
55	<400> 46	
	cattcaagag gccaccactc	20
60	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
65	<220>	
	<221> Oligonucleótido señuelo	

ES 2 266 902 T3

<222> (1) . . (21)

<223>

5 <400> 47

cgcttgatta ctagccgga a

21

10 <210> 48

<211> 27

<212> ADN

<213> secuencia sintética

15

<220>

<221> Oligonucleótido señuelo

<222> (1) . . (27)

20

<223>

<400> 48

25

cgcccaaaga ggaaaatttg ttcata

27

30

35

40

45

50

55

60

65