

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/29044 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03835

(22) Internationales Anmeldedatum:
4. Oktober 2001 (04.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 49 549.4 6. Oktober 2000 (06.10.2000) DE
100 59 144.2 29. November 2000 (29.11.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: HECKER, Markus [DE/DE]; Henri-Dunant-
Str.44d, 37075 Göttingen (DE). WAGNER, Andreas, H.
[DE/DE]; Stellwanne 11, 37083 Göttingen (DE).

(74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Dehmel &
Bettenhausen, Müllerstr. 1, 80469 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MODULATION OF THE TRANSCRIPTION OF PRO-INFLAMMATORY GENE PRODUCTS

(54) Bezeichnung: MODULATION DER TRANSKRIPTION PRO-INFLAMMATORISCHER GENPRODUKTE

(57) Abstract: The invention relates to inhibitors of the transcription factor IRF-1, the use thereof as a therapeutical agent and to the use thereof for the prevention or the therapy of cardiovascular complications such as restenosis following percutaneous angioplasty or stenosis of venous bypasses, chronic (transplant arteriosclerosis or vasculopathy) or acute graft rejection, graft versus host disease (GVHD), immunological hypersensitivities (allergies), especially asthma bronchiale and atopic dermatitis, chronic recurrent inflammatory diseases, especially colitis ulcerosa and Crohn's disease, psoriasis and sarcoidosis, as well as autoimmune diseases, especially diabetes mellitus, multiple sclerosis, collagenoses (for example systemic lupus erythematosus), rheumatoid arthritis and vasculitides.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Inhibitoren des Transkriptionsfaktors IRF-1, deren Verwendung als therapeutisches Mittel sowie deren Verwendung zur Prävention oder Therapie kardiovaskulärer Komplikationen wie der Restenose nach perkutaner Angioplastie oder der Stenosierung von Venenbypässen, der chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vasculopathie) oder akuten Transplantatabstossung, der *graft versus host disease* (GVHD), immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen (Allergien) insbesondere Asthma bronchiale und atopische Dermatitis, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen insbesondere Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen insbesondere Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Kollagenosen (z.B. systemischer Lupus erythematosus), rheumatoide Arthritis und Vasculitiden.

WO 02/29044 A2

Modulation der Transkription pro-inflammatorischer Genprodukte

Die vorliegende Erfindung betrifft Inhibitoren des Transkriptionsfaktors IRF-1, deren Verwendung als therapeutisches Mittel sowie deren Verwendung zur Prävention oder Therapie kardiovaskulärer Komplikationen wie der Restenose nach perkutaner Angioplastie oder der Stenosierung von Venenbypässen, der chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vaskulopathie) oder akuten Transplantatabstoßung, der *graft versus host disease* (GVHD), immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen (Allergien) insbesondere Asthma bronchiale und atopische Dermatitis, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen insbesondere Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen insbesondere Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Kollagenosen (z.B. systemischer Lupus erythematodes), rheumatoide Arthritis und Vaskulitiden.

Das Gefäßendothel nimmt eine Schlüsselstellung bei Entzündungserkrankungen ein, da es den primären Interaktionsort zirkulierender entzündungskompetenter Zellen mit dem Gewebe darstellt. So sind vielfältige Wechselwirkungen von Endothelzellen mit Monozyten und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bei akuten oder chronischen Entzündungen beschrieben. In letzter Zeit wird auch die Interaktion von Endothelzellen mit pro-inflammatorischen T-Helferzellen (TH1) bei Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis), bei arteriosklerotischen Gefäßwandläsionen einschließlich der Transplantat- und Venenbypass-Vaskulopathie sowie der Restenose nach perkutaner Angioplastie ebenso wie bei chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Psoriasis) verstärkt diskutiert. Dabei kommunizieren Lymphozyten und Endothelzellen über das CD40/CD154-Rezeptor/Ligand-System (auch als TNF-Rezeptor/Ligand-5-System bezeichnet) mit konsekutiver Steigerung der Chemokin- und Adhäsionsmolekülexpression im Endothel. Darüber hinaus setzen die Endothelzellen, im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. Monozyten, offenbar nur nach Aktivierung des CD40-Signalweges biologisch aktives Interleukin-12 in einer Menge frei, die der maximal stimulierter Monozyten gleichkommt (diese

gelten gemeinhin als Hauptquelle für Interleukin-12). Interleukin-12 ist der wichtigste Stimulus bzw. Differenzierungsfaktor für naive T-Helferzellen, die mit einer verstärkten Bildung von Interferon- γ bzw. Expression von CD154 auf ihrer Oberfläche reagieren (diese T-Helferzellen gelten dann als TH1-Zellen). Interferon- γ seinerseits verstärkt die Expression von CD40 in den Endothelzellen, so dass es zu einem Teufelskreis kommt, bei dem sich Endothelzellen, T-Helferzellen und rekrutierte Monozyten gegenseitig stimulieren und die Entzündungsreaktion in Gang halten.

Die Entzündungsreaktion auslösenden ko-stimulatorischen Eigenschaften von CD40/CD154 wurden u.a. bei der akuten bzw. chronischen Transplantatabstoßung (Vaskulopathie) sowie beim Morbus Crohn tierexperimentell nachgewiesen. Dabei spielt jedoch nicht nur die Endothel-Leukozyten-Wechselwirkung über CD40/CD154, sondern auch z.B. die CD40/CD154-vermittelte Interaktion von Monozyten/Makrophagen oder dendritischen Zellen mit TH1-Zellen bzw. naiven T-Helferzellen eine Rolle. Ferner können z.B. glatte Gefäßmuskelzellen aber auch Keratinozyten der Haut oder synoviale Fibroblasten in Gelenken CD40 exprimieren. Die Aktivierung des CD40-Signalweges in diesen Zellen ist ebenfalls von Bedeutung nicht nur für die Entzündungsreaktion, sondern führt auch zu Umstrukturierungsprozessen im Gewebe wie z.B. dem Remodelling der Gefäßwand bei der Transplantat-Vaskulopathie, den Hautveränderungen bei der Psoriasis oder den Erosionen des Gelenkknorpels bei der rheumatoiden Arthritis. Neben den CD154-induzierten, Interleukin-12-abhängigen und TH1-vermittelten chronischen Entzündungserkrankungen bzw. Autoimmunreaktionen, zu denen auch Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Sarkoidose und Vaskulitiden zählen, sind die ko-stimulatorischen Eigenschaften von CD40/CD154 wichtig für die Differenzierung von B-Lymphozyten in Antikörper-produzierende Plasmazellen, die durch den Kontakt mit TH2-Zellen ausgelöst wird. Dabei exprimieren die B-Lymphozyten CD40, die TH2-Zellen CD154. Ohne diese Ko-Stimulation produzieren die Plasmazellen primär Antikörper vom Typ IgM und kaum Antikörper vom Typ IgE oder IgG. Eine übersteigerte TH2-Antwort, d.h. die übermäßige Produktion von Antikörpern des Typs IgE und IgG spielt eine wichtige Rolle bei primär allergisch bedingten, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen wie Asthma bronchiale, atopische Dermatitis und Colitis ulcerosa, aber auch bei Kollagenosen wie systemischer Lupus erythematodes (SLE), wobei beim SLE die Bildung autoreaktiver Autoantikörper im Vordergrund steht und dieser insofern als generalisierte Autoimmunerkrankung betrachtet wird. Generell ist die Unterscheidung zwischen Autoimmunerkrankungen und chronisch

rezidivierenden Entzündungserkrankungen problematisch, da ein gemeinsamer prädisponierender Faktor offenbar das Ungleichgewicht zwischen einer TH1- und einer TH2-vermittelten zellulären bzw. humoralen Immunantwort ist.

- 5 Den derzeit einzig sinnvollen Therapieansatz für die Behandlung der u.a. mit dem CD40/CD154 Signalweg assoziierten Erkrankungen stellt neben blockierenden Antikörpern gegen CD154 die Inhibierung der CD40-Expression in den CD154-Zielzellen dar. Ein Nachteil der Anti-CD154-Antikörperbehandlung besteht unter anderem in der Gefahr von Überempfindlichkeitsreaktionen (gegen den Antikörper), vor allem bei wiederholter Applikation sowie die zumindest für
- 10 gewebeständige Epitope (z.B. infiltrierte T-Lymphozyten) schlechte Zugänglichkeit, da die Antikörper in der Regel über die Blutbahn appliziert werden müssen. Allerdings gibt es, wie für viele andere Zytokinrezeptoren auch, keine niedermolekularen Rezeptorantagonisten für CD40. Ferner aktivieren aufgrund der Trimerisierung des Rezeptormoleküls nach Ligandenbindung CD40-Antikörper eher die CD154-Zielzellen. Andere sich von einer allgemeinen Dämpfung der
- 15 Entzündungsreaktion abgrenzenden Strategien sind die Stimulation der TH1-Zellantwort bei Überwiegen einer TH2-Zellreaktion (z.B. durch die Gabe von einem TH1-Zytokin wie Interferon- γ) oder umgekehrt durch die Stimulation der TH2-Zellantwort bei Überwiegen einer TH1-Zellreaktion (z.B. durch Gabe von einem TH2-Zytokin wie Interleukin-10). Da sich die Reaktionen der T-Helferzellen Zytokin-vermittelt antagonisieren (d.h., ein Überwiegen der TH1-
- 20 Zellantwort führt zur Dämpfung der TH2-Zellantwort und umgekehrt), bergen diese Strategien aber die Gefahr in sich, den jeweils anderen Arm der T-Helferzellantwort zu enthemmen, mit der Möglichkeit, eine dementsprechende andersartige Entzündungsreaktion auszubilden.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde Mittel für eine Prävention

25 und/oder Therapie von Entzündungserkrankungen zur Verfügung zu stellen, die u.a. mit der CD40/CD154-Kostimulation assoziiert sind.

Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

- 30 Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Fig. 1 zeigt in einer Grafik das Ergebnis der CD40 mRNA-Expression (RT-PCR-Analyse) in nicht-stimulierten, TNF α (1000 U/ml), IFN γ (1000 U/ml) und TNF α (100 U/ml) plus IFN γ

(1000 U/ml)-stimulierten kultivierten humanen Endothelzellen nach 9 Stunden (bezogen in % auf die basale CD40-Expression in nicht-stimulierten Endothelzellen) (n=5-9, * P < 0,05 versus basal, †P < 0.05 versus TNF α und IFN γ).

- 5 Fig. 2 zeigt schematisch das Ergebnis der Zeit-abhängigen Zunahme der nukleären Translokation von NF κ B (p65/p50 Heterodimer), des p91/p91 Homodimers von Stat-1 und von IRF-1 in humanen Endothelzellen, die 0,5 Stunden (NF κ B und Stat-1) bzw. 3 Stunden (IRF-1) mit TNF α (1000 U/ml), IFN γ (1000 U/ml) und TNF α (100 U/ml) plus IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden. Eine Vorinkubation (1 Stunde) mit Cycloheximid (Cx, 1 μ M) zeigt, dass IRF-1 *de novo*
10 exprimiert wird. Repräsentative Electrophoretic Mobility Shift Analyse, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

Fig. 3 zeigt schematisch die Ergebnisse der Auswirkungen von spezifischen Cis-Element Decoys gegen Stat-1, NF κ B und IRF-1 (10 μ M, 4 h Vorinkubation) auf (a) den mRNA-Spiegel von
15 CD40 (n=3-5, statistische Zusammenfassung, bezogen in % auf den Maximalwert, *P<0,05 versus TNF α /IFN γ), (b) den mRNA-Spiegel von CD40 und E-Selectin (repräsentative RT-PCR-Analyse, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten), (c) den CD40-Proteingehalt (repräsentativer Western Blot, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten) in humanen Endothelzellen, die für 9 Stunden (RT-PCR-Analyse) bzw.
20 24 Stunden (Western Blot) mit TNF α (100 U/ml)/IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden. Bei (b,c) sind die relativen Intensitäten (%), bestimmt durch densitometrische Auswertung (One-Dscan-Gel Analysis Software, Scanalytics, Billerica, MA, USA), bezogen auf die Maximalwerte bei Zytokin-Stimulation angegeben.

- 25 Fig. 4 zeigt schematisch die Effekte verschiedener Cis-Element Decoys gegen Stat-1, NF κ B und IRF-1 (10 μ M, 4 h Vorinkubation) auf den CD40-Proteingehalt (a) bestimmt mit Hilfe des Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) in humanen Endothelzellen, die für 24 Stunden mit TNF α (100 U/ml)/IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden und den Nachweis des für Endothelzellen charakteristischen Zelloberflächenproteins PECAM-1 (b). Dargestellt ist jeweils
30 ein Overlay der Originalmessung der IgG Isotypkontrolle und von TNF α /IFN γ -behandelten (CD40) bzw. nicht-stimulierten (PECAM-1) Zellen sowie in tabellarischer Form die logarithmischen Werte der jeweiligen durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten. Repräsentativer Versuch, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

Fig. 5 zeigt schematisch die Ergebnisse die Effekte von TNF α (2000 U/ml), IFN γ (1000 U/ml) und TNF α (100 U/ml) plus IFN γ (1000 U/ml) auf den CD40- bzw. IRF-1-mRNA-Spiegel in humanen Endothelzellen nach 9 Stunden Inkubation. Repräsentativer Versuch, vergleichbare
5 Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

Fig. 6 zeigt schematisch die Ergebnisse zur Zeit-abhängigen Zunahme der CD40- bzw. IRF-1-mRNA-Expression in humanen Endothelzellen, die für 0, 0,5, 1,5, 3 und 9 Stunden mit IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden. Repräsentativer Versuch, vergleichbare Ergebnisse wurden in
10 weiteren Experimenten erhalten.

Fig. 7 zeigt schematisch die Spezifität der Cis-Element Decoy Wirkung auf die CD40 mRNA-Expression in den humanen Endothelzellen. Vorinkubation (4 Stunden) mit dem Cis-Element Decoy (IRF-1n cons, 10 μ M) nicht aber mit dem entsprechenden mutierten Kontroll-
15 Oligonukleotid (IRF-1n mut, 10 μ M) hemmt die CD40 mRNA-Expression in Zellen, die anschließend für 9 Stunden mit TNF α (100 U/ml) und IFN γ (1000 U/ml) inkubiert worden waren. Repräsentative RT-PCR-Analyse, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

20 Fig. 8 zeigt die Hemmung der Zytokin-induzierten (100 U/ml) TNF α , 1000 U/ml IFN γ) Expression des IRF-1-Proteins (nach 3 Stunden) und der CD40-mRNA (nach 9 Stunden) in humanen Endothelzellen, die zuvor für 5 Stunden mit einem IRF-1 Antisense-Oligonukleotid (AS; SEQ ID NO:23) behandelt worden waren (Konzentration 0,2 μ M). Die linke Bildhälfte zeigt jeweils die statistische Zusammenfassung von 3 Versuchen mit unterschiedlichen
25 Zellchargen, die rechte Bildhälfte zeigt jeweils eine repräsentative Western Blot- bzw. RT-PCR-Analyse, in (b) zuzüglich der densitometrischen Auswertung ("Intensität"), angegeben in % der stimulierten Kontrolle und bezogen auf den internen Standard β -Aktin (*P<0.05 gegenüber den stimulierten Kontrollzellen). Die entsprechenden Missense (MS) bzw. Scrambled (SCR) Kontroll-Oligonukleotide beeinflussten weder die Expression von IRF-1 noch von CD40.

30

Fig. 9 zeigt die Electrophoretic Mobility Shift Analyse der Aufnahme verschiedener IRF-1 Cis-Element Decoys (SEQ ID NO:13, 17, 19 und 21) in kultivierte THP-1-Zellen und die nachfolgende Neutralisierung von IRF-1. Die THP-1-Zellen wurden mit den verschiedenen Cis-

Element Decoys für 1 Stunde vorinkubiert und anschließend für weitere 3 Stunden mit TNF α (100 U/ml) und IFN γ (1000 U/ml) stimuliert. Das Ergebnis der nachfolgenden Aufbereitung und Analyse der Proben ist in der linken Bildhälfte dargestellt. Die rechte Bildhälfte zeigt die Electrophoretic Mobility Shift Analyse eines unter identischen experimentellen Bedingungen
5 gewonnenen Kernextraktes stimulierter Kontrollzellen, der zusätzlich mit einem Anti-IRF-1-Antikörper wie in Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben vor der Electrophoretic Mobility Shift Analyse inkubiert worden war (Supershift-Analyse).

Der hier verwendete Ausdruck "Decoy-ODN" oder "Cis-Element Decoy" oder "doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid" bezeichnet ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das eine Sequenz auf-
10 weist, die der natürlichen IRF-1 Kernbindungssequenz im Genom entspricht oder ähnelt und an die der Transkriptionsfaktor IRF-1 in der Zelle bindet. Das Cis-Element Decoy wirkt somit als Molekül zur kompetitiven Inhibierung von IRF-1.

Die Erfinder konnten die bei der entzündungsbedingten, Zytokin-vermittelten Steigerung der
15 CD40-Rezeptorexpression in humanen Endothelzellen beteiligten Transkriptionsfaktoren aufklären. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass die Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor κ B (NF- κ B) und Signal Transducer and Activator of Transcription-1 (Stat-1) die Tumornekrosefaktor- α (TNF α)/Interferon- γ (IFN γ)-medierte CD40-Expression nicht, wie in glatten Gefäßmuskelzellen von Nagetieren der Fall, direkt, sondern indirekt durch Aktivierung
20 eines weiteren Transkriptionsfaktors, dem Interferon-Regulatory Factor-1 (IRF-1), steuern. IRF-1 (GenBank Accession No.: L05078, X14454, NM002198 und <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/qt/getEntry.pl?t00423>) ist ein Transkriptionsfaktor, der im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren in der Zelle nicht latent vorhanden ist, sondern erst *de novo* synthetisiert werden muss und zwar im Regelfall nach Exposition gegenüber Interferon- γ und Aktivierung des
25 Transkriptionsfaktors Stat-1.

Des weiteren stimuliert Interferon- γ alleine oder in Kombination mit Tumornekrosefaktor- α in humanen Endothelzellen die Expression von CD40; hierbei spielt die TNF- α -abhängige Aktivierung von NF- κ B eine untergeordnete Rolle. Wichtiger ist die IFN- γ -abhängige
30 Aktivierung von Stat-1 infolgedessen es zur *de novo*-Expression von IRF-1 kommt. IRF-1 induziert dann die Expression von CD40. Der Synergismus der beiden Zytokine beruht im Wesentlichen auf einer Verstärkung der IRF-1-Expression. Werden die erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide gegen Stat-1 und IRF-1, nicht aber entsprechende Kontroll-

Oligonukleotide in humanen Zellen in Zellkultur verwendet, wird die Zytokin-induzierte CD40-Expression (sowohl bei Monostimulation mit IFN γ wie auch bei Kombination von IFN γ und TNF α) gehemmt. Dabei geht die Induktion von IRF-1 der Induktion von CD40 voraus, so dass eine Antisense-Oligonukleotid-Blockade der IRF-1-Expression die Zytokin-induzierte CD40-Expression in demselben Umfang wie die Decoy-Oligonukleotide hemmt. Ein Ausschalten der IRF-1-Aktivität in Zellen hat eine hochsignifikante und selektive Inhibierung der CD40-Expression in diesen Zellen zur Folge. Infolge der verminderten CD40-Expression unter proinflammatorischen Bedingungen wird die Endothel-Leukozyten-Wechselwirkung, insbesondere die Interaktion von TH1- und Endothelzellen abgeschwächt und stellt die Grundlage für den Therapieerfolg dar. Sinngemäß gilt dies auch für die Abschwächung der CD40/CD154-vermittelten Interaktion von naiven T-Helferzellen mit Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. Monozyten, dendritische Zellen), von TH2-Zellen mit B-Lymphozyten, sowie von anderen CD40-exprimierenden Zellen (z.B. glatte Muskelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten) mit CD154-exprimierenden Zellen (TH1-Zellen, aktivierte Thrombozyten).

15

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht daher in der Bereitstellung eines Inhibitors der Aktivität des Transkriptionsfaktors IRF-1 als therapeutisches Mittel. Proteine, wozu auch IRF-1 zählt, können auf verschiedenste Weise in ihrer Aktivität inhibiert werden. So können z.B. Anti-IRF-1-Antikörper, natürliche oder synthetische Substanzen, welche die IRF-1-Interaktion mit der DNA, d.h. die Transaktivierungsaktivität mindern, verwendet werden. Ferner könnte man die *de novo*-Synthese von IRF-1 durch Blockade von Stat-1 bzw. der zur Stat-1-Aktivierung führenden Signalwege (Janus-Kinasen) inhibieren.

Ein bevorzugtes Verfahren zur spezifischen Inhibierung der IRF-1-Aktivität ist die Verwendung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden, auch Cis-Element Decoy oder Decoy-ODN genannt, die eine Bindungsstelle für IRF-1 enthalten. Die exogene Zufuhr einer großen Zahl von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zu einer Zelle, insbesondere in viel höherer Zahl als im Genom vorhanden, erzeugt eine Situation, in der die Mehrzahl eines bestimmten Transkriptionsfaktors spezifisch an das jeweilige Cis-Element Decoy und nicht an seine endogenen Ziel-Bindungsstellen bindet. Dieser Ansatz zur Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre endogene Bindungsstelle wird auch als Squelching bezeichnet. Squelching (oder auch Neutralisation) von Transkription unter Verwendung von Cis-Element Decoys wurde erfolgreich eingesetzt, um das Wachstum von Zellen zu inhibieren. Dabei wurden

DNA-Fragmente verwendet, die spezifische Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors E2F enthielten (Morishita et al., PNAS, (1995) 92, 5855).

Die Sequenz einer Nukleinsäure, die zur Verhinderung der Bindung des Transkriptionsfaktors IRF-1 verwendet wird, ist beispielsweise die Sequenz, an die IRF-1 natürlicherweise in der Zelle bindet. IRF-1 bindet spezifisch an das Motiv mit der Sequenz 5'-SAAAAGYGAAACC-3', wobei S = C oder G und Y = C oder T bedeutet. Für eine Bindung von IRF-1 kommt es auf die sich wiederholenden G/CAA-Sequenzen und den Abstand zwischen diesen Motiven an, der insbesondere drei Nukleotide beträgt. Daher kann das erfindungsgemäße Cis-Element Decoy folgende 13-mer Konsensus-Kernbindungssequenz aufweisen: 5'-SAAAnnnSAAAYy-3' (SEQ ID NO:1), wobei S = C oder G, n = A, T, C oder G und y = C oder T bedeutet. Das Cis-Element Decoy kann ferner größer als die 13-mer Kernbindungssequenz sein und am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende verlängert werden. Entsprechende Mutationen im Bereich der Kernbindungssequenz führen zum Verlust der Bindung von STAT-1 an das Decoy-Oligonukleotid.

15

Da das Cis-Element Decoy eine doppelsträngige Nukleinsäure ist, umfaßt das erfindungsgemäße DNA-Oligonukleotid jeweils nicht nur die Sense- oder Forward-Sequenz sondern auch die komplementäre Antisense- oder Reverse-Sequenz. Bevorzugte erfindungsgemäße DNA-Oligonukleotide weisen folgende 13-mer-Kernbindungssequenzen für IRF-1 auf:

20

5'-CAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:3),

5'-GAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:5),

5'-CAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:7),

5'-GAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:9),

25

wobei die jeweiligen komplementären Sequenzen hier nicht wiedergeben sind. Das Cis-Element Decoy kann jedoch auch eine zur vorstehenden Sequenz abweichende Sequenz aufweisen und länger als ein 13-mer sein.

30 Besonders bevorzugt sind folgende Sequenzen:

(SEQ ID NO:11): 5'-CAGAAAAGTGAAACCCTG-3', 18-mer (nicht palindromisch, 1 Bindungsstelle),

(SEQ ID NO:13): 5'-CAGTTTCAAATTGAAACTG-3', 19-mer (nahezu palindromisch, 2 Bindungsstellen),

(SEQ ID NO:15): 5'-CAGGAAAAGTGAAACCGCTG-3', 20-mer (nicht palindromisch, 1 Bindungsstelle),

5 (SEQ ID NO:17): 5'-GCAGTTTCAAATTGAAACTGC-3', 21-mer (nahezu palindromisch, 2 Bindungsstellen),

(SEQ ID NO:19): 5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3', 22-mer (primär benutzte Konsensus-Sequenz),

(SEQ ID NO:21): 5'-GGCAGTTTCAAATTGAAACTGCC-3', 23-mer (nahezu palindromisch, 2 Bindungsstellen).

10 Die Bemerkung "2 Bindungsstellen" bezieht sich dabei auf Sense- und Antisense-Strang. Diese Aufzählung der bevorzugten Sequenzen ist nicht abschließend. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass eine Vielzahl von Sequenzen als Inhibitor für IRF-1 verwendet werden können, solange sie die vorstehend aufgeführten Bedingungen der 13-mer Konsensus-Kernbindungssequenz und eine Affinität zu IRF-1 aufweisen.

Die Affinität der Bindung einer Nukleinsäuresequenz an IRF-1 kann durch die Verwendung des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) bestimmt werden.

20 Dieses Testsystem ist für die Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren, die für die Verwendung in der Methode der gegenwärtigen Erfindung gedacht sind, oder die Bestimmungen der optimalen Länge einer Bindungsstelle geeignet. Sie ist auch für die Identifizierung von anderen Sequenzen, die durch IRF-1 gebunden werden, geeignet. Für einen EMSA, gedacht für die Isolation neuer Bindungsstellen, sind am besten gereinigte oder rekombinant exprimierte Versionen von IRF-1
25 geeignet, die in mehreren abwechselnden Runden von PCR-Vervielfältigung und Selektion durch EMSA eingesetzt werden (Thiesen und Bach (1990) Nucleic Acids Res. 18, 3203).

Gene, von denen bekannt ist, dass sie IRF-1-Bindungsstellen in ihrem Promotor oder Enhancer-Regionen enthalten, und die deshalb mutmaßliche Ziele für das spezifische Squelchen durch die
30 Methode der gegenwärtigen Erfindung sind, sind beispielsweise das CD40-Gen und weitere pro-inflammatorische Gene z.B. Cyclooxygenase-2, Untereinheiten der NADPH-Oxidase (p67phox und gp91phox), die induzierbare Isoform der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase, die Interleukine 6, 8 und 12 sowie die Adhäsionsmoleküle RANTES (löslich von T-Lymphozyten sezerniert,

regulated upon activation, normal T-cell expressed, presumed secreted) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, auch CD106 genannt).

Die Methode der vorliegenden Erfindung moduliert die Transkription eines Gens oder von
5 Genen in einer solchen Weise, dass das Gen oder die Gene, z.B. CD40, nicht oder vermindert
exprimiert werden. Verminderte oder unterdrückte Expression im Rahmen der gegenwärtigen
Erfindung bedeutet, dass die Transkriptionsrate verringert ist im Vergleich zu Zellen, die nicht
mit einem erfindungsgemäßen doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid behandelt werden. Solch
eine Verminderung kann beispielsweise durch Northern Blot (Sambrook et al., 1989) oder RT-
10 PCR-Analyse (Sambrook et al., 1989) bestimmt werden. Typischerweise ist eine solche
Verringerung zumindest eine 2-fache, besonders zumindest eine 5-fache, insbesondere
zumindest eine 10-fache Verringerung. Der Verlust von Aktivierung kann beispielsweise erreicht
werden, wenn IRF-1 an einem bestimmten Gen als Transkriptionsaktivator wirkt und deshalb
Squelching des Aktivators zum Verlust der Expression des Zielgens führt.

15

Darüber hinaus ermöglicht die Methode der vorliegenden Erfindung die Entthemmung der
Expression eines Gens, sofern diese von einem konstitutiv aktiven oder (nach entsprechender
Stimulation der Zelle) einem aktivierten Transkriptionsfaktor blockiert wird. Ein Beispiel hierfür
ist die Entthemmung der Expression des Prepro-Endothelin-1-Gens in nativen Endothelzellen der
20 V. jugularis des Kaninchens durch ein Cis-Element Decoy gegen den Transkriptionsfaktor
CCAAT/enhancer binding protein (Lauth et al., J. Mol. Med., (2000), 78, 441). Auf diesem Weg
kann die Expression von Genen entthemmt werden, deren Produkte eine schützende Wirkung
z.B. gegen Entzündungserkrankungen ausüben.

25 Das Cis-Element Decoy, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, enthält in einer
bevorzugten Ausführungsform eine oder mehrere, vorzugsweise 1, 2, 3, 4 oder 5, insbesondere
bevorzugt 1 oder 2 Bindungsstellen, an die IRF-1 spezifisch bindet. Die Nukleinsäuren können
synthetisch, mit enzymatischen Methoden oder in Zellen hergestellt werden. Die einzelnen
Verfahren sind Stand der Technik und dem Fachmann bekannt.

30

Die Länge des doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids ist mindestens so lang wie eine
verwendete Sequenz, die spezifisch IRF-1 bindet. Üblicherweise ist das verwendete
doppelsträngige DNA-Oligonukleotid zwischen etwa 13-65 bp, vorzugsweise zwischen etwa 13-

26 bp und besonders bevorzugt zwischen 18-23 bp gewählt.

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- und Exonukleasen, im besonderen DNasen und RNasen in der Zelle, abgebaut. Deshalb können die DNA-Oligonukleotide
5 modifiziert werden, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so dass über einen längeren Zeitraum eine hohe Konzentration der Oligonukleotide in der Zelle beibehalten wird. Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehrerer modifizierter Internukleotidbindungen erhalten werden.

- 10 Ein erfolgreich stabilisiertes DNA-Oligonukleotid enthält nicht notwendigerweise eine Modifikation an jeder Internukleotidbindung. Vorzugsweise sind die Internukleotidbindungen an den jeweiligen Enden beider Oligonukleotide des Cis-Element Decoys modifiziert. Dabei können die letzten sechs, fünf, vier, drei, zwei oder die letzte oder eine oder mehrere Internukleotidbindung innerhalb der letzten sechs Internukleotidbindungen modifiziert sein.
- 15 Ferner können verschiedene Modifikationen der Internukleotidbindungen in die Nukleinsäure eingeführt werden und die daraus entstehenden doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide auf sequenzspezifische Bindung an IRF-1, unter Verwendung des Routine EMSA-Testsystems, getestet werden. Dieses Testsystem erlaubt die Bestimmung der Bindungskonstante des Cis-Element Decoys und so die Bestimmung, ob die Affinität durch die Modifikation verändert
20 wurde. Modifizierte Cis-Element Decoys, die noch eine ausreichende Bindung zeigen, können ausgewählt werden, wobei eine ausreichende Bindung zumindest etwa 50% oder zumindest etwa 75%, und besonders bevorzugt etwa 100% der Bindung der unmodifizierten Nukleinsäure bedeutet.
- 25 Cis-Element Decoys mit modifizierter Internukleotidbindung, die immer noch ausreichende Bindung zeigen, können überprüft werden, ob sie stabiler in der Zelle sind als die unmodifizierten Cis-Element Decoys. Die mit den erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys transfizierten Zellen werden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Menge der dann noch vorhandenen Cis-Element Decoys untersucht. Dabei wird vorzugsweise ein mit einem
30 Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Texas-Rot) markiertes Cis-Element Decoy oder ein radioaktiv markiertes (z.B. ³²P) Cis-Element Decoy eingesetzt mit anschließender digitaler Fluoreszenzmikroskopie bzw. Autoradiographie oder Szintigraphie. Ein erfolgreich modifiziertes Cis-Element Decoy hat eine Halbwertszeit in der Zelle, die höher ist als die eines unmodifizierten

Cis-Element Decoys, vorzugsweise von zumindest etwa 48 Stunden, mehr bevorzugt von zumindest etwa 4 Tagen, am meisten bevorzugt von mindestens etwa 7 Tagen.

Geeignete modifizierte Internukleotidbindungen sind in Uhlmann und Peyman ((1990) Chem. Rev. 90, 544) zusammengefaßt. Modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken in einer Nukleinsäure, die in einer Methode der gegenwärtigen Erfindung eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphorodithioat, Phosphoramidat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxan-Brücken, Carbonat-Brücken, Carboxymethylester-Brücken, Acetamidat-Brücken und/oder Thioether-Brücken enthalten.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Stabilisierung von Nukleinsäuren durch die Einführung struktureller Merkmale in die Nukleinsäure, die die Halbwertszeit der Nukleinsäure erhöhen. Solche Strukturen, die Haarnadel- und Glocken-DNA enthalten, sind in US 5,683,985 offenbart. Gleichzeitig können modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken, zusammen mit den genannten Strukturen, eingeführt werden. Die sich daraus ergebenden Nukleinsäuren können im oben beschriebenen Testsystem auf Bindung und Stabilität geprüft werden.

Die Kernbindungssequenz kann nicht nur in einem Cis-Element Decoy vorliegen, sondern auch in einem Vektor. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor ein Plasmidvektor und im besonderen ein Plasmidvektor, der in der Lage ist, autosomal zu replizieren, wodurch er die Stabilität der eingeführten doppelsträngigen Nukleinsäure erhöht.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das in der Lage ist, sequenzspezifisch an den Transkriptionsfaktor IRF-1 zu binden und vorzugsweise eine der folgenden Sequenzen hat, wobei hier nur jeweils ein Strang des doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids wiedergegeben ist und der komplementäre Strang ebenfalls umfaßt ist:

30

5'-SAAAnnnSAAAy-3' (SEQ ID NO:1),

5'-CAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:3),

5'-GAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO:5),

5'-CAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:7),
5'-GAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO:9),
5'-CAGAAAAGTGAAACCCTG-3' (SEQ ID NO:11),
5'-CAGTTTCAAATTGAAACTG-3'(SEQ ID NO:13),
5 5'-CAGGAAAAGTGAAACCGCTG-3' (SEQ ID NO:15),
5'-GCAGTTTCAAATTGAAACTGC-3' (SEQ ID NO:17),
5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3'(SEQ ID NO:19),
5'-GGCAGTTTCAAATTGAAACTGCC-3', (SEQ ID NO:21).

10 Doppelsträngige DNA-Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung haben eine Länge, Modifikationen und eventuell eine Wiederholung der spezifischen Bindungsstelle, wie im Einzelnen vorstehend beschrieben. Die optimale Länge des Cis-Element Decoys ist ausgewählt, um die Bindung an IRF-1 und die Aufnahme in die Zelle zu optimieren. Typischerweise bindet ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das kürzer als 12 bp ist, nur schwach an sein
15 Zielprotein, während ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das länger als 22 bp ist, obwohl es stark bindet, nur mit einer niedrigen Effizienz in die Zelle aufgenommen wird. Die Bindungsstärke kann durch EMSA bestimmt werden, während die Aufnahme der doppelsträngigen Nukleinsäure mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Texas-Rot) bzw. radioaktiv markierten (z.B. ³²P) Cis-Element Decoy und anschließender digitaler
20 Fluoreszenzmikroskopie bzw. Autoradiographie oder Szintigraphie analysiert werden kann. Ein Cis-Element Decoy der gegenwärtigen Erfindung kann wie oben beschrieben stabilisiert werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform der gegenwärtigen Erfindung sind Cis-Element Decoys, die eine palindromische Bindungsstelle enthalten und daher in einer kurzen doppelsträngigen
25 Nukleinsäure zumindest zwei Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen umfassen. Die palindromische Sequenz hat nicht notwendigerweise eine höhere Bindung von IRF-1 zur Folge, sondern wird schneller (effizienter) von den Zielzellen aufgenommen. Allerdings sind vor allem die kürzeren erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys wegen der langen (mittig angeordneten) Kernbindungssequenz und den repetitiven G/CAA-Motiven nur an den Enden palindromisch.
30 Für eine effizientere Aufnahme kann eine möglichst ähnliche Anzahl der einzelnen Basen (A = C = G = T) verwendet werden, jedoch ist dies für die erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys aufgrund der repetitiven G/CAA-Motive schwierig. Bevorzugt wird daher ein Kompromiss, wobei zumindest A = T und C = G sein soll. Ferner bevorzugt kann die Kernbindungssequenz

eher randständig angeordnet sein, wie dies bei einigen der bevorzugten Cis-Element Decoy-Sequenzen der Fall ist.

Ein Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung wird schnell in die Zelle aufgenommen.

- 5 Eine ausreichende Aufnahme ist durch die Modulation von einem oder mehreren Genen, das durch IRF-1 moduliert werden kann, charakterisiert. Das Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung moduliert in bevorzugter Weise die Transkription von einem Gen oder Genen nach etwa 4 Stunden der Berührung mit der Zelle, mehr bevorzugt nach etwa 2 Stunden, nach etwa 1 Stunde, nach etwa 30 Minuten und am meisten bevorzugt nach etwa 10 Minuten. Eine typische
- 10 Mischung, die in so einem Versuch eingesetzt wird, enthält 10 $\mu\text{mol/l}$ Cis-Element Decoy.

- Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Modulation der Transkription von mindestens einem Gen in CD40-exprimierenden Zellen, insbesondere in Endothelzellen, Monozyten, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, glatten Muskelzellen, Keratinozyten oder
- 15 Fibroblasten, wobei die Methode den Schritt der Kontaktierung der genannten Zellen mit einer Mischung, enthaltend eine oder mehrere doppelsträngige Nukleinsäure(n), die in der Lage sind, sequenzspezifisch an den Transkriptionsfaktor IRF-1 zu binden, umfaßt. Ein bevorzugtes Verfahren ist die Anwendung in Endothelzellen, die Teil eines Transplantates sind. Typischerweise wird die Methode an einem Transplantat *in vivo* oder *ex vivo* vor der
- 20 Implantation angewendet.

- Die Transplantate können vor der Implantation durch *ex vivo* Anwendung der Methode der gegenwärtigen Erfindung oder nach der Implantation durch *in vivo* Anwendung der Methode behandelt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das behandelte Transplantat
- 25 (Dünn-) Darm, Herz, Leber, Lunge, Niere und Pankreas bzw. eine Kombination mehrerer Organe. Die Behandlung der Organe, genauer die Perfusion/Inkubation ihrer Blutgefäße mit den erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys kann *ex vivo* mit Ausspülen der Lösung unmittelbar vor der Implantation erfolgen. Dabei kann das Organ gleichzeitig in einer entsprechenden Konservierungslösung (gekühlt) gelagert werden (z.B. University of Wisconsin Solution, Brettschneider HTK-Lösung).
- 30

Die Mischung enthaltend die erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys wird mit den Zielzellen (z.B. Endothelzellen, Monozyten, dendritische Zellen, B-Lymphozyten, glatte Muskelzellen,

Keratinocyten oder Fibroblasten) in Berührung gebracht. Das Ziel dieses In-Berührung-Bringens ist die Übertragung der Cis-Element Decoys, die IRF-1 binden, in die Zielzelle (d.h., die CD40-exprimierende Zelle). Deshalb können Nukleinsäure-Modifikation und/oder Zusatzstoffe oder Hilfsstoffe, von denen bekannt ist, dass sie die Durchdringung von Membran erhöhen, im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung benutzt werden (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 544).

Eine Mischung gemäß der Erfindung enthält in einer bevorzugten Ausführungsform nur Nukleinsäure und Puffer. Eine geeignete Konzentration der Cis-Element Decoys liegt im Bereich von zumindest 0,1 bis 100 $\mu\text{mol/L}$, vorzugsweise bei 10 $\mu\text{mol/L}$, wobei ein oder mehrere geeignete Puffer zugesetzt werden. Ein Beispiel eines solchen Puffers ist Tyrode-Lösung enthaltend 144,3 mmol/l Na^+ , 4,0 mmol/l K^+ , 138,6 mmol/l Cl^- , 1,7 mmol/l Ca^{2+} , 1,0 mmol/l Mg^{2+} , 0,4 mmol/l HPO_4^{2-} , 19,9 mmol/l HCO_3^- , 10,0 mmol/l D-Glucose.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält die Mischung zusätzlich mindestens einen Zusatzstoff und/oder Hilfsstoff. Zusatzstoffe und/oder Hilfsstoffe wie Lipid, kationische Lipide, Polymere, Liposomen, Nanopartikel, Nukleinsäure-Aptamere, Peptide und Proteine, die an DNA gebunden sind, oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind beabsichtigt, um beispielsweise die Einbringung von Nukleinsäuren in die Zelle zu erhöhen, um die Mischung auf nur eine Untergruppe von Zellen zu richten, um den Abbau der Nukleinsäure in der Zelle zu verhindern, um die Lagerung der Nukleinsäuremischung vor der Verwendung zu erleichtern. Beispiele für Peptide und Proteine oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind z.B. Antikörper, Antikörperfragmente, Liganden, Adhäsionsmoleküle, die alle modifiziert oder unmodifiziert sein können.

Zusatzstoffe, die die Cis-Element Decoys in der Zelle stabilisieren, sind beispielsweise Nukleinsäure-kondensierende Substanzen wie kationische Polymere, Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin.

Die Mischung, die in dem Verfahren der gegenwärtigen Erfindung eingesetzt wird, wird bevorzugt lokal angewendet durch Injektion, Katheter, Suppositorium ("Zäpfchen"), Aerosole (Nasen- bzw. Mundspray, Inhalation) Trokars, Projektile, pluronische Gele, Polymere, die anhaltend Medikamente freisetzen, oder jede andere Vorrichtung, die lokalen Zugang

ermöglicht. Auch die *ex vivo* Anwendung der Mischung, verwendet im Verfahren der gegenwärtigen Erfindung, erlaubt einen lokalen Zugang.

Die Inhibierung der IRF-1-Aktivität kann jedoch nicht nur auf Proteinebene in den zuvor
5 beschriebenen Verfahren gehemmt werden, sondern kann bereits vor oder bei der Translation des
Transkriptionsfaktorproteins bewirkt werden. Daher ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden
Erfindung die Bereitstellung eines Inhibitors der IRF-1-Expression als therapeutisches Mittel.
Dieser Inhibitor ist vorzugsweise ein einzelsträngiges Nukleinsäure-Molekül, ein sogenanntes
Antisense-Oligonukleotid. Antisense-Oligonukleotide können die Synthese eines Zielgens auf
10 drei verschiedenen Ebenen hemmen, bei der Transkription (Verhinderung der hnRNA-Synthese),
der Prozessierung (Spleißen) der hnRNA zur mRNA und der Translation der mRNA in Protein
an den Ribosomen. Das Verfahren zur Inhibierung der Expression von Genen mittels Antisense-
Oligonukleotiden ist Stand der Technik und den Fachleuten bestens bekannt. Vorzugsweise hat
das im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Antisense-Oligonukleotid gegen IRF-1 die
15 Sequenz 5'-CGAGTGATGGGCATGTTGGC-3' (SEQ ID NO:23) und überbrückt das
Startcodon. Weitere bevorzugte Sequenzen für Antisense-Oligonukleotide sind 5'-
GATTCGGCTGGTCGC-3' (SEQ ID NO:24), 5'-TAATCCAGATGAGCCC-3' (SEQ ID
NO:25) und 5'-GGAGCGATTCGGCTGGT-3' (SEQ ID NO:26). Das Antisense-Oligonukleotid
kann ein einzelsträngiges DNA-Molekül, RNA-Molekül oder ein DNA/RNA-Hybrid-Molekül
20 sein. Das Antisense-Oligonukleotid kann ferner eine oder mehrere modifizierte
Internukleotidbindungen aufweisen, z.B. die vorstehend für das Cis Element Decoy
beschriebenen. Bei einem durch Phosphorothioat-modifizierte Internukleotidbindungen
stabilisierten Antisense-Oligonukleotid besonders zu beachten ist, das zwischen den Basen
Cytosin und Guanin keine Phosphorothioat-modifizierte Internukleotidbindung eingeführt ist, da
25 dies zu einer IFN γ -ähnlichen Aktivierung insbesondere von immunkompetenten Zellen (z.B.
Endothelzellen) führt und somit den gewünschten Therapieeffekt zumindest teilweise
konterkarieren würde.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Antisense-Oligonukleotid, das spezifisch
30 die IRF-1-Expression inhibiert und vorzugsweise eine der folgenden Sequenzen hat:

5'-CGAGTGATGGGCATGTTGGC-3' (SEQ ID NO:23),

5'-GATTCGGCTGGTCGC-3' (SEQ ID NO:24),

5'-TAATCCAGATGAGCCC-3' (SEQ ID NO:25),

5'-GGAGCGATTCGGCTGGT-3' (SEQ ID NO:26).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung der
5 erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotide und/oder doppelsträngigen DNA-Moleküle zur
Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Therapie kardiovaskulärer
Komplikationen wie der Restenose nach perkutaner Angioplastie oder der Stenosierung von
Venenbypässen, der chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vaskulopathie) oder akuten
Transplantatabstoßung, der *graft versus host disease* (GVHD), immunologischen
10 Überempfindlichkeitsreaktionen (Allergien) insbesondere Asthma bronchiale und atopische
Dermatitis, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen insbesondere Colitis ulcerosa
und Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen insbesondere
Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Kollagenosen (z.B. systemischer Lupus erythematoses),
rheumatoide Arthritis und Vaskulitiden.. Ein besonderer Vorteil dieses Therapieansatzes besteht
15 des weiteren in der gleichzeitigen Abschwächung der TH1- und TH2-Zellantwort, bei denen der
CD40/CD154-Signalweg ko-stimulatorisch wirkt. Dadurch kann es nicht zu einer Enthemmung
der TH1-Zellreaktion (z.B. Psoriasis) bei Dämpfung der TH2-Zellreaktion (z.B. atopische
Dermatitis) bzw. umgekehrt kommen.

20 Die folgenden Figuren und Beispiele dienen nur der Erläuterung und beschränken in keiner
Weise den Umfang der Erfindung.

1. Zellkultur

Humane Endothelzellen wurden durch Behandlung mit 1,6 U/ml Dispase in Hepes- modifizierter
25 Tyrodelösung für 30 Min. bei 37°C aus Nabelschnurvenen isoliert und auf Gelatine-
beschichteten 6-Loch-Gewebekulturschalen (2 mg/ml Gelatine in 0,1 M HCl für 30 Min. bei
Umgebungstemperatur) in 1,5 ml M199 Medium, enthaltend 20% fötales Kälberserum, 50 U/ml
Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 10 U/ml Nystatin, 5 mM HEPES und 5 mM TES, 1 µg/ml
Heparin und 40 µg/ml endothelialer Wachstumsfaktor, kultiviert. Sie wurden durch ihre typische
30 Pflasterstein-Morphologie, positive Immunfärbung für von Willebrandt-Faktor (vWF) und
fluorimetrischen Nachweis (FACS) von PECAM-1 (CD31) sowie negative Immunfärbung für
glattes Muskel α -Actin (Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) identifiziert.

2. RT-PCR-Analyse

Die endotheliale gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert, daran anschließend wurde eine cDNA-Synthese mit einem Maximum von 3 µg RNA und 200 U Superscript™ II Reversetranskriptase (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 20 µl entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Für den Abgleich der cDNA-Beladung wurden 5 µl (ungefähr 75 ng cDNA) der resultierenden cDNA-Lösung und dem Primerpaar (Gibco) für Elongationsfaktor 1 (EF-1) PCR mit 1 U Taq DNA Polymerase (Gibco) in einem Gesamtvolumen von 50 µl benutzt. EF-1 diente als interner Standard für die PCR. Die PCR-Produkte wurden auf 1,5% Agarose-Gelen enthaltend 0,1% Ethidiumbromid separiert und die Intensität der Banden wurde densitometrisch mit einem CCD-Kamerasystem und der One-Dscan Gelanalyse-Software von Scanalytics (Billerica, MA, USA) bestimmt, um in nachfolgenden PCR-Analysen das Volumen der cDNA anzupassen.

Alle PCR-Reaktionen wurden einzeln für jedes Primer-Paar in einem Hybaid OmnE Thermocycler (AWG; Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die einzelnen PCR-Bedingungen für die cDNA von humanen Nabelschnurendothelzellen waren wie folgt: CD40 (Produktgröße 381 bp, 25 Zyklen, Anlagerungstemperatur 60°C, (Vorwärtsprimer) 5'-CAGAGTTCCTGAAACGGAATGCC-3' (SEQ ID NO:27), (umgekehrter Primer) 5'-TGCCTGCCTGTTGCACAACC-3'(SEQ ID NO:28); E-Selectin (Produktgröße 304 bp, 33 Zyklen, Anlagerungstemperatur 60°C, (Vorwärtsprimer) 5'-AGCAAGGCATGATGTTAACC-3' (SEQ ID NO:29), (umgekehrter Primer) 5'-GCATTCCTCTCTCCAGAGC-3' (SEQ ID NO:30); IRF-1 (Produktgröße 310 bp, 29 Zyklen, Anlagerungstemperatur 55°C, (Vorwärtsprimer) 5'-TTCCCTCTTCCACTCGGAGT-3' (SEQ ID NO:31), (umgekehrter Primer) 5'-GATATCTGGCAGGGAGTTCA-3' (SEQ ID NO:32); EF-1 (Produktgröße 220 bp, 22 Zyklen, Anlagerungstemperatur 55°C, (Vorwärtsprimer) 5'-TCTTAATCAGTGGTGAAG-3' (SEQ ID NO:33), (umgekehrter Primer) 5'-TTTGGTCAAGTTGTTTCC-3' (SEQ ID NO:34).

3. Elektrophoretic Mobility Shift Analyse (EMSA)

Die nukleären Extrakte und [³²P]-markierten doppelsträngigen Konsensus-Oligonukleotide (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland), nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Autoradiographie und Supershift-Analyse wurden wie bei Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben durchgeführt. Oligonukleotide mit der folgenden

einzelsträngigen Sequenz wurden verwendet (Kernbindungssequenzen sind unterstrichen): NF- κ B, 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' (SEQ ID NO:35); STAT-1, 5'-CATGTTATGCATATTCCTGTAAGT G-3' (SEQ ID NO:36); IRF-1, 5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3' (SEQ ID NO:19).

5

4. Decoy-Oligonukleotid (dODN) Technik

Doppelsträngige dODN wurden von den komplementären einzelsträngigen Phosphorothioat-verbundenen Oligonukleotiden (Eurogentec, Köln, Deutschland) wie bei Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben hergestellt. Die kultivierten humanen Endothelzellen wurden für 4 Stunden bei einer Konzentration von 10 μ M des jeweiligen dODN vorinkubiert. Dies waren die Bedingungen, die bereits vorher aufgrund von EMSA und RT-PCR-Analyse optimiert wurden. Danach wurde das dODN-enthaltende Medium in der Regel durch frisches Medium ersetzt. Die einzelsträngigen Sequenzen der dODN waren wie folgt (unterstrichene Buchstaben kennzeichnen Phosphorothioat-verbundene Basen, alle in 5' - 3' Richtung):

- 15 NF- κ B, AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC (SEQ ID NO:35);
 STAT-1, CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG (SEQ ID NO:36);
 IRF-1, GGAAGCGAAAATGAAATTGACT (SEQ ID NO:19);
 IRF-1n cons CAGAAAAGTGAAACCCTG (SEQ ID NO:11);
 IRF-1n mut CAGATGAGTGTAACCCTG (SEQ ID NO:37).

20

5. Antisense-Oligonukleotid-Technik

Für einen Antisense-Ansatz wurde 1 ml Kulturmedium mit 3% Lipofectin (v/v) (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss daran wurde das entsprechende Antisense-Oligonukleotid (Eurogentec, Köln, Deutschland) in einer finalen Konzentration von 0,2 μ M hinzugegeben und weitere 15 Min. bei RT inkubiert. Bei Versuchsbeginn wurden die entsprechenden Mengen Heparin und endothelialer Wachstumsfaktor hinzugefügt und das herkömmliche Zellkulturmedium der Endothelzellkultur durch das Antisense-Lipofectin-Medium ersetzt. Nach 5 Stunden wurde das Antisense-Lipofectin-Medium entfernt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Sequenz des IRF-1-Antisense-Oligonukleotid (IRF-1 AS) war 5'-CGAGTGATGGGC-ATGTTGGC-3'(SEQ ID NO:23). Als Kontrollen wurden ein Missense-Oligonukleotid (IRF-1 MS, 5'-CGAGTGGTAGACGTATTGGC-3' (SEQ ID NO: 38)) und ein Scrambled-Oligonukleotid (IRF-1 SCR, 5'-GAGCTGCTGAGGTCGTTGAG-3' (SEQ ID NO:39))

30

verwendet.

6. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die zu analysierenden Endothelzellen wurden zunächst dreimal mit je 1 ml FACS-Puffer (PBS, 2% fötales Kälberserum, sterilfiltriert) gewaschen und anschließend in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation (300xg, 5 Min., +4°C) und Bestimmung der Gesamtzellzahl (Neubauer-Zählkammer) wurde der fluoreszenz-markierte Antikörper (Pharmingen, San Diego, USA) nach Angaben des Herstellers (20 $\mu\text{l}/10^6$ Zellen) hinzugegeben und der Ansatz für 30 Min. bei +4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für 10 Min. bei 300xg und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 1 ml Cell-Fix (PBS, 1% Formaldehyd) resuspendiert und bis zur Messung (EPICS®XL-MCL, Coulter, Krefeld, Deutschland) bei +4°C im Dunkeln gelagert. Folgende Antikörper wurden verwendet: CD40, R-Phycoerythrin (R-PE)- und Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-konjugiert; PECAM-1 (CD31), Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-konjugiert. Zur Feststellung unspezifischer Zell-Antikörper-Bindungen wurden die entsprechenden R-PE- und FITC-konjugierten Isotyp-Kontrollen eingesetzt.

7. Western Blot-Analyse

Die Endothelzellen wurden durch fünfmaliges aufeinanderfolgendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C (Heizblock, Kleinfelden) aufgeschlossen. Protein-Extrakte wurden wie bei Hecker et al. (1994) Biochem J. 299, 247 beschrieben hergestellt. 20-30 μg Protein wurden mit Hilfe einer 10%igen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in der Gegenwart von SDS nach Standardprotokoll aufgetrennt und auf eine BioTrace™ Polyvinylidene Fluoride Transfermembran (Pall Corporation, Roßdorf, Deutschland) transferiert. Zum Nachweis von CD40 Protein wurde ein gegen den C-Terminus gerichteter polyklonaler primärer Antikörper (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA) verwendet. Die Proteinbanden wurden nach Hinzufügen eines Peroxidase-gekoppelter-Anti-Kaninchen-IgG (1:3000, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), durch die Chemilumineszenz-Methode (SuperSignal Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) verbunden mit nachfolgender Autoradiographie (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) nachgewiesen. Der Auftrag und Transfer gleicher Proteinmengen wurde durch Färben des Blots mit blauer Tinte gezeigt.

8. Statistische Analyse

Wenn nicht anders angezeigt, sind alle Daten in Figuren und Text als Mittelwert \pm SEM von n Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung wurde mit dem Students t-Test für ungepaarte Daten mit einem P-Wert <0.05 , der als statistisch signifikant angesehen wurde, durchgeführt.

9. Tierexperimenteller Nachweis der CD40/CD154-assoziierten Transplantatabstoßung

Experimentell nachgewiesen wurde die Transplantatabstoßung in der Ratte unter Verwendung eines Stat-1-Decoy-Oligonukleotides, da bei der Ratte Stat-1 anstelle von IRF-1 wie beim Menschen für die Interferon- γ -induzierte CD40-Expression verantwortlich ist (Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191).

Stammkombination

Zur allogenen Transplantation wurde die Stammkombination Brown Norway-Spender auf Lewis-Empfänger verwendet. Hierbei kam es ohne Immunsuppression nach 7 Tagen zur Abstoßung des Transplantates. Als syngene Kontrollen diente die Transplantation Lewis auf Lewis.

Explantation

In Etherinhalationsnarkose wurde das Abdomen des Tieres in der Mittellinie eröffnet. Zunächst wurde ein Aortasegment von allen arteriellen Abgängen befreit, so dass ein ca. 1 cm langes aortales Segment mit angehender Arteria mesenterica präpariert wurde. Im nächsten Schritt wurde das gesamte Kolon entfernt. Danach wurden alle venösen Zuflüsse der Pfortader in Höhe des Pankreas ligiert, so dass die Pfortader bis in den Leberhilus frei war. Der so präparierte Spenderdünndarm hing jetzt lediglich an dem Gefäßstiel der Aorta und der Pfortader. Nun wurde die Aorta proximal und distal des Abganges der Arteria mesenterica abgeklemmt, die Pfortader in Höhe des Leberhilus durchtrennt und das Gefäßbett des Dünndarmes mit kalter University of Wisconsin (UW)-Lösung gespült bis sich keine makroskopischen Blutreste mehr im Gefäßbett befanden. Im letzten Schritt wurde das Darmlumen ebenfalls mit kalter UW-Lösung gespült und der Darm mit einem Aortasegment entnommen und bis zur Implantation in kalter UW-Lösung aufbewahrt (Dauer bis 120 Minuten). Bei Behandlung des Transplantates mit dem Stat-1-Decoy-Oligonukleotid (Sequenz: CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG; (SEQ ID NO:36) oder dem entsprechenden mutierten Kontroll-Oligonukleotid (Sequenz:

CATGTTATGCAGACCGTAGTAAGTG (SEQ ID NO:40), wurden diese in Ringer-Lösung (enthaltend 145 mmol/l Na⁺, 5 mmol/l K⁺, 156 mmol/l Cl⁻, 2 mmol/l Ca²⁺, 1 mmol/l Mg²⁺, 10 mmol/l Hepes, 10 mmol/l D-Glucose, pH 7,4) gelöst in die Arteria mesenterica infundiert (Volumen 3 ml, Endkonzentration 20 µmol/L) und erst unmittelbar vor der Anastomosierung mit
5 Ringer-Lösung ausgewaschen.

Implantation

In Etherinhalationsnarkose wurde das Abdomen in der Mittellinie eröffnet. Es wurden die Aorta und Vena cava dargestellt und simultan abgeklemmt. Der Gefäßanschluß erfolgte End-zu-Seit in
10 fortlaufender Nahttechnik mittels eines 8-0 Nylonfadens. Es wurden das die Arteria mesenterica tragende Aortasegment an der infrarenale Aorta und die Pfortader an die infrarenale Vena cava anastomosiert. Nach Freigabe der Zirkulation wurde das terminale Ileum des Spenderdarmen ebenfalls End-zu-Seit an das terminale Ileum des Empfängerdarmes mittels eines 6-0 Nylonfadens angeschlossen. So wurde der vom Spenderdarm produziert Mukus in die normale
15 Passage des Tieres abgeleitet. Das orale Ende des Spenderdarmes wurde mittels Ligatur verschlossen und das Abdomen zweischichtig fortlaufend verschlossen. Postoperativ erhielten die Tiere zur Analgesie Temgesic in das Trinkwasser.

Intravitalmikroskopie

20 Eine Beurteilung der Bedeutung der Leukozyten-Endothel-Interaktion für die Entzündungsreaktion war nur durch intravitalmikroskopische Analysen möglich. Diese Methode ermöglichte eine Beobachtung des „Rollens und Adhrierens“ von Leukozyten am Endothel in vivo sowie eine quantitative Analyse mikrovaskulärer Parameter (Perfusion des Gewebes, Funktionelle Kapillardichte und Blutfluss).

25

Durchgeführt wurde die Intravitalmikroskopie mit einem AxioTech Vario 100 Mikroskop von Zeiss (Göttingen), ausgestattet mit einer HBO 100 Quecksilber-Lampe für Epifluoreszenz-Messungen. Durch den Einsatz von 10×, 20× und 40× (Wasser-Immersion) Objektiven wurden Auflösungen von 243×, 476× und 933× erreicht. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer
30 CCD Video-Kamera (CF 8/1, Kappa) aufgenommen und für die spätere Auswertung auf einem Videoband festgehalten.

Sieben Tage nach der Transplantation wurden die Ratten (6 Tiere pro Gruppe) in tiefer

Diethylether-Narkose intravitalmikroskopisch untersucht. Um die Atmung zu erleichtern wurde die Trachea kanüliert. Ein Polyurethan-Katheter wurde zur permanenten Überprüfung des Blutdrucks und Vereinfachung der Applikation von Farbstoffen in die Arteria carotis gelegt. Die Körpertemperatur der Tiere wurde durch eine beheizbare Platte konstant gehalten. Durch einen ventral-median angelegten Schnitt wurden die Tiere eröffnet, das Colon descendens ausgelagert, antimesenterial ein kleiner Schnitt gesetzt und der Darm in einer speziellen Halterung zur Erleichterung des Mikroskopierens befestigt. Um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern, wurde der Darm permanent mit Ringer-Lösung benetzt. Durch die Injektion von 0,8 ml 0,5% FITC- (Fluorescein-Isothiocyanat) gekoppeltem Dextran wurde die intestinale Mikrozirkulation sichtbar gemacht. Um die Messungen statistisch abzusichern, wurden mindestens zehn verschiedene Bereiche des entsprechenden Darmabschnittes untersucht. Quantifiziert wurden die verschiedenen Parameter folgendermaßen: Der Perfusions-Index ergab sich aus den perfundierten Mukosa-Arealen (in %) + 0,5× aller unregelmäßig perfundierten Mukosa-Areale (in %). Die funktionelle Kapillardichte wurde durch eine Computer-unterstützte Image-Analyse (CAP-IMAGE Software, Zeintl, Heidelberg) ermittelt. Zur Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen wurden die Leukozyten durch die Injektion von 0,2 ml 0,1% Rhodamine-6 G (Sigma, Heidelberg) markiert und postkapiläre Venolen in der Submukosa mikroskopiert. Als adhärenente Leukozyten („Sticker“) wurden Leukozyten definiert, die in einem Gefäßsegment von 100 µm Länge mindestens 20 Sek. am Endothel hafteten. Kalkuliert wurden Zahl der Sticker/ mm² Endotheloberfläche. Die Endotheloberfläche ergab sich aus der Oberflächenberechnung für einen Zylinder.

Dünndarmtransplantation – Ergebnis

Die mukosale funktionelle Kapillardichte, als Maß für die Perfusion, war sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in der mit mutierten Kontroll-Oligonukleotid behandelten Gruppe bis auf 10% der Werte von syngen transplantierten Dünndärmen ohne Abstoßung verringert. Im Vergleich dazu war die funktionelle Kapillardichte um den Faktor 4 erhöht in mit dem Stat-1 Cis-Element Decoy behandelten Dünndärmen. Der Blutfluss (Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten) war in diesen Tieren 10-fach und der Perfusionsindex 3-fach erhöht. Der Staseindex wurde um 60% und die Anzahl der am Endothel haftenden Leukozyten um 25% reduziert. Nur der letztgenannte Parameter war nicht statistisch signifikant verändert. Insgesamt war die abstoßungsbedingte Verminderung der Darmperfusion und damit die Degeneration des Transplantates in der mit dem Cis-Element Decoy behandelten Gruppe also deutlich reduziert.

Patentansprüche

1. Ein Inhibitor der IRF-1-Expression und/oder -Aktivität als therapeutische Substanz.
- 5 2. Inhibitor nach Anspruch 1, wobei der Inhibitor ein doppelsträngiges DNA-Molekül ist und die IRF-1-Aktivität inhibiert.
3. Inhibitor nach Anspruch 2 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 bis 22.
- 10 4. Inhibitor nach Anspruch 2 oder 3, wobei das doppelsträngige DNA-Molekül modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.
5. Inhibitor nach Anspruch 1, wobei der Inhibitor ein Antisense-Oligonukleotid ist und die IRF-1-Expression inhibiert.
- 15 6. Inhibitor nach Anspruch 5 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 23 bis 26.
7. Inhibitor nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Antisense-Oligonukleotid modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.
- 20 8. Verwendung eines Inhibitors der IRF-1-Expression und/oder -Aktivität zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie kardiovaskulärer Komplikationen wie der Restenose nach perkutaner Angioplastie oder der Stenosierung von Venenbypässen, der chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vaskulopathie) oder akuten Transplantatabstoßung, der *graft versus host disease* (GVHD), immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen (Allergien) insbesondere Asthma bronchiale und atopische Dermatitis, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen insbesondere Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen insbesondere Diabetes mellitus, multiple Sklerose, 25 Kollagenosen (z.B. systemischer Lupus erythematodes), rheumatoide Arthritis und 30 Vaskulitiden.

9. Ein Antisense-Oligonukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:23 bis 26.
- 5 10. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 9, wobei das Antisense-Oligonukleotid modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.
11. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 bis 21.
- 10 12. Doppelsträngiges DNA-Molekül nach Anspruch 11, wobei das doppelsträngige DNA-Molekül modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.

FIG. 1

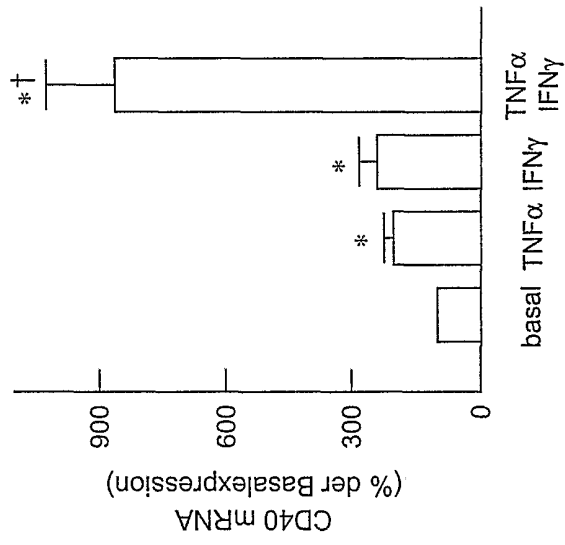


FIG. 2

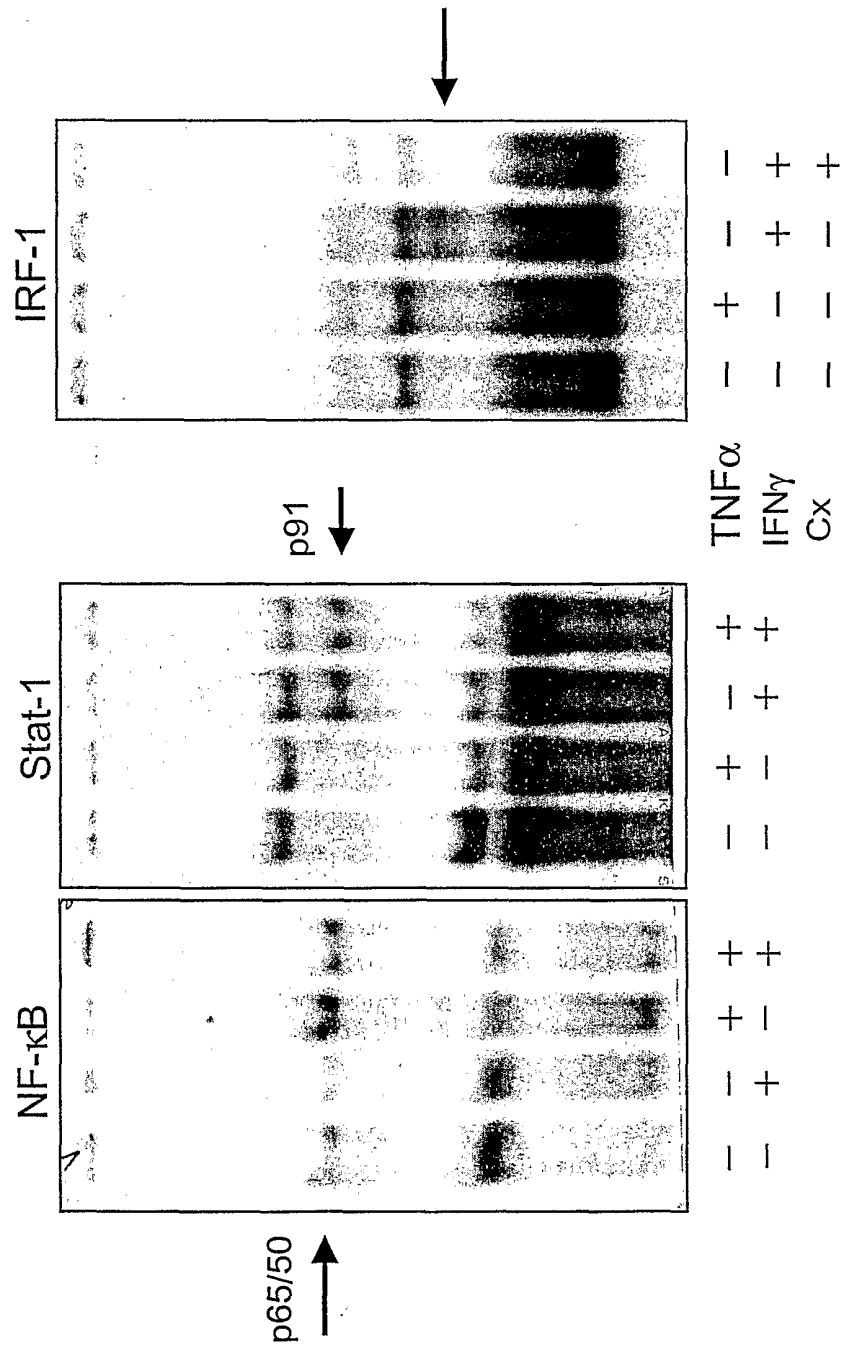


FIG. 3

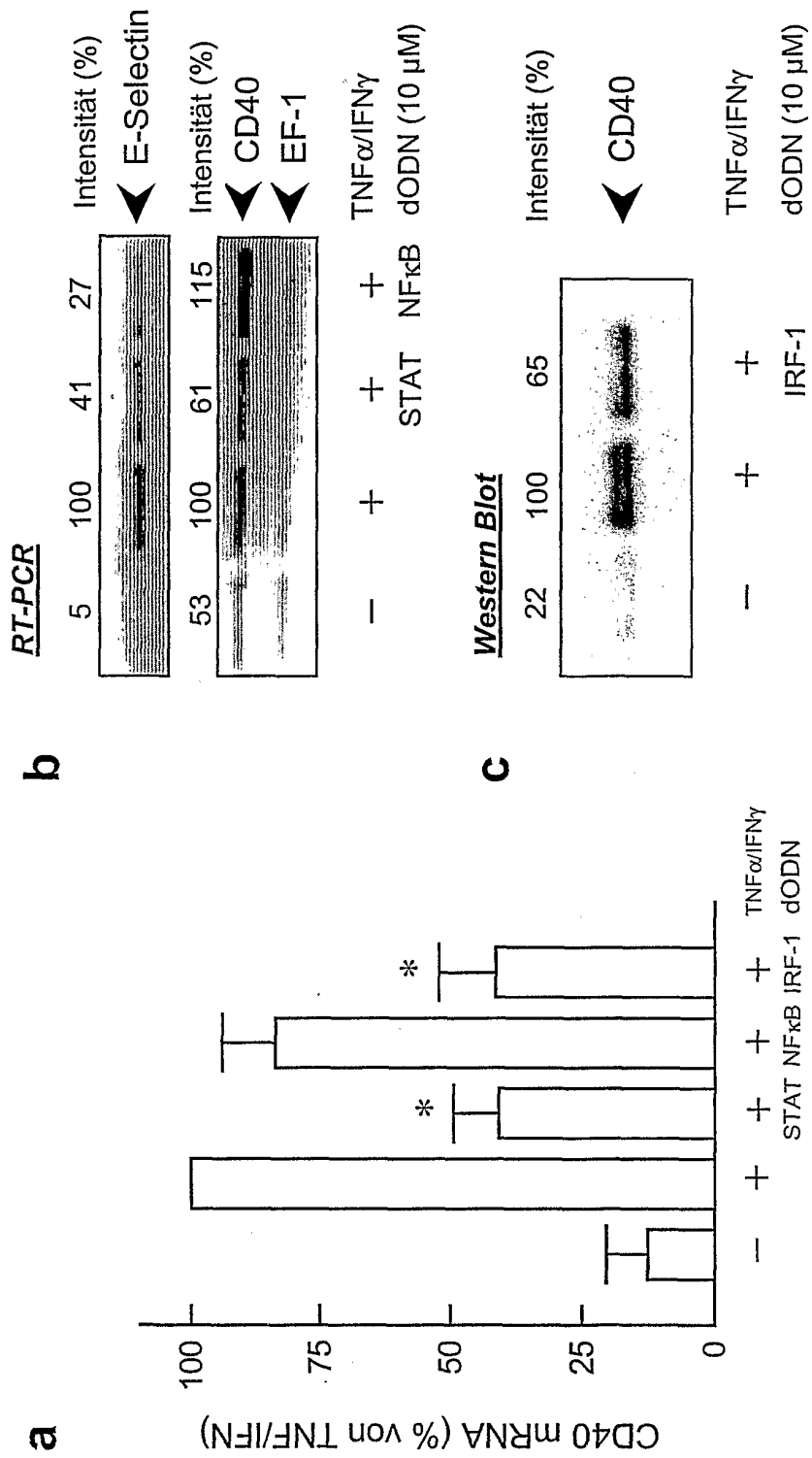


FIG. 4

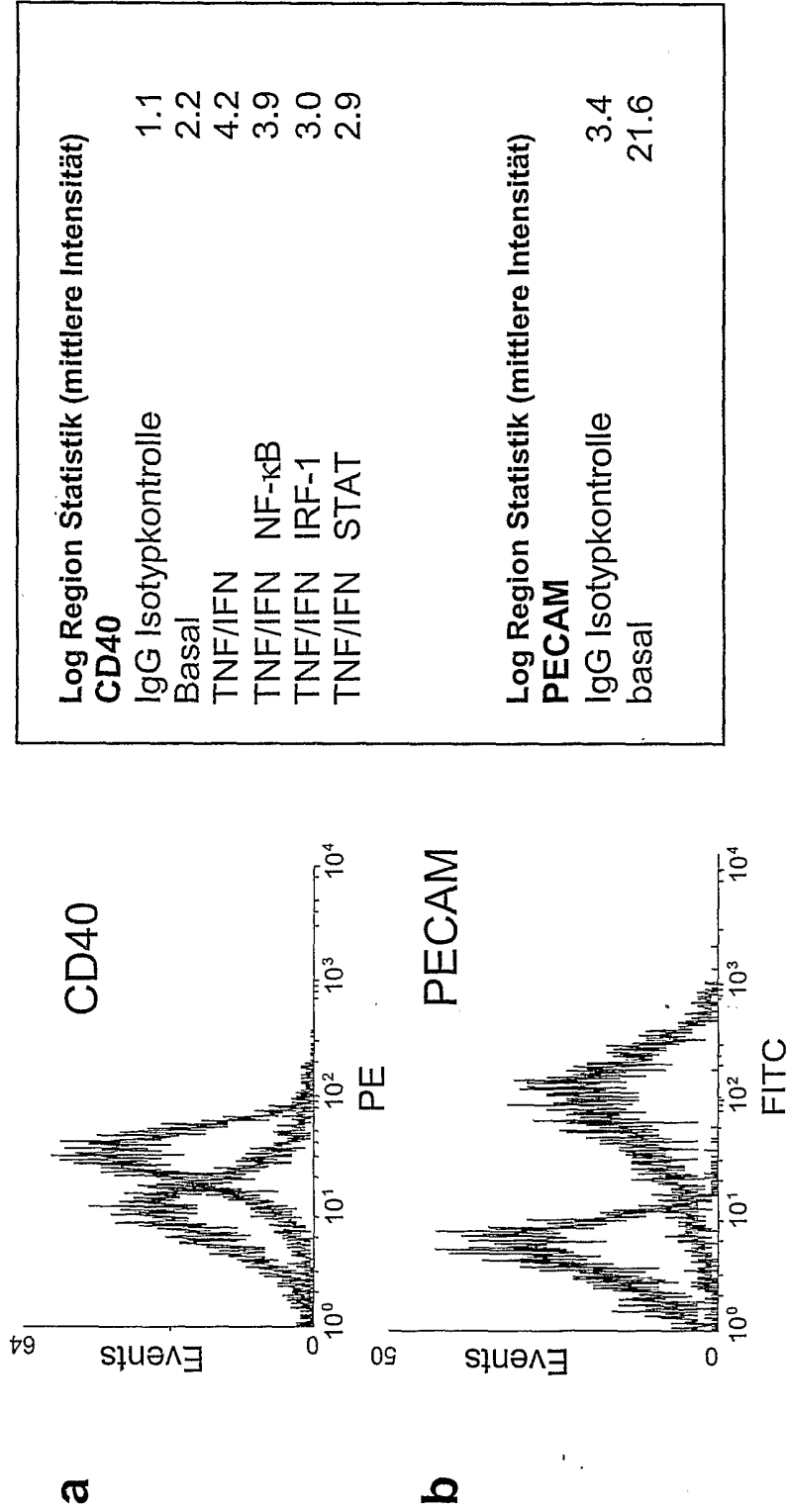


FIG. 5

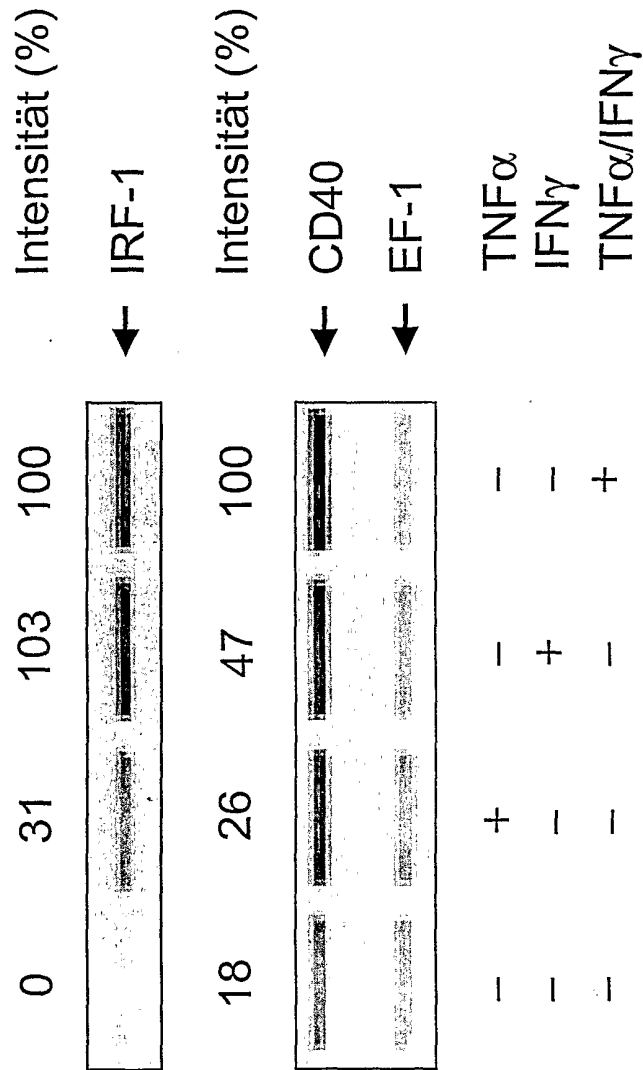


FIG. 6

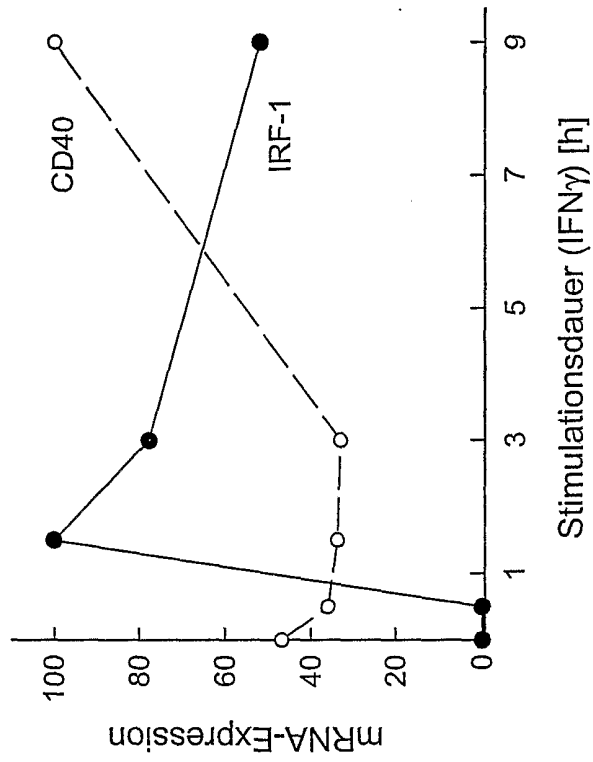


FIG. 7

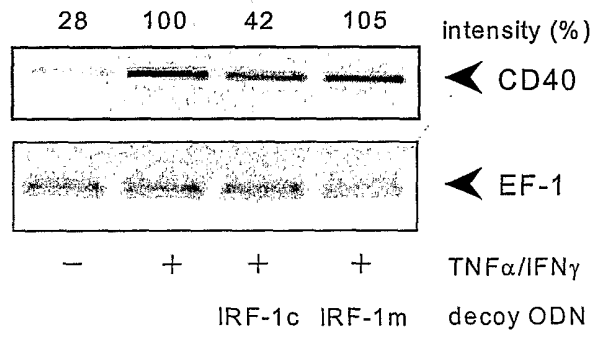


FIG:8

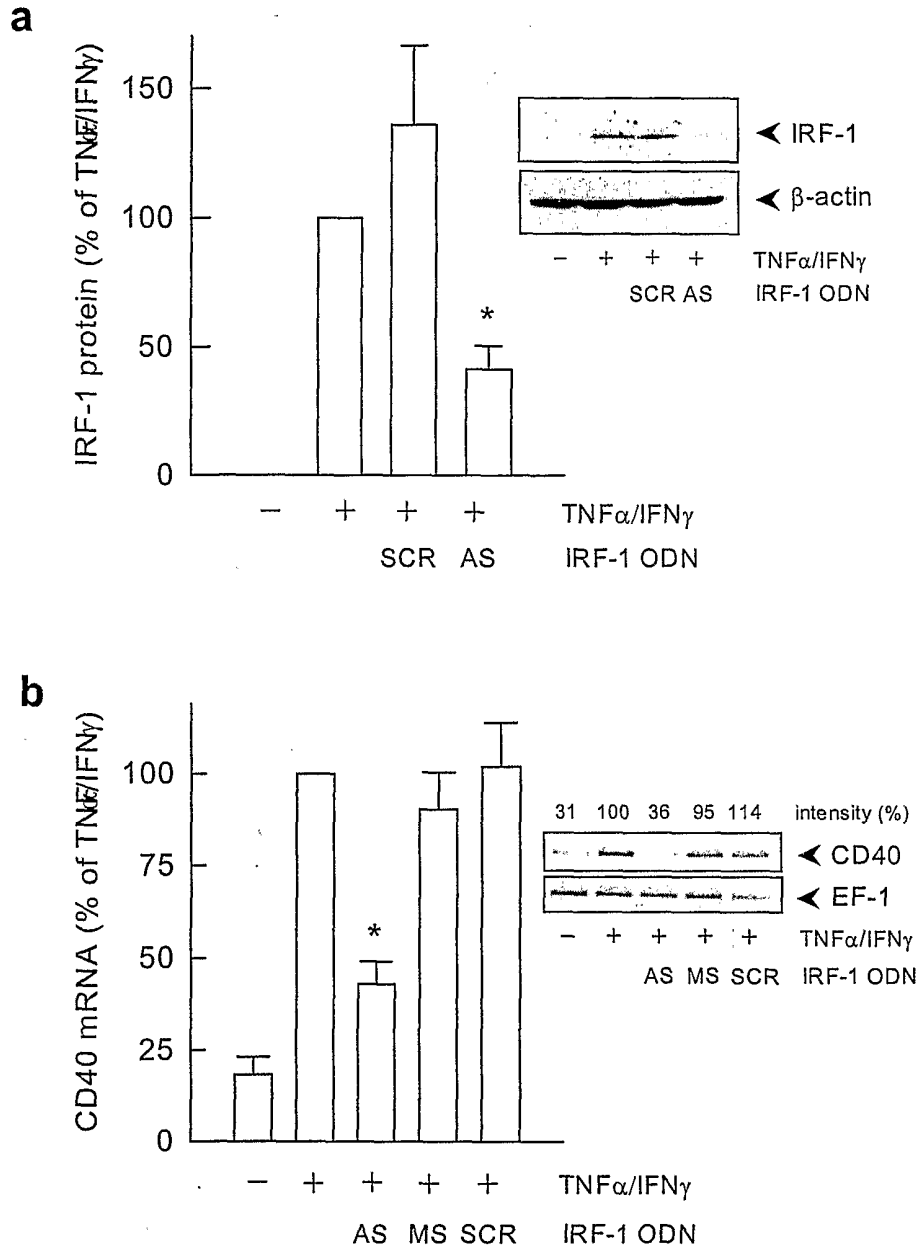
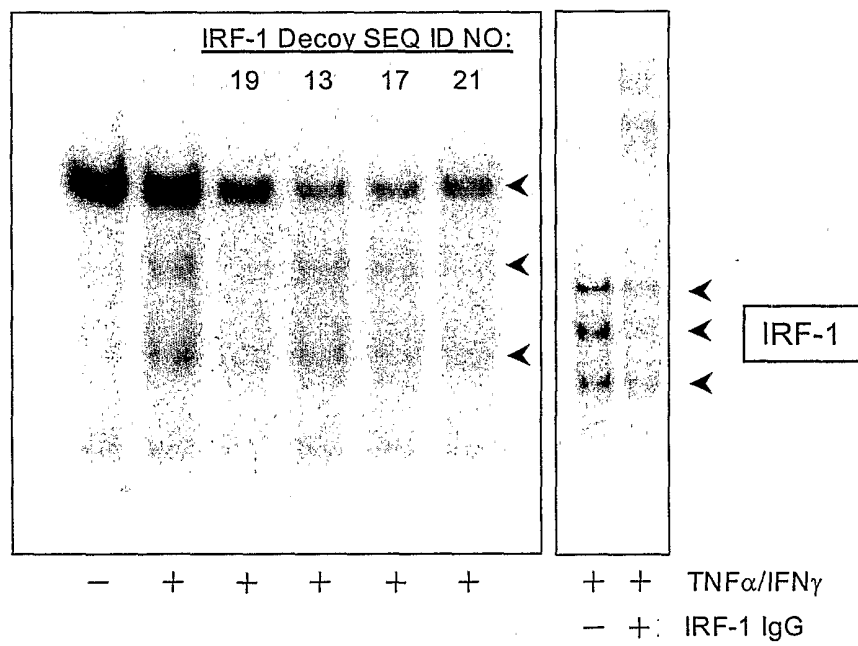


FIG. 9



1

SEQUENCE LISTING

<110> Hecker, Markus
Wagner, Andreas

<120> Modulation der Transkription pro-inflammatorischer Genprodukte

<130> HEC-001 PCT

<140> unknown

<141> 2001-10-06

<150> DE 100 49 549.4

<151> 2000-10-06

<150> DE 100 59 144.2

<151> 2000-11-29

<160> 40

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(7)

<223> g,a,c or t

<400> 1

saaannnsaa ayy

13

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(9)

<223> g.a.c or t(u)

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(9)

<223> g.a.c or t

<400> 2

yytttsnnt tts

13

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3

caaaagcgaa acc

13

<210> 4

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

ggtttcgctt ttg

13

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5

gaaaagcgaa acc

13

<210> 6

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6

ggtttcgctt ttc

13

<210> 7

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7

caaaagtgaa acc

13

<210> 8

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 8

ggtttcactt ttg

13

<210> 9

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 9

gaaaagtgaa acc

13

<210> 10

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 10

ggtttcactt ttc

13

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 11

cagaaaagtg aaaccctg

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 12

cagggtttca cttttctg

18

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 13

cagtttcaaa ttgaaactg

19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 14

cagtttcaat ttgaaactg

19

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 15

caggaaaagt gaaaccgctg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 16

cagcggtttc acttttcctg

20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 17

gcagtttcaa attgaaactg c

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 18

gcagtttcaa tttgaaactg c

21

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 19

ggaagcgaaa atgaaattga ct

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 20

agtcaatttc attttcgctt cc

22

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 21

ggcagtttca aattgaaact gcc

23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 22

ggcagtttca atttgaaact gcc

23

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 23

cgagtgatgg gcatgttggc

20

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 24

gattcggctg gtcgc

15

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 25

taatccagat gagccc

16

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 26

ggagcgattc ggctggt

17

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 27

cagagttcac tgaaacggaa tgcc

24

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 28
tgccctgcctg ttgcacaacc 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 29
agcaaggcat gatgttaacc 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 30
gcattcctct cttccagagc 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 31
ttccctcttc cactcggagt 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 32
gatatctggc agggagtcca 20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 33

tcttaatcag tggtggaag

19

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 34

tttgggtcaag ttgtttcc

18

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 35

agttgagggg actttcccag gc

22

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 36

catggttatgc atattcctgt aagt

24

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 37

cagatgagtg taaccctg

18

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 38

cgagtggtag acgtattggc

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 39

gagctgctga ggtcgttgag

20

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 40

catggtatgc agaccgtagt aagtg

25