



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 692**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07722435 .0**

96 Fecha de presentación : **11.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2027266**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **Multímero para la inmunoestimulación.**

30 Prioridad: **11.05.2006 DE 10 2006 023 332**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.04.2011

73 Titular/es: **MOLOGEN AG.**
Fabeckstrasse 30
14195 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Schroff, Matthias;**
Wittig, Burghardt;
Schmidt, Manuel y
Löhr, Janine

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 692 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

Múltimero para la inmunestimulación.

5 La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico no codificante multimérica para la modulación de la actividad del sistema inmune humano o animal así como a un procedimiento de preparación de la misma y a una vacuna que contiene la molécula de ácido nucleico no codificante multimérica.

10 Mientras que la respuesta inmune adaptativa después de la selección de los linfocitos específicos para el respectivo patógeno y su expansión clonal y diferenciación hasta células efectoras aparece tan sólo de forma retardada (3-5 días) y, sin embargo, después ofrece una protección de larga duración contra el respectivo patógeno mediante configuración de una “memoria inmunológica”, las células del sistema inmune innato reconocen los patógenos mediante patrones moleculares asociados a patógeno (pathogen associated molecular patterns = PAMP) conservados con receptores codificados por células germinales y reaccionan inmediatamente. A las diferentes reacciones para los diversos tipos celulares pertenecen la secreción de citocinas (por ejemplo, IL-1, IL-6, TNF- α) y quimiocinas (por ejemplo, IL-8/CXCL8, MIP-1 α/β , MCP-1), activación de mecanismos efectoras (fagocitosis, estallido respiratorio, liberación de sustancias bactericidas o gránulos líticos), expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) así como expresión aumentada de moléculas de CMH. De este modo por un lado se reclutan y activan células efectoras que pueden eliminar el patógeno que ha penetrado y por otro lado las células del sistema inmune adaptativo obtienen las señales necesarias para su activación.

20 Para la generación de una respuesta inmune mejorada se utilizaron oligonucleótidos CpG (ODN-CpG) como nueva clase de moléculas inmunomoduladoras. Tales motivos CG no metilados aparecen en el ADN bacteriano y representan para el sistema inmune una “señal de peligro”. Como “patrón molecular asociado a patógeno” (PAMP) llevan a cabo sobre todo la activación inespecífica del sistema inmune innato (Krieg, Nat. Med 2003, 9: 831-835).

Los ODN-CpG inducen mediante las citocinas interleucina-12, interferón-gamma y factor de necrosis tumoral alfa una respuesta inmune marcada por T_H1.

30 Las secuencias de ácido nucleico inmunestimuladoras (ISS) que llevan los ODN-CpG conocidos solamente tienen algunas bases de longitud y no actúan mediante la expresión de proteínas codificadas en las mismas.

35 En el caso de las ISS se trata de moléculas de ácido nucleico cerradas covalentemente. Están compuestas de oligonucleótidos, cuyas bases se pueden emparejar consigo mismo parcialmente y uno o dos bucles de horquilla (loop) que comprenden 30 bases y que contienen varios motivos CG y que se denominan por lo demás moléculas portadoras.

40 La fuerte estimulación de la respuesta inmune celular posibilita influir sobre circuitos de, que sin intervención no conducen a una actividad inmune satisfactoria para el paciente.

La modificación de ODN-CpG con cadena principal de fosforotioato, tal como se utiliza para la estabilización de “ADN-CpG”, presenta algunas desventajas agravantes. A éstas pertenecen particularmente la toxicidad observada [Heikenwalder 2004, Levin 1999] así como la unión inespecífica a proteínas [Brown 1994].

45 Por este motivo se desarrolló una nueva clase de ADN inmunestimulador cerrado covalentemente (documento EP 1196178). Estas moléculas de ADN están compuestas de dos moléculas de ADN sintetizadas químicamente, que presentan una región auto-complementaria en el extremo 5' y en el 3' con extremos palindrómicos, solapantes, de tal forma que mediante la ligación de las dos moléculas de ADN se produce una molécula cerrada covalentemente. Estas moléculas de ADN con motivos CG en la región no complementaria muestran una actividad similar a ODN-CpG (expresión aumentada de las moléculas de superficie CD80, CD40, CMH en linfocitos B y secreción de IL-6, IFN- γ , IFN- α , IL-12, TNF α por PBMC), sin embargo presentan en comparación con ODN-CpG con cadena principal de fosforotioato diferencias en el patrón de expresión y una toxicidad claramente menor en ratones. Sin embargo, este ADN inmunestimulador del estado de la técnica presenta con respecto a la modulación de la actividad del sistema inmune humano o animal algunas desventajas. No siempre es posible modular, particularmente activar, la actividad del sistema inmune humano o animal con la intensidad deseada.

60 Partiendo de este estado de la técnica es objetivo de la presente invención proporcionar moléculas de ADN inmunestimuladoras adecuadas, que sean capaces de desencadenar una respuesta inmune mejorada, así como un procedimiento para su preparación así como vacunas que contienen estas moléculas de ADN inmunestimuladoras.

65 La inmunestimulación significa en el contexto de la presente invención que las células mediadoras y efectoras del sistema inmune, es decir, sobre todo los timocitos conocidos actualmente con función auxiliar y los timocitos citotóxicos, linfocitos B y los denominados linfocitos NK (linfocitos citolíticos naturales), macrófagos y monocitos así como células dendríticas y sus precursores, así como poblaciones celulares hasta ahora no aclaradas en cuanto a su función con funciones dentro del sistema inmune, se estimulan mediante el uso de moléculas de ácido nucleico para la proliferación, migración, diferenciación o actividad. Inmunomodulación quiere decir que además de una estimulación general en el sentido que se ha definido anteriormente también se influye en el tipo o el carácter de una reacción

ES 2 357 692 T3

inmune, bien sea que se vea afectada por ello una reacción inmune que se encuentra en generación o maduración, bien sea que una reacción ya establecida se modifique en su carácter.

La presente invención resuelve el objetivo proporcionando una molécula de ácido nucleico no codificante multi-
5 mérica. La molécula multimérica se puede preparar mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- proporción de una secuencia de ácido oligodesoxirribonucleico 5-fosforilado en agua,
- liofilización hasta que se obtiene un residuo seco y a continuación resuspensión en una solución tampón,
- 10 - adición de una ADNligasa de T4, por lo que se forma una mezcla de reacción e
- incubación de la mezcla de reacción a 37°C durante al menos 30 minutos.

15 Fue completamente sorprendente que la secuencia de las etapas que se han mencionado condujera a una molécula multimérica que se puede usar mejor que las moléculas del estado para la modulación de la actividad del sistema inmune humano o animal. Una molécula multimérica en el sentido de la invención es una molécula esencialmente de ácido desoxirribonucleico, presentando la molécula de ácido nucleico preferentemente una longitud de al menos 100 nucleótidos, preferentemente 200, más preferentemente más de 300. Mientras que en el documento EP 1 196 178 se
20 desvelan moléculas que se pueden denominar monómero con su estructura de tallo-bucle, mediante el procedimiento de acuerdo con la invención se proporcionan moléculas en las que varias de estas estructuras monoméricas de tallo-bucle se ensamblan hasta estructuras multiméricas u oligoméricas. Los ensamblados obtenidos son sorprendentemente eficaces en la modulación del sistema inmune. Además fue sorprendente que las etapas del procedimiento que se han mencionado anteriormente en sí sencillas y típicas de laboratorio conducen a la configuración de estructuras eficaces.
25 En comparación con las estructuras de acuerdo con el documento EP 1 196 178, las moléculas multiméricas de acuerdo con la invención representan complejos moleculares tempranos.

En una realización preferente de la invención, el ensamblado oligomérico o multimérico, es decir, la molécula de acuerdo con la invención, se caracteriza porque la secuencia de ácido oligodesoxirribonucleico comprende las
30 siguientes secuencias

- a) GTTCCTGGAG ACGTTCTTAG GAACGTTCTC CTTGACGTTG GAGAGAAC o
- b) ACCTTCCTTG TACTAACGTT GCCTCAAGGA AGGTTGATCT TCATAACGTT GCCTAGATCA o
- 35 c) comprende una secuencia de ácido oligodesoxirribonucleico con la secuencia de bases AACG TTCTTC GGGG CGTT
- d) y presentando la secuencia de ácido oligodesoxirribonucleico una longitud de 40 a 1.600 nucleótidos.

40 Los ensamblados multiméricos en el sentido de la invención que presentan las secuencias preferentes son particularmente adecuados en el ámbito del animal doméstico y humano para estimular la actividad del sistema inmune.

45 Es particularmente preferente que la secuencia de bases de acuerdo con la característica c) esté contenida en la secuencia CCTAGGGGTT ACCACCTTCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGTTCTTAGG TGGTAACC CC TAGGGGTT ACCACCTTCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGTTCTTAGG TGGTAACC. De forma sorprendente, la presencia de esta secuencia conduce a un efecto particularmente bueno de la molécula, teniendo que entenderse por efecto en el sentido de la invención la activación del sistema inmune.

50 En una realización preferente adicional de la invención está previsto que la molécula comprenda una cadena parcialmente monocatenaria, covalentemente cerrada de restos de desoxirribonucleósido. Dentro de la estructura oligomérica o polimérica ensamblada de la molécula, la cadena parcialmente monocatenaria cerrada covalentemente de restos de desoxirribonucleósido es responsable de que la molécula actúe de forma eficaz a lo largo de un periodo de
55 tiempo prologado en el organismo diana en el que se introduce.

En una realización preferente adicional de la invención está previsto que la molécula comprenda la secuencia de bases $N^1N^2CGN^3N^4$, siendo N^1N^2 un elemento del grupo GT, GG, GA, AT o AA, N^3N^4 , un elemento del grupo CT o TT, así como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina y T desoxitimidina.

60 En una realización muy particularmente preferente está previsto que la secuencia de bases $N^1N^2CGN^3N^4$ esté colocada en la región monocatenaria de la cadena cerrada de restos de desoxirribonucleósido. Particularmente estas moléculas preferentes muestran una acción muy eficaz en la estimulación del sistema inmune.

65 La invención también se refiere a la molécula inventiva que está unida covalentemente con varios sustituyentes, siendo los sustituyentes preferentemente péptidos, proteínas, sacáridos, estructuras antigénicas, moléculas de ADN y/o ARN.

ES 2 357 692 T3

La invención también se refiere a un agente de combinación, que comprende al menos una molécula de acuerdo con la invención y un agente quimioterapéutico. Fue sorprendente que la estimulación sorprendentemente alta del sistema inmune se puede volver a mejorar mediante la molécula de acuerdo con la invención cuando el agente de acuerdo con la invención se combina con agentes quimioterapéuticos conocidos y el agente de combinación se utiliza contra tumores. El agente de combinación en el sentido de la invención también puede estar presente como kit, en el que la molécula de acuerdo con la invención y el agente quimioterapéutico de acuerdo con el estado de la técnica están presentes de forma independiente. De este modo, en realizaciones preferentes se pueden aplicar los al menos dos constituyentes del kit simultáneamente o con desfase en el tiempo. Por ejemplo, la administración del agente de combinación de acuerdo con la invención puede activar el sistema inmune de tal forma que una aplicación posterior de un agente quimioterapéutico puede desempeñar de forma particularmente eficaz su acción. Sin embargo, evidentemente también es posible que en primer lugar se aplique el agente quimioterapéutico y a continuación con desfase en el tiempo de esto se administre la molécula de acuerdo con la invención al organismo humano o animal. En determinados tumores se prefiere la administración simultánea de la molécula de acuerdo con la invención y el agente quimioterapéutico.

En una realización preferente de la invención, el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que comprende anticuerpos, alquilantes, análogos de platino, intercaladores, antibióticos, inhibidores de la mitosis, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos y/o *L*-asparaginasa, hidroxicarbamida, mitotano y/o amantina.

En una realización preferente de la invención, los alquilantes se seleccionan entre el grupo que comprende

- derivados de mostaza de nitrógeno, particularmente
- ciclofosfamida,
- ifosfamida,
- trofosfamida,
- melfalan y/o
- clorambucilo
- alquilsulfonatos, particularmente
- busulfan y/o
- treosulfan
- nitrosoureas, particularmente
- carmustina,
- lomustina,
- nimustina,
- estramustina y/o
- estreptozotocina
- procarbazona y dacarbazona
- temozolomida y/o
- tiotepa.

Los alquilantes actúan particularmente bien sobre tumores, por lo que inhiben su crecimiento.

En una realización preferente de la invención, los análogos de platino se seleccionan entre el grupo que comprende:

- cisplatino,
- carboplatino y/o
- oxaliplatino.

ES 2 357 692 T3

En una realización preferente adicional de la invención está previsto que los intercaladores se seleccionen entre el grupo que comprende:

- 5 - antraciclinas, particularmente
- doxorubicina (adriamicina),
- daunorrubicina,
- 10 - epirubicina y/o
- idarrubicina,
- mitoxantrona,
- 15 - amsacrina y/o
- doxilfluridina.

20 En una realización preferente adicional de la invención está previsto que los antibióticos se seleccionen entre el grupo que comprende:

- bleomicina,
- 25 - actinomicina D (dactinomicina) y/o
- mitomicina.

30 Además, en una realización preferente adicional de la invención puede ser ventajoso que los inhibidores de la mitosis se seleccionen entre el grupo que comprende:

- alcaloides de la *Vinca rosea*, particularmente
- vinorelbina,
- 35 - vincristina (oncovina),
- vinblastina y/o
- 40 - vindesina.

En una realización particularmente preferente adicional de la invención, los taxanos se seleccionan entre el grupo que comprende:

- 45 - paclitaxel y/o
- docetaxel.

Además puede preferirse que los inhibidores de la topoisomerasa se seleccionen entre el grupo que comprende:

- 50 - inhibidores de la topoisomerasa-I, particularmente
- camptotecina,
- 55 - topotecan y/o
- irinotecan y/o
- inhibidores de la topoisomerasa-II, particularmente
- 60 - etopósido
- tenipósido.

65 Adicionalmente se prefiere que en una realización particular de la invención los antimetabolitos se seleccionen entre el grupo que comprende:

- antagonista de ácido fólico, particularmente

ES 2 357 692 T3

- metotrexato,
- análogos de pirimidina, particularmente
- 5 - 5-fluorouracilo,
- capecitabina,
- arabinósido de citosina (citarabina) y/o
- 10 - gemcitabina,
- análogos de purina, particularmente
- 15 - 6-tioguanina,
- pentostatina,
- azatioprina,
- 20 - 6-mercaptopurina,
- fludarabina y/o
- 25 - cladribina.

La invención también se refiere a un kit que comprende la molécula de acuerdo con la invención y el agente quimioterapéutico, eventualmente con una información para la combinación de los contenidos del kit. Sin embargo, la invención también se refiere - como ya se ha indicado - a un agente farmacéutico que comprende la molécula de acuerdo con la invención o el agente de combinación eventualmente con un vehículo farmacéuticamente compatible.

La invención se refiere además al uso de la molécula, del agente de combinación o del agente farmacéutico para la fabricación de un agente para la modulación de un sistema inmune humano o animal o para la modulación de la actividad de este sistema inmune. Por modulación del sistema inmune humano o animal se entiende cualquier influencia sobre el sistema inmune que conduce a que el sistema inmune actúe de forma particularmente inhibidora sobre tumores o sobre cáncer. La modulación de la actividad del sistema inmune puede entenderse para esto de forma sinónima o describe las actividades conocidas por el experto en la materia del sistema inmune que están dirigidas contra tumores y que se aumentan sorprendentemente mediante los agentes de acuerdo con la invención en su actividad. La modulación, por tanto, es particularmente una estimulación o incremento de acciones del sistema inmune o del propio sistema inmune. De esta manera, los agentes de acuerdo con la invención se pueden usar en una realización preferente para estimular la respuesta inmune mediada por linfocitos T, sin embargo, también la respuesta inmune independiente de linfocitos T. Este proceso puede comprender en una realización preferente de la invención una proliferación de linfocitos B o una activación de linfocitos B.

En una realización muy particularmente preferente se produce durante la modulación de la actividad del sistema inmune una estimulación de tal forma que se secretan o se secretan de forma aumentada citocinas. Puede ser particularmente preferente que la molécula de acuerdo con la invención o el agente de combinación de acuerdo con la invención se utilicen como adyuvante en la vacunación terapéutica o profiláctica. De forma particularmente eficaz, los agentes de acuerdo con la invención pueden utilizarse para el tratamiento de una alteración del crecimiento celular, siendo en una realización preferente la alteración del crecimiento celular una enfermedad tumoral. Preferentemente, en el caso de la enfermedad tumoral se trata de una enfermedad seleccionada entre el grupo que comprende tumores de la zona otorrinolaringológica que comprende tumores de la nariz interna, de los senos paranasales, de la nasofaringe, de los labios, de la cavidad oral, de la orofaringe, de la laringe, de la hipofaringe, del oído, de las glándulas salivales y paragangliomas, tumores del pulmón que comprenden carcinomas bronquiales no microcíticos, carcinomas bronquiales microcíticos, tumores del mediastino, tumores del tracto gastrointestinal que comprenden tumores del esófago, del estómago, del páncreas, del hígado, de la vesícula biliar y de los conductos biliares, del intestino delgado, carcinomas de colon y recto y carcinomas anales, tumores urogenitales que comprenden tumores de los riñones, de los uréteres, de la vejiga, de la próstata, de la uretra, del pene y de los testículos, tumores ginecológicos que comprenden tumores del cuello de útero, de la vagina, de la vulva, carcinoma del cuerpo del útero, enfermedad trofoblástica maligna, carcinoma ovárico, tumores del conducto ovárico (tubo de Falopio), tumores de la cavidad abdominal, carcinomas de mama, tumores de órganos endocrinos que comprenden tumores de la tiroides, de la paratiroides, de la corteza suprarrenal, tumores de páncreas endocrinos, tumores carcinoideos y síndrome carcinoide, múltiples neoplasias endocrinas, sarcomas de hueso y de tejidos blandos, mesoteliomas, tumores cutáneos, melanomas que comprenden melanomas cutáneos e intraoculares, tumores del sistema nervioso central, tumores de la infancia que comprenden retinoblastoma, tumor de Wilms, neurofibromatosis, neuroblastoma, familia de tumor de sarcoma de Ewing, rabdomiosarcoma, linfomas que comprenden linfomas no Hodgkin, linfomas de linfocitos T cutáneos, linfomas primarios del sistema nervioso central, enfermedad de Hodgkin, leucemias que comprenden leucemias agudas, leucemias mieloides y linfáticas crónicas, neoplasias de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, síndromes paraneoplásicos,

ES 2 357 692 T3

metástasis sin tumor primario conocido (síndrome de CUP), carcinomatosis peritoneal, tumor maligno relacionado con inmunosupresión que comprende tumores malignos relacionados con SIDA tales como sarcoma de Kaposi, linfomas asociados a SIDA, linfomas del sistema nervioso central asociados a SIDA, enfermedad de Hodgkin asociada a SIDA y tumores anogenitales asociados a SIDA, tumores malignos relacionados con trasplante, tumores metastatizados que comprenden metástasis cerebrales, metástasis pulmonares, metástasis en hígado, metástasis óseas, metástasis pleurales y pericardiales y ascitis maligna.

A continuación se explicará la invención mediante ejemplos con más detalle o también sin estar limitada a estos ejemplos.

Los aparatos, materiales y soluciones necesarios para los procedimientos individuales se indican bajo el respectivo procedimiento. La siguiente tabla contiene una enumeración de aparatos y materiales que se usaron y que no se pueden asignar a un procedimiento específico así como los agentes químicos y soluciones necesarios para la preparación de las soluciones:

TABLA

Aparatos, materiales, agentes químicos y soluciones usados

Nombre	Fabricante/Proveedor
<i>Aparatos</i>	
Biofuge Pico	Hereaus
pH-metro digital	Knick
Bloque térmico HLC Progress	Sigma
Agitador magnético IKA MAG REO	Janke und Kunkel
Báscula de plato superior	Sartorius
Pipettboy Accu Jet	Brand
Vortex Genie 2	Scientific Instruments
<i>Materiales</i>	
Pipetas desechables 5, 10, 25 ml	Corning B. V. Life Sciences
Filtro superior de matraz 0,2 µm	Nunc
Puntas de pipetas de div. tamaños	Roth
Recipientes de reacción 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf
Jeringas (estériles, 10 ml, 100 ml)	Becton Dickinson
Prefiltro de jeringa 0,45/0,2 µm	Schleicher & Schüll
<i>Productos químicos, soluciones</i>	
APS	Life Technolgies

ES 2 357 692 T3

TABLA (continuación)

Nombre	Fabricante/Proveedor
<i>Agentes químicos, soluciones</i>	
ATP	Sigma
Blasticidina S (10 mg/ml)	Invivogen
Ácido bórico	Roth
BSA	Sigma
Azul brillante de Coomassie R-250	Serva
Medio DMEM	BioWhittaker
Etanol absoluto	J. T. Baker
Bromuro de etidio	Sigma
FBS	BioWhittaker
MgCl ₂	Roth
Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	Roth
NaCl	Roth
NaN ₃	Merck
Acetato sódico (sin agua)	Roth
PBS sin Ca y Mg	BioWhittaker
Penicilina/estreptomicina	BioWhittaker
Medio RPMI	BioWhittaker
Sacarosa	Roth
Ácido clorhídrico (HCl) al 25%	Roth
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Roth
Tampón TAE (50 x)	AppliChem
TEMED	Roth
Tris Ultra	Roth
Solución de tripsina	BioWhittaker
Tween 20	Roth

55 *ODN y dSLIM usados, selección de secuencia con ayuda de mfold*

Las secuencias para la preparación de moléculas modelo para la investigación de la estructura de dSLIM se generaron en gran parte con ayuda del software disponible en WWW "mfold" (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>). A este respecto se trata de un programa para la predicción de la estructura secundaria de ácidos nucleicos basándose en datos termodinámicos [Zuker 2003]. Las secuencias del ADN de 58 nucleótidos de longitud, denominadas en lo sucesivo ODN, para la síntesis de dSLIM se introdujeron como ADN lineal en "DNA mfold" y se usaron los ajustes por defecto así como los siguientes parámetros: temperatura 37°C, concentración iónica Na⁺ 150 mM y Mg²⁺ 0,5 mM, corrección de oligómeros.

65 Como base para las moléculas modelo para la investigación de la configuración de estructuras de G sirvió la secuencia de dSLIM-30L1. Ésta se modificó en primer lugar de tal forma que ya no había presente ningún resto de guanina sucesivo, a este respecto se mantuvo la proporción de GC de la región complementaria (denominada en lo

ES 2 357 692 T3

sucesivo “tallo”). La secuencia de la región no complementaria (denominada en lo sucesivo “bucle”) se modificó de tal manera que en ese lugar en la medida de lo posible no eran posibles emparejamientos de bases de Watson-Crick y no están presentes restos de guanina sucesivos entre sí. Mediante esta modificación del bucle se modificaron en comparación con 30L1 los motivos CG situados en esta región. El modelo de ODN construido de esta manera se denomina en lo sucesivo KG. El ODN GL se corresponde con KG con una secuencia poli(G) en el bucle, que, sin embargo, a diferencia de la existente en 30L1, no se encuentra dentro de los motivos GC. El ODN MS se corresponde con la molécula de partida 30L1, sin embargo, presenta en el tallo restos de guanina adicionales. Los ODN GS, GLS y ML contienen combinaciones de tallo y bucle del ODN que se ha descrito anteriormente.

10 Como molécula de control para la dependencia del efecto observado de motivos CG sirvieron las moléculas no30L1 y noGL, en las que respectivamente CG estaba sustituido con TG.

15 La molécula dSLIM-60L1 sirvió como molécula modelo de un dSLIM-30L1 “dimérico”, tal como se puede producir mediante concatemerización. Está compuesta de dos ODN (60L1dir y 60L1inv) parcialmente complementarios, sin embargo, no autocomplementarios, que presentan después de la hibridación una proyección de nucleótidos 5', a la que se puede ligar un ODN adicional (30L1-AGGG) con una proyección de nucleótidos 3' correspondiente y una región 5' y 3' autocomplementaria. Las secuencias de los bucles de estos 3 ODN se corresponden a este respecto a las de 30L1.

20 Se pusieron a disposición por Melanie Rothe (Molonge AG) fracciones de dSLIM-30L1 que se obtuvieron mediante separación de una gran cantidad de dSLIM-30L1 por separación mediante gradiente de NaCl continuo en la HPLC.

25 Los ODN usados en el trabajo se pusieron a disposición por la empresa TIB-Molbiol (Berlín) con fosforilación 5' (excepciones: M362, 2006) disueltos en H₂O en una concentración de 3 g/l después de la purificación por HPLC con respecto a:

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

Tabla: ODN usados (fosforioato letras pequeñas)

Nombre	Secuencia	Características estructurales	Peso molecular (g/mol)
30L1	CCT AGG GGT TAC CAC CTT CAT TGG AAA ACG TTC TTC GGG GCG TTC TTA GGT GGT AAC C	G ₄ en tallo y bucle (S1, L1)	17871
KG	CTG CAG CTG TAG CAG CTT CAT TCC ATA TCG TTC TTC GTG TCG TTC TTA GCT GCT ACA G	Ninguna secuencia poli(G), bucle sin emparejar (S2, L2)	17723
ML	CCT AGG GGT TAC CAC CTT CAT TCC ATA TCG TTC TTC GTG TCG TTC TTA GGT GGT AAC C	Tallo de 30L1, bucle de KG (S1, L2)	17723
MS	CCT AGG GGT GGG GGC CTT CAT TGG AAA ACG TTC TTC GGG GCG TTC TTA GGC CCC CAC C	30L1 con G ₅ adicional en el tallo (S3, L1)	17874
GL	CTG CAG CTG TAG CAG CTT CGG GGG GTA TCG	KG con G ₆ en el bucle (S2, L3)	17885
GS	TTC TTC GTG TCG TTC TTA GCT GCT ACA G CCT AGG GGT GGG GGC CTT CAT TCC ATA TCG TTC TTC GTG TCG TTC TTA GGC CCC CAC C	KG con tallo de MS (S3, L2)	17726
GLS	CCT AGG GGT GGG GGC CTT CGG GGG GTA TCG TTC TTC GTG TCG TTC TTA GGC CCC CAC C	Tallo de MS, bucle de GL (S3, L3)	17888
no30L1	CCT AGG GGT TAC CAC CTT CAT TGG AAA ATG TTC TTT GGG GTG TTC TTA GGT GGT AAC C	30L1 sin motivos CG (TG en lugar de CG)	17871

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(cont)

noGL	CTG CAG CTG TAG CAG CTT TGG GGG GTA TTG TTC TTTT GTG TTG TTC TTA GCT GCT ACA G	GL sin motivos CG (TG en lugar de CG)	17900
60L1 dir	CCT AGG GGT TAC CAC CTT CAT TGG AAA ACG TTC TTC GGG GCG TTC TTT CCC CAA TGG TGG AA	no autocomplementario, bucle de 30L1	19147
60L1 inv	CCC CTT CCA CCA TTG GGG ATC ATT GGA AAA CGT TCT TCG GGG CGT TCT TAG GTG GTA ACC CC	no autocomplementario, bucle de 30L1	19108
30L1-AGGG	GGG GTT ACC ACC TTC ATT GGA AAA CGT TCT TCG GGG GCT TCT TAG GTG GTA A	autocomplementario, proyección de nucleótidos 3'	16177
M362	tcg tgg ttc gaa cga cgt tga t	cadena principal de fosforotioato CpG-C	7640
2006	tcg tgg ttt tgt cgt ttt gtc gtt	cadena principal de fosforotioato CpGB	7303

La guanina es capaz debido a su orientación de sus cuatro sitios de unión de puentes H de configurar mediante emparejamientos de bases de guanina-guanina un cuarteto de bases cíclico con 8 puentes de H (cuarteto de G). Una secuencia de ADN que contiene varios nucleótidos de guanina sucesivos, por tanto, es capaz de configurar una estructura helicoidal tetramérica, en la que las bases de guanina presentan una fuerte planitud con una particular interacción de pila. Dependiendo de la ubicación, cantidad y distribución de nucleótidos de guanina en la secuencia se pueden configurar diversas estructuras de G, que se pueden dividir en tres grupos: ADN G2' (tetraplejos paralelos o antiparalelos bimoleculares), ADN G4' (tetraplejos antiparalelos unimoleculares) o ADN G4 (tetraplejos paralelos tetramoleculares). El ADN G4 es capaz de configurar nanoestructuras auto-ensamblantes, los denominados alambres de G (G-wire). La formación y la en parte muy gran estabilidad de las estructuras de G, además de la cantidad de los restos de guanina disponibles y su disposición y emparejamiento de bases de Watson-Crick circundante dependen de la temperatura, de la concentración de ADN y la presencia de diversos cationes (por ejemplo, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺). Las estructuras de G4 se identificaron, por ejemplo, en secuencias de telómeros, regiones de interruptor de inmunoglobulinas y ADN de VIH [Sen 1992, Marsh 1994, 1995].

Se produjeron a continuación diversas moléculas monoméricas y multiméricas, que contenían combinaciones de diversas secuencias de bucle y tallo. Se usaron respectivamente tres secuencias de bucle y tres de tallo, que contenían motivos poli(G) largos, cortos o ninguno, por lo que se influyó en la capacidad para la configuración de estructuras de G. Las estructuras de G estables se pueden configurar en las correspondientes condiciones en ODN cortos (oligómeros de 12 unidades) con solamente cuatro bases de guanina sucesivas. En el caso de ODN más largos se necesitan motivos más largos, ya que la probabilidad de la configuración de estructuras de G estables se correlaciona positivamente con la proporción de las bases de guanina implicadas en la secuencia total [Sen 1992].

Las moléculas que presentan motivos poli(G) largos adicionales muestran una configuración aumentada de moléculas multiméricas. También los perfiles de elución de estas moléculas se diferencian de los que no presentaron motivos poli(G) largos por la presencia de dos picos, de los cuales el pico del mayor volumen de elución se correspondía a la distribución de ADN que se presentaba en la zona superior de los geles de agarosa. La modificación más evidente se podía observar en GL, la molécula cuyos motivos poli(G) están localizados en el bucle. En este caso se podían diferenciar en el perfil de elución dos picos claramente separados, presentando el pico con un mayor volumen de elución una mayor intensidad que el del menor volumen de elución. Con GL entonces también la proporción del ADN distribuido en el gel de forma difusa por encima de la banda monomérica era comparativamente grande y alcanzaba en su distribución hasta el bolsillo del gel. Estas observaciones permiten deducir que está presente una proporción relativamente grande del ADN en complejos multiméricos. La distribución de los picos en el perfil de elución de HPLC y la distribución del ADN después de la electroforesis en gel de agarosa se parecía en las construcciones que contenían motivos poli(G) en el tallo (GS, MS). Éstas mostraron en el perfil de elución un segundo pico bajo con mayores volúmenes de elución y una distribución débilmente visible no discreta de ADN por encima de la banda monomérica en el gel de agarosa. El comportamiento de avance observado en las moléculas con motivos poli(G) en el bucle y tallo (GLS) en HPLC y en el gel de agarosa se situaba para el patrón de pico (HPLC) y la distribución de ADN (gel de agarosa) entre los de GL y GS y MS. En el perfil de elución se observaron dos picos separados con la misma altura y la proporción del ADN distribuido en la zona superior del gel era ligeramente superior que en las moléculas con motivos poli(G) en el tallo (GS y MS), sin embargo, más débil que en GL. De acuerdo con esto, la configuración de moléculas multiméricas está particularmente favorecida cuando los motivos poli(G) se encuentran en el bucle, tal como es el caso en GL. El motivo de esto es la ausencia de competencia entre la configuración de pares de bases de Watson-Crick y la configuración de estructuras de G en el bucle monocatenario. Esta condición también se da en la molécula de GLS. En este caso se encuentran sin embargo motivos poli(G) tanto en el tallo como en el bucle como posibles compañeros de interacción. Por tanto, se pueden configurar estructuras de G2 intramoleculares y por tanto esencialmente independientes de la concentración. Éstas representan por tanto una competencia con la configuración intermolecular de estructuras de G, de tal forma que la configuración de complejos de mayor peso molecular en GLS en comparación con GL está disminuida. La mínima tendencia a la configuración de complejos de mayor peso molecular se observó en las moléculas con motivos poli(G) en el tallo, a pesar de que los motivos poli(G) en este caso eran más largos que en GL.

En la molécula 30L1 monomérica que asimismo presenta de modo similar a GLS motivos poli(G) en el tallo y bucle no se observaron las características que se han descrito anteriormente con las mismas cantidades de material de partida. Esto se podría basar en que por un lado los motivos poli(G) en esta molécula son más cortos que en las moléculas multiméricas. Por otro lado, la predicción de estructura de "DNA mfold" produce una mayor tendencia a la configuración de pares de bases de Watson-Crick en el bucle, lo que debe disminuir adicionalmente la probabilidad de la configuración de estructuras de G. Sin embargo, la fracción F4, que se obtuvo a partir de una gran cantidad de 30L1 mediante separación por HPLC, de forma similar a las moléculas multiméricas con motivos poli(G) largos, en electroforesis en gel de poliacrilamida también presenta la distribución de ADN difusa descrita en la zona superior del gel y ADN que permanece en los bolsillos de gel (véase la Fig. 3.1.9). Evidentemente, en 30L1 la proporción de complejos de mayor peso molecular de estructuras de G es tan reducida que se puede detectar solamente con mayores cantidades de partida.

A diferencia de esto en GL y GLS, que presentan motivos poli(G) en el bucle, las fracciones de ADN no desaparecen completamente en el bolsillo y se puede reconocer un patrón de bandas adicional regular. A este respecto se trata probablemente de dímeros o tetrámeros o de ODN no descompuesto que ha permanecido en los agregados, que se disolvieron mediante la desnaturalización de los agregados y que todavía están unidos entre sí mediante interacción de guanina-guanina.

ES 2 357 692 T3

El hecho de que las moléculas multiméricas con motivos poli(G) largos se forman realmente por estructuras de G se muestra por las propiedades experimentales. A éstas pertenecen además de la presencia de una distribución de ADN no discreta en la zona superior del gel la aparición de bandas regulares después de la desnaturalización, tal como se observó en GL y GLS en gel de poliacrilamida.

5 A diferencia de la banda aislada de 30L1 en el tercio superior del gel, las bandas observadas en KG y ML después de la desnaturalización ya no se podían observar (véase la Fig. 3.1.6). Por tanto, en este caso se trata de dímeros que se formaron mediante interacciones de pares de bases entre dos moléculas monoméricas y, por tanto, se pueden separar de forma sencilla mediante desnaturalización térmica. El hecho de que éstas se presentaban preferentemente en KG y ML se podría deber a su secuencia de bucle común que favorece una interacción de dos moléculas.

15 Mediante fraccionamiento por HPLC de una gran cantidad de la molécula 30L1 se obtuvieron 4 fracciones que mostraron un comportamiento de avance en el gel muy diferente. Por la concentración de las fracciones individuales, las mismas se pudieron separar individualmente de tal forma que en este caso se hicieron visibles varias bandas que no se podían observar anteriormente en el gel. A este respecto, el comportamiento de avance de la primera fracción se correspondía con las dos conformaciones monoméricas observadas, el de la segunda fracción se correspondía con una mezcla continua de las dos conformaciones, prevaleciendo después de la desnaturalización de esta fracción la conformación abierta y el de la tercera fracción se correspondía principalmente, tal como se ha descrito anteriormente, con una molécula dimerica. La cuarta fracción se parecía en su comportamiento de avance con sus proporciones claramente visibles de ADN que ha permanecido en el bolsillo de gel al de MS.

25 Era llamativo el desplazamiento de la banda correspondiente a un dímero en 30L1 y la fracción 3 de 30L1 en el medio de cultivo celular con respecto a su amplitud de avance observada en agua en el gel. La comparación con el gel teñido con Coomassie muestra que la correspondiente banda avanza en el medio a la misma altura que la banda de proteína inferior. Por tanto se puede suponer que el desplazamiento de la banda está causado por la unión de la molécula dimerica a proteínas.

30 El comportamiento de avance de las bandas correspondientes a las conformaciones monoméricas apenas estaba modificado por la adición de medio, solamente se observó en GL un aumento de la intensidad de la banda correspondiente a la conformación abierta. Después de una incubación durante cinco horas a 37°C se pudo observar en KG y 30L1 una distribución difusa del ADN entre las dos bandas observadas anteriormente, a este respecto en KG disminuyó la intensidad de la banda correspondiente a la conformación abierta. En las condiciones seleccionadas aparece una ligera preferencia de la conformación abierta en comparación con la solución acuosa. Después de la incubación durante 27 h en medio, las intensidades de ADN observadas en ML y GL estaban muy disminuidas y además en KG 35 ya solamente era visible la banda inferior con una intensidad disminuida, sin embargo, la menor disminución de la intensidad se pudo observar en 30L1. Una posible explicación de esto sería que las conformaciones abiertas se degradan más fácilmente que las conformaciones bicatenarias.

40 El efecto inmunoestimulador de las diversas moléculas monoméricas y multiméricas se debe investigar con ayuda de la determinación de la concentración de IFN-gamma, IFN-alfa e IL-6 en los sobrenadantes de PBMC de donaciones de sangre humana después de la estimulación con estas moléculas.

45 En el sistema de ensayo para la determinación de la actividad de las moléculas con ayuda de PBMC de donaciones de sangre humana se trata de un sistema muy complejo, en el que las diversas células se pueden influir mutuamente mediante interacción y/o secreción de citocinas, por lo que difícilmente es posible una asignación de la respuesta observada a un determinado tipo celular o modo de reacción. Además, entre los resultados de diferentes donantes aparecen grandes variaciones de tal forma que se necesita una mayor cantidad de ensayos independientes. La ventaja de este sistema de ensayo radica en que de todos los sistemas *in vitro* establecidos posibles es el que más se aproxima a la situación *in vivo*.

50 Los ensayos mostraron que la comprobación usada para la activación de las células se ve influida de forma relativamente intensa por las condiciones de cultivo de las células, ya que IL-8/CXCL8 también se secreta como reacción a factores inductores de estrés celular. Esto es particularmente evidente en los resultados que se obtuvieron con células cuyo medio no se cambió antes de la estimulación (véase la Fig. 3.3.1) y en los que se comprobó una alta concentración de IL-8/CXCL8 incluso en las células no estimuladas. La relación determinada de la concentración de quimiocinas, que se midió en las células no estimuladas, con respecto a la concentración de quimiocinas que se comprobó en las células estimuladas, entonces era con 1,3 solamente muy baja en comparación con células que habían experimentado un cambio de medio. En éstas la relación ascendió a 2,3. Para obtener resultados lo más informativos posible, por tanto, para este ensayo es particularmente importante cultivar las células en condiciones lo más libres de estrés celular posible. El estrés celular probablemente también es el motivo de que los resultados que se obtuvieron con células que se estimularon 24 h después de la siembra no fueran tan evidentes como los de células que habían crecido de forma confluyente. La transformación de las células y las técnicas de cultivo celular asociadas a esto generan un alto estrés celular.

65 En el ensayo para la dependencia de la duración de la estimulación (véase la Fig. 3.3.2) se pudo observar que incluso después de 6 h se podía detectar una diferencia en la cantidad de quimiocinas secretada entre células no estimuladas y estimuladas. La cantidad de IL-8/CXCL8 aumentó entre 6 h y 24 h, sin embargo, el aumento observado de 24 h a 48 h solamente era reducido.

ES 2 357 692 T3

En dos experimentos se investigaron las actividades de las moléculas en el sistema de ensayo. A este respecto se pudieron observar diferencias entre las moléculas individuales utilizadas (véase la Fig. 3.3.3).

La máxima secreción de IL-8/CXCL8 se indujo en los experimentos mediante estimulación con GL, a este respecto la misma era ligeramente mayor que la causada por el ODN 2006. Las cantidades del IL-8/CXCL8 medidas después de la estimulación con KG y 30L1 eran ligeramente menores, mientras que KG en comparación con 30L1 mostró una actividad ligeramente mayor. Estas diferencias observadas en la actividad de las diversas moléculas monoméricas y multiméricas podrían deberse a las diversidades estructurales observadas. De este modo se puede mostrar que en KG y GL en comparación con 30L1 existe una conformación más bien abierta de la región de bucle con los motivos CG, de tal forma que los mismos están presentes preferentemente de manera monocatenaria. Tal como pudieron mostrar Rutz y col. mediante resonancia de plasmón superficial, el ADN monocatenario se une con mayor afinidad a TLR9 que el ADN bicatenario [Rutz 2004], de tal forma que la actividad ligeramente mayor de KG y GL con respecto a 30L1 puede deberse a esto. Sin embargo, los propios motivos CG en 30L1 y KG/GL son diversos, de tal manera que la diferente actividad también puede estar motivada por la diversa afinidad de los diferentes motivos CG por el receptor.

En los dos experimentos GL, la molécula con la mayor potencia para la configuración de agregados, mostró la mayor actividad de las moléculas ensayadas, lo que puede deberse posiblemente a un mayor entrecruzamiento de los receptores debido a los complejos de mayor peso molecular. Sin embargo, no se pudo observar una actividad aumentada de GL en los experimentos que se realizaron con PBMC. Sin embargo, sería posible que también otros receptores de reconocimiento de patrón existentes en el sistema más complejo de las PBMC participaran en la actividad inmunomoduladora observada en ese lugar de las moléculas monoméricas y multiméricas, que reconocen otras características estructurales de las moléculas. De este modo sería posible, por ejemplo, que se realizase un reconocimiento también mediante otros receptores específicos de ácido nucleico, tales como TLR8 o TLR7, por lo que se provoca una acción cooperativa o moduladora.

En resumen se puede decir que particularmente la presencia de motivos poli(G) en el bucle de las moléculas monoméricas favorece la configuración de complejos multiméricos. Estos complejos presentan además una alta estabilidad con respecto a desnaturalización térmica.

Para identificar diferencias del efecto inmunomodulador de diversas construcciones se utilizaron las mismas en experimentos de estimulación con PBMC.

Los resultados muestran que las moléculas multiméricas presentan una actividad particularmente alta.

Determinación de la concentración de ADN

La concentración de los ODN y de las moléculas de ADN monoméricas se determinó mediante medición de la absorción a 260 nm (A_{260}). De la absorción a 260 nm son responsables los anillos aromáticos de las bases de ácido nucleico, diferenciándose los coeficientes de absorción molar (ϵ) de las bases individuales (A>G>T>C). Mediante interacciones de cromóforo-cromóforo, los ácidos nucleicos bicatenarios presentan una menor absorción que los ácidos nucleicos monocatenarios (efecto de hipocromía).

Para la determinación de la concentración se diluyó el correspondiente volumen de la solución de ADN a determinar en primer lugar en el recipiente Eppendorf con tampón TE en un volumen final de 300 μ l (ODN 1:200, dSLIM 1:100). La solución de ADN se pasó a continuación a una cubeta de cuarzo y se midió la absorción a 260 nm en el fotómetro frente al tampón TE. El cálculo de la concentración a partir de la absorción medida se realizó de acuerdo con la ecuación:

$$c (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{factor de dilución} \times \text{factor de conversión}$$

El factor de conversión es un valor aproximativo y se estima en 50 μ g/ml para ADN bicatenario y 33 μ g/ml para ADN monocatenario. Debido a la proporción de zonas bicatenarias en ODN y las moléculas de ADN monoméricas se usó un factor de conversión normalizado de 50 μ g/ml. Se realizaron respectivamente determinaciones dobles con diluciones separadas, a partir de las que se calculó el valor medio.

Preparación de las moléculas de ADN monoméricas

Para la preparación de las moléculas de ADN monoméricas se usaron materiales (desechables) estériles y tampones frescos o filtrados a esterilidad almacenados a -20°C para evitar una contaminación con bacterias, ya que incluso pequeñas cantidades de endotoxinas pueden falsear los resultados de la estimulación.

La primera etapa en la preparación de las moléculas de ADN monoméricas es la ligación de dos ODN con ayuda de la ADN ligasa de T4. La ADN ligasa de T4 cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 5'-fosfato y 3'-OH en ADN o ARN bicatenario con extremos romos o cohesivos. Además es capaz de reparar rupturas en la cadena sencilla en ADN, ARN o híbridos de ADN:ARN bicatenarios.

ES 2 357 692 T3

La ligación de dos ODN se realiza respectivamente entre el saliente 5'-fosfato de un ODN con el extremo 3' del otro, de tal forma que se produce una molécula circular. Durante la reacción se producen asimismo las moléculas de ADN multiméricas de acuerdo con la invención.

5 La cantidad de partida de ODN para la producción de las moléculas ascendió a 500-1000 μg . Para la ligación se utilizaron los ODN en una concentración de 0,55 g/l en tampón ligasa 1 x. Para esto se diluyeron con solución de lavado Aqua y se añadió la cantidad correspondiente de tampón ligasa 10 x. Después de una mezcla cuidadosa se añadió tanta ADN ligasa de T4 que estaba presente una relación de 0,01 U/ μg de ADN. La preparación de ligación se incubó en un baño de agua a 37°C durante 15-24 h.

10 La digestión con T7 sirve para la degradación de ADN no ligado. La ADN polimerasa de T7 es una ADN polimerasa dependiente de molde que cataliza la síntesis de ADN en dirección 5'-3', sin embargo, que también presenta una actividad exonucleasa 3'-5' frente a ADN mono- y bicatenario, por lo que es adecuada para la degradación de ODN no ligado.

15 Antes de la realización de la digestión con T7 se comprobó el éxito de la ligación. Para esto se separaron respectivamente 0,3 μg del ODN, de la preparación de ligación y una digestión con T7 de muestra en un gel de agarosa al 3% (véase 2.4.1). Para la digestión con T7 de muestra se utilizó un exceso de ADN de polimerasa de T7 en la relación 10 U/1,1 μg de ADN en un volumen de 21 μl . La reacción se realizó durante 1 h a 37°C y se detuvo mediante calentamiento durante 10 minutos a 70°C.

20 Para la digestión con T7 se diluyó la preparación de ligación con solución de lavado Aqua y la cantidad correspondiente de tampón ligasa 10 x, de tal forma que el ADN estaba presente en una concentración de 0,3 g/l en tampón ligasa 1 x. Se añadió la cantidad necesaria de ADN polimerasa de T7 para una relación de 0,03 U/ μg de ADN. La preparación se incubó en un baño de agua a 37°C durante 15-24 h. El éxito de la reacción se comprobó mediante separación de 0,3 μg de la preparación de ligación junto con 0,3 μg y 0,9 μg de la preparación de digestión con T7 en un gel de agarosa al 3%.

Purificación de las moléculas de acuerdo con la invención

30 La purificación se realizó con ayuda de la cromatografía de intercambio aniónico. El principio de este procedimiento se basa en la presencia de grupos cargados positivamente en una matriz porosa (fase estacionaria) que interaccionan con los grupos fosfato cargados negativamente por encima de pH 2 de los ácidos nucleicos, de tal forma que los mismos se unen a la fase estacionaria. La intensidad de la interacción depende del valor del pH y la fuerza iónica de la fase móvil así como las cargas negativas presentes en la molécula. Las moléculas no cargadas no interaccionan o interaccionan sólo ligeramente con la fase estacionaria y se eluyen rápidamente con una fase móvil de baja fuerza iónica. Mediante el aumento de la fuerza iónica de la fase móvil se desplazan las moléculas unidas a la fase estacionaria de la columna. A este respecto, los ácidos nucleicos de mayor tamaño eluyen más tarde que las pequeñas debido a la interacción más fuerte con la fase estacionaria. [Lottspeich 1998, Mülhardt 2003].

40 Para la purificación se usó como fase estacionaria Fractogel-DMAE, una resina polimérica con grupos de dimetilaminoetilo. Para la separación se utilizó un gradiente escalonado de NaCl (NaCl 1 M al 0%, 50%, 100%).

45 Antes del comienzo de la purificación en primer lugar todas las entradas y salidas de la instalación de HPLC, que en el estado de reposo está llena de etanol al 20%, se lavaron con solución de lavado Aqua y se cargó la columna. Para esto se introdujeron 1,6-1,8 ml de DMAE en la columna, se rellenó con agua hasta el borde y se giró la columna para garantizar una distribución uniforme. Después, la columna se conectó exenta de burbujas de aire a la instalación de HPLC. Con un caudal de 1 ml/min se lavó la columna hasta que se hubo depositado completamente el material de la columna. El pistón superior se enroscó exento de burbujas de aire sobre la matriz y de este modo se desplazó de la columna el exceso de agua. La columna se conectó nuevamente a la instalación de HPLC y se lavó con un caudal de 1 ml/min, los volúmenes muertos que se presentaban eventualmente entre la matriz y el pistón se eliminaron mediante repetición de la última etapa. La columna cargada de este modo, al igual que toda la instalación de HPLC, se equilibró a continuación con un caudal de 1 ml/min con tampón T20. El equilibrado de la columna se realizó con aproximadamente 10 veces el volumen de la matriz de la columna y se comprobó con papel indicador de pH. Las preparaciones se inyectaron con ayuda de una jeringa Hamilton por un bucle de muestra de 2 ml en la instalación de HPLC. El control de la instalación de HPLC se realizó con ayuda de un protocolo de software que estaba concebido de tal forma que el fraccionamiento se realizó automáticamente. Sin embargo, en algunos casos los máximos secundarios que se presentaban se fraccionaron manualmente. Antes de la aplicación de la muestra se equilibró la columna con dos veces el volumen de la columna (column volumen: CV), después se realizó la elución de moléculas no unidas (proteínas, nucleótidos) con 5 CV de Tampón T20, seguido de la elución de moléculas unidas débilmente (ATP, ODN) con 7 CV de tampón T20N1000 al 50% y la elución de dSLIM con 7 CV de tampón T20N1000 al 100%. El caudal ascendió a 1 ml/min. A continuación se equilibró la columna para la siguiente aplicación de muestra con 10 CV de tampón T20, las entradas y salidas de la instalación de HPLC se lavaron manualmente con tampón T20.

65 Las moléculas purificadas mediante HPLC se concentraron y desalaron mediante la precipitación con etanol. En presencia de cationes monovalentes, los ácidos nucleicos forman en alcohol un precipitado insoluble que se puede aislar mediante centrifugación. La sal co-precipitada se puede retirar mediante el lavado en etanol al 70% en gran parte, ya que a diferencia de los ácidos nucleicos es soluble en el mismo. Para aumentar el rendimiento en menores

cantidades que precipitan menos bien de ácidos nucleicos se puede realizar la precipitación a bajas temperaturas y/o añadirse iones de Mg^{2+} . En el caso de que no sea perjudicial para las aplicaciones posteriores también se pueden añadir materiales de soporte que aumentan la concentración eficaz de los ácidos nucleicos, tales como ARNt o glucógeno. [Lottspeich 1998, Mühlhardt 2003].

5 Para la precipitación se transfirieron las respectivas fracciones de la purificación mediante HPLC a recipientes de centrífuga Corex y se añadió 1/100 del volumen de $MgCl_2$ 1 M así como 1/10 del volumen de la solución de acetato sódico 3 M así como 2,5 veces el volumen de etanol al 96%. Las preparaciones se mezclaron y se precipitaron durante 2-24 h a $-20^{\circ}C$. A continuación, las preparaciones se centrifugaron durante 30-60 min a 10.000 rpm/min (11.000 g) y $4^{\circ}C$, se retiró el sobrenadante y se lavó con 5 ml de etanol al 70% y se volvió a centrifugar durante 10-30 min a 10.000 rpm/min (11.000 g) y $4^{\circ}C$. Se retiró el sobrenadante y el sedimento de ADN se secó al aire hasta que ya no se pudo oler más alcohol. El ADN se recogió en 100-350 μl de solución de lavado Aqua y se transfirió a recipientes de reacción de 1,5 ml estériles. El volumen en el que se resuspendió se estimó mediante la cantidad de ADN utilizada para la preparación de tal forma que se produce una concentración de 1 g/l con un rendimiento del 50%.

Electroforesis en gel de agarosa

20 Para la separación y caracterización de ácidos nucleicos es adecuada la electroforesis en gel. Los ácidos nucleicos cargados negativamente a lo largo de un amplio intervalo de pH se exponen en una matriz de agarosa o poliacrilamida a un campo eléctrico y migran hacia el ánodo. A este respecto, su velocidad de migración se diferencia de forma correspondiente a su tamaño. El comportamiento de los ácidos nucleicos (hasta aproximadamente 10 kb) durante la electroforesis en gel también se puede describir como mezcla de dos teorías. El efecto de tamiz de Ogston se basa en la suposición de que los ácidos nucleicos adoptan una forma globular y colisionan con la matriz de gel más frecuentemente cuanto mayor sea el perímetro de la partícula, por lo que las moléculas de mayor tamaño se frenan más fuertemente que las pequeñas. Las moléculas cuyo diámetro es mayor que el diámetro de poro del gel según esta teoría no deben migrar a través del gel. La teoría de la reptación se basa en que los ácidos nucleicos pierden su forma globular en el gel y se mueven a modo de serpiente con un extremo por delante a través del gel, necesitando las moléculas más largas más tiempo para este movimiento que las cortas. Debido a la influencia de tamaño sobre la velocidad de migración de ácidos nucleicos, también la configuración de las estructuras secundarias influye sobre el comportamiento de avance en el gel. De este modo, por ejemplo, el comportamiento de avance del ADN plasmídico se diferencia de manera correspondiente a su conformación. La velocidad de migración aumenta desde el ADN plasmídico abierto (forma I) a lo largo del lineal (forma III), superhelicoidal (forma II) hasta desnaturalizado (ovillo). Para el ADN bicatenario lineal (forma III) existe a lo largo de un amplio intervalo una relación entre el \log_{10} de la longitud (en pb) y el tramo de migración relativo en el gel, de tal forma que mediante patrones de longitud se puede realizar una determinación de tamaño relativamente exacta.

La determinación de ácidos nucleicos en geles puede realizarse con bromuro de etidio, que debido a su estructura plana se intercala en el ADN, por lo que se puede excitar con luz en el intervalo UV (254-366 nm) hasta fluorescencia, cuya emisión se observa en el intervalo de naranja-rojo (590 nm). [Lottspeich 1998].

45 La agarosa es un polisacárido que se obtiene de algas marinas y que configura en solución acuosa después del enfriamiento geles de poro relativamente grande (1% (p/v) aproximadamente 150 nm). El tamaño de poro a este respecto es inversamente proporcional a la concentración de agarosa. Los geles de agarosa son adecuados para la separación de ácidos nucleicos de 0,1 a 25 kb de longitud. La ventaja de geles de agarosa consiste en su intervalo de separación relativamente grande y el manejo sencillo, sin embargo, la resolución para fragmentos de ADN pequeños es muy reducida. Para la separación de fragmentos de ADN más pequeños es adecuada la agarosa de tamizado, una forma de agarosa derivatizada. [Lottspeich 1998, Mühlhardt 2003].

50 Para la separación de ODN y moléculas de acuerdo con la invención se usaron geles de agarosa al 3% en tampón TAE 1 x con 0,125 $\mu g/ml$ de bromuro de etidio. Se vertieron geles horizontales con ayuda del sistema BioRad (40 ml para geles pequeños con 8 bolsillos, 100 ml para geles grandes con 20 bolsillos). Las muestras a analizar se aplicaron en tampón de muestra 1 x al lado de patrones de longitud correspondientes (véase 2.4.3). La electroforesis se realizó en tampón TAE 1 x a 120 V durante 30 min. Los geles se fotografiaron con la instalación de documentación de gel.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativa

60 Los geles de poliacrilamida se producen mediante copolimerización radicalica de monómeros de acrilamida con el reticulador N,N' -metilbisacrilamida. El tamaño de poro de los geles se encuentra en el intervalo de aproximadamente 3-6 nm y depende de la concentración total de acrilamida ($\% T = m_{\text{acrilamida}} + m_{\text{bisacrilamida}}$ (p/v)) y el grado de reticulación ($\% C = m_{\text{bisacrilamida}}/m_{\text{acrilamida}} + m_{\text{bisacrilamida}}$). Disminuye con C constante con T creciente y presenta con T constante un mínimo con C del 5%. Los geles de poliacrilamida presentan una muy buena capacidad de resolución particularmente para fragmentos de ADN pequeños (< 1 kb), sin embargo, el intervalo de separación es considerablemente menor en comparación con geles de agarosa. Mediante el uso de geles de gradiente se puede ampliar el intervalo de separación. La mejor capacidad de resolución de geles de poliacrilamida posibilita la diferenciación de diversas conformaciones de ADN que presentan debido a su diversa forma un comportamiento de avance ligeramente diferente, en el que se puede influir mediante la temperatura y la concentración iónica en el gel nativo.

ES 2 357 692 T3

Se demostró que para la separación de las moléculas eran óptimos los geles con T del 8%, C del 2,6% y para la separación de ODN, geles con T del 12%, C del 5% en TBE 1 x. Los geles horizontales se vertieron el día antes de la electroforesis (15 ml/gel_{pequeño}, 25 ml/gel_{grande}) y se conservaron durante una noche en la nevera. Antes de la aplicación de la muestra se sometieron los geles previamente a electroforesis a 70 V (170 V_{grande}) hasta que ya no se pudo observar ninguna modificación de la intensidad de corriente (10-11 mA). Las muestras se aplicaron en tampón de muestra 1 x sin adición de colorantes junto con los patrones de longitud correspondientes (véase 2.4.3). Para el seguimiento del avance de la electroforesis se aplicó colorante de carga (loading dye) 1 x en un carril separado. La electroforesis se realizó en TBE 1 x a tensión constante de 70 V (170 V_{grande}) (≈ 9 V/cm) a temperatura ambiente y se detuvo cuando el azul de bromofenol había alcanzado el extremo inferior del gel (aproximadamente 2 h). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron en solución de bromuro de etidio durante 10-15 min y se fotografiaron con la instalación de documentación de gel. Con una coloración de fondo demasiado intensa, los geles se lavaron durante 10-30 min en agua desmineralizada.

Desnaturalización térmica y renaturalización para la asignación de las bandas

Ya que en el caso de las moléculas de ADN monoméricas se trata de moléculas de ADN circulares, que muestran de forma similar al ADN plasmídico un comportamiento de avance complejo en el gel, las bandas observadas en el gel no se pueden asignar sin más a una conformación o tamaño. Para la diferenciación puede servir el hecho de que las diversas conformaciones a diferencia de moléculas de diferente tamaño en condiciones correspondientes se pueden transformar entre sí de manera reversible.

Las diferentes conformaciones presentan un diverso grado de compactación y, por tanto, se tienen que poder diferenciar en el gel debido a su diferente comportamiento de avance, a este respecto las formas de ADN compactas presentan en el gel la mayoría de las veces una mayor movilidad que las formas de ADN abiertas más voluminosas. Mediante la instrucción de enlaces de puente de hidrógeno, las formas compactas se tienen que poder transformar en las formas abiertas.

Para una asignación de las bandas observadas en el gel de poliacrilamida, las moléculas se desnaturalizaron térmicamente mediante calentamiento durante 10 min a 95°C. Las muestras desnaturalizadas se pusieron inmediatamente en hielo para evitar una renaturalización. Para esto se preparó una mezcla madre que contenía la respectiva molécula de dSLIM en una concentración de 0,05 g/l en tampón TE 1 x. Esta preparación se dividió por la mitad y respectivamente una preparación se calentó y una preparación se dejó a temperatura ambiente. De las preparaciones se extrajeron muestras para la aplicación en gel y se mezclaron con la correspondiente cantidad de tampón de muestra 5 x y se separaron en un gel de poliacrilamida nativo al 8%. Para observar la renaturalización, la preparación desnaturalizada restante se volvió a dividir y a continuación se incubó durante 3 días respectivamente a 4°C o 37°C. La preparación no desnaturalizada restante se almacenó a 4°C y después de 3 días también se dividió, desnaturalizándose una parte tal como se ha descrito anteriormente y dejándose la otra parte a temperatura ambiente. Las preparaciones se mezclaron con la correspondiente cantidad de tampón de muestra 5 x y se separaron en un gel de poliacrilamida nativo al 8%.

Incubación en el medio de cultivo celular

La actividad de las moléculas se ensayó *in vitro* con ayuda de PBMC y células HEK293. Las moléculas no están disueltas en tampón sino en un medio de cultivo celular que contiene proteínas y se incuban a una temperatura de 37°C. La influencia de estos parámetros modificados sobre la estructura y estabilidad de las moléculas y ODN por tanto se debe investigar.

Un factor importante que puede influir del modo más diverso en el efecto de moléculas de ADN es la unión inespecífica a proteínas. Mediante la unión a proteínas se modifica el comportamiento de avance de ADN en la electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE nativa), de tal forma que se puede observar un desplazamiento de la banda de ADN en presencia de proteína. En la mayoría de los casos la movilidad electroforética del complejo de ADN-proteína está disminuida en comparación con ADN, en minicírculos del ADN también puede producirse un aumento de la movilidad electroforética cuando se aumenta el grado de compactación mediante la unión de proteínas [Toulmé 1995].

Para la investigación del comportamiento de las moléculas y ODN utilizados en experimentos de estimulación en condiciones tales como existían en los experimentos de estimulación, las soluciones de ODN y moléculas se diluyeron en una concentración de 1 μ M en medio y se incubaron durante 5 h o 24 h a 37°C en el bloque térmico o directamente después de la adición de la correspondiente cantidad de tampón de muestra 5 x se separaron en un gel de poliacrilamida. Para la comparación se aplicaron soluciones de ODN y moléculas que estaban diluidas correspondiente en H₂O. Para verificar que las modificaciones observadas estaban causadas por la presencia de proteínas, las preparaciones se diluyeron con ODN y moléculas de acuerdo con la invención en una concentración de 1 μ M en medio al que no se había añadido FCS. Para la comparación de las amplitudes de avance de bandas de ADN y proteínas en el gel mediante el cual se puedan realizar deducciones acerca de una posible de unión de proteínas se comprobaron en los geles además del ADN también las proteínas.

La determinación adicional de proteínas se realizó después de la determinación de ácido nucleico. Los geles se fijaron durante 30 min en solución de fijación y después se tiñeron 30-60 min en solución de Coomassie. El exceso de

ES 2 357 692 T3

colorante se retiró mediante incubación en solución decolorante durante una noche y los geles se fotografiaron con la instalación de documentación de gel.

Patrones de longitud de ADN usados

5 De los patrones de longitud se aplicó la cantidad/mm de anchura de bolsillo recomendada por el proveedor en respectivamente tampón de muestra 1 x. Se usaron los siguientes patrones: GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas)

10 GeneRuler 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

10 bp DNA Ladder (Invitrogen)

25 bp DNA Ladder (Invitrogen)

15 Cultivo celular

Todos los trabajos de cultivo celular se realizaron en condiciones estériles con materiales desechables estériles.

20 En la incubadora existían las siguientes condiciones: 37°C, CO₂ al 5%, humedad del aire del 90%.

Investigación del efecto inmunomodulador de las moléculas en PBMC

25 Para la investigación del efecto inmunomodulador de las moléculas multiméricas se midió la secreción de citocinas por linfocitos y monocitos que se obtuvieron de donaciones de sangre humana con ayuda de ELISA.

30 El material de partida para el aislamiento de linfocitos y monocitos, que también se denominan *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) = fracción celular mononuclear de la sangre periférica (alejada del corazón) era un concentrado de leucocitos, también denominado capa leucocítica (*buffy coat*), que se obtiene mediante la centrifugación de sangre completa y que se obtuvo del servicio de donación de sangre de DRK Berlín Wannsee. Mediante una centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque las PBMC se pueden separar de los demás constituyentes del concentrado de leucocitos (plasma, trombocitos, eritrocitos, granulocitos). En el caso del medio de separación Ficoll-Hypaque se trata de una solución con una mezcla de Ficoll 400, un polímero fuertemente ramificado de monómeros de sacarosa, reticulados mediante epíclorhidrina y diatrizoato de sodio (Hypaque) con una densidad de 1,077 g/ml. 35 Mediante la centrifugación isopícnica del medio de separación recubierto con concentrado de leucocitos diluido se puede realizar una separación de los diversos constituyentes de manera correspondiente a su diferente densidad y se obtienen las fracciones representadas en la Figura 2.5.1. [Luttmann 2004].

40 Para el aislamiento de las PBMC se transfirió respectivamente un concentrado de leucocitos a un matraz de 250 ml estéril y se diluyó 1:2 con PBS. En cuatro tubos de centrífuga de 50 ml se dispusieron respectivamente 15 ml de solución de Ficoll-Hypaque y éstos se cubrieron cuidadosamente con una piqueta de 10 ml con aproximadamente 30 ml de la mezcla de sangre-PBS y se centrifugaron a 800 g durante 20 min sin freno (duración total aproximadamente 50 min). La interfase que contenía PBMC se aspiró cuidadosamente con una pipeta de 5 ml y se transfirió a tubos de centrífuga de 50 ml con 20 ml de PBS frío. Para retirar las contaminaciones de eritrocitos, Ficoll/Hypaque y trombocitos a continuación las células se sometieron a múltiples etapas de lavado. Mientras que hasta el aislamiento de las PBMC todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente para evitar la agregación de trombocitos, las etapas de lavado se realizaron a 4°C para evitar la adhesión de monocitos a los materiales de plástico usados y evitar de este modo su pérdida. En la primera etapa de lavado, las células se centrifugaron a 400 g durante 8 min a 4°C. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de PBS frío y se rellenó hasta 45 ml con PBS frío. 45 Las siguientes etapas de lavado se realizaron del mismo modo, sin embargo, la centrifugación se realizó a 300 g durante 5 min. Las etapas de lavado se repitieron hasta que el sobrenadante fuera claro y el sedimento presentara un color amarillo (aproximadamente 5-6 x). Las células se resuspendieron a continuación en respectivamente 5 ml de medio frío, se aunarón y el volumen se rellenó con medio frío hasta 30 ml. El número de células se determinó con ayuda del aparato de recuento celular automático con un tamaño de exclusión de 8 µm y se ajustó con medio frío una 55 concentración de 4 x 10⁶ células/ml.

Se pusieron respectivamente 600 µl de las PBMC aisladas anteriormente en una concentración de 4 x 10⁶ células/ml en una cavidad de placas de cultivo celular de 24 pocillos. A continuación se añadió el correspondiente volumen de las moléculas a ensayar de tal forma que la concentración en la preparación ascendió a 1 µM. Las células se incubaron durante 2 días (42-48 h) en la incubadora. La suspensión celular se transfirió a un recipiente de reacción Eppendorf y se centrifugó a 3000 rpm/min en la Biofuge durante 4 min. Los sobrenadantes sin células obtenidos de este modo se transfirieron a un nuevo recipiente de reacción y se utilizaron directamente para la determinación de la concentración de citocinas con ayuda de ELISA o se almacenaron a -70°C.

65 Cultivo de células HEK293

Las células se cultivaron en matraces de cultivo celular de 162 cm². Se sembraron con una densidad de 1,3-1,9x10⁵ células/cm². Después de 2-3 días de incubación en la incubadora las células se dividieron 1:3. Para esto se aspiró el

medio, las células se lavaron con 10 ml de PBS y a continuación se incubaron a temperatura ambiente 3-5 min hasta el desprendimiento con 5 ml de solución de tripsina/EDTA. La reacción se detuvo mediante la adición de 5 ml de medio. Las células se resuspendieron y se añadieron otros 5 ml de medio. Respectivamente 5 ml de la suspensión celular se dejaron en el matraz de cultivo celular o se transfirieron a uno nuevo y se añadieron 45 ml de medio. En ocasiones se produjo el desprendimiento de las células del fondo del matraz antes de que se hubiera aspirado el medio. En este caso, las células se transfirieron a un tubo de centrifuga estéril y se eliminaron mediante centrifugación a 300 g durante 4 min. A continuación se aspiró el medio y las células se resuspendieron en 5 ml de solución de tripsina/EDTA, se añadieron 10 ml de medio y se transfirieron tal como se ha descrito anteriormente a un nuevo matraz de cultivo celular.

Estimulación de células HEK293

Para el establecimiento del ensayo se sembraron respectivamente células HEK293-TLR9 y HEK293-Null en concentraciones de $0,6-1 \times 10^6$ células/ml en un volumen de 400 μ l en placas de cultivo celular de 24 pocillos y se cultivaron de 1 a 5 días. El número de células se determinó con ayuda del aparato de recuento celular con un tamaño de exclusión de 8 μ m y se ajustó la correspondiente concentración. Con un cultivo más prolongado se realizó un cambio de medio después de 48 h. Para esto se aspiró cuidadosamente el medio y se pusieron respectivamente 400 μ l de medio fresco cuidadosamente sobre las células. En algunas preparaciones se realizó un cambio de medio también directamente antes de la adición de los estimulantes. La estimulación se realizó mediante la adición de un correspondiente volumen de los ODN/moléculas, de tal forma que se alcanzó una concentración final de 2,5 μ M o 1 μ M. Se utilizaron LPS en una concentración de 0,5 μ g/ml. Las células se incubaron a continuación durante diversos tiempos (6-48 h) en la incubadora. A continuación, el medio se transfirió a recipientes de reacción de 1,5 ml, se centrifugó a 1400 rpm/min en la Biofuge para sedimentar las células eventualmente contenidas y los sobrenadantes se utilizaron para la determinación de la concentración de IL-8 con ayuda de ELISA.

Determinación de citocina/quimiocina con ayuda de ELISA

Para la investigación del efecto inmunomodulador de dSLIM sobre PBMC se midió la inducción de IL-6, IFN-alfa e IFN-gamma.

La IL-6 es una citocina multifuncional, que se secreta por múltiples linfocitos y monocitos activados y además de la inducción de proteínas de fase aguda en hepatocitos tiene sobre linfocitos un efecto favorecedor del crecimiento y diferenciación así como de la fagocitosis [Kirchner 1994].

El IFN-alfa, del que existen varios subtipos, pertenece a la familia de los interferones de tipo I, que actúan principalmente de forma antivírica. Se secretan grandes cantidades de IFN- α por pDC después de la activación de TLR7, 8 ó 9 [Perry 2005] véase también la sección 1.3.2.

El IFN-gamma se secreta principalmente por linfocitos NK y linfocitos T, sin embargo, también por monocitos, células dendríticas y linfocitos B. Es el único interferón del tipo II y tiene a diferencia de los interferones de tipo I un efecto más bien inmunomodulador que antivírico. Además de su papel en la diferenciación, el IFN-gamma es la citocina efectora más importante de una respuesta inmune dirigida a T_H1 .

La secreción de IL8/CXCL8 sirvió como comprobación de la activación de TLR9 en células HEK293 transformadas. La IL-8 es una quimiocina CXC que se secreta por leucocitos, sin embargo, también por fibroblastos, células endo- y epiteliales. La inducción de IL8/CXCL8 se realiza, por ejemplo, mediante IL-1 y TNF-gamma, sin embargo también mediante PRR y factores ambientales tales como hipoxia. La expresión de IL8/CXCL8 se regula mediante regulación de la transcripción a través de activación cooperativa de NF-alfa y AP-1 así como en el plano de la estabilidad de ARNm. Además de su acción como activador de neutrófilos, IL8/CXCL8 actúa de forma quimiotáctica sobre diversos leucocitos y está implicado en el proceso de la trans migración de leucocitos al tejido [Mukaida 2003].

Para la determinación de citocinas en los sobrenadantes de cultivo celular de PBMC y células HEK293 se usó el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (“*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*”) (ELISA) como “*ELISA de tipo sándwich*”. Se trata de un inmunoensayo cuantitativo, en el que se inmovilizan anticuerpos específicos para la proteína a detectar en la superficie de una placa de microtitulación mediante adsorción. Mediante la unión de antígenos al respectivo anticuerpo éstos también se inmovilizan y se pueden eliminar mediante lavado otros constituyentes. Ya que en el caso de la unión de antígeno y anticuerpo se trata de una reacción de equilibrio, la cantidad del antígeno unido depende de la concentración. La comprobación del antígeno se realiza con un segundo anticuerpo específico biotinilado que, a su vez, se une a la enzima conjugada con estreptavidina utilizada para la detección. En el caso del ensayo realizado en el presente documento se trataba a este respecto de peroxidasa de rábano rústicano (*horseradish peroxidase* = HRP). El tamaño de medición en sí representa la cantidad (concentración) transformada por la enzima en un determinado tiempo de un sustrato cromógeno. En este caso se usó como sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) que se oxida en presencia de H_2O_2 y después absorbe luz de una longitud de onda de 370 nm (azul). Mediante la adición de H_2SO_4 se detiene la reacción, por lo que la longitud de onda de absorción se modifica a 450 nm (amarillo) [Luttmann 2004]. Con ayuda de una serie de dilución patrón de una concentración conocida de la citocina a determinar, de esta manera se pueden determinar las concentraciones desconocidas de citocina en los sobrenadantes de cultivo celular.

ES 2 357 692 T3

Los pares de anticuerpos, soluciones de patrón, enzimáticas y de sustrato necesarios se obtuvieron como kits de la empresa R&D Systems. Los aparatos y materiales necesarios para la realización están indicados en la siguiente tabla.

IL-6 e IFN-gamma

5 La determinación de IL-6 e IFN-gamma en los sobrenadantes de cultivo celular de PBMC se realizó con los kits “Sistema de Desarrollo de ELISA DuoSet” de la empresa R&D Systems de forma correspondiente a las instrucciones adjuntas. Para esto se diluyó el “anticuerpo de captura” con PBS hasta una concentración de 4 µg/ml (IFN-gamma) o 2 µg/ml (IL-6) y se pusieron respectivamente 100 µl en una cavidad de la placa de microtitulación. La placa se
10 incubó durante una noche a temperatura ambiente, a continuación se lavó 3 x con tampón de lavado y se incubó con respectivamente 300 µl de tampón de bloqueo por cavidad para la saturación de sitios de unión libres durante 1-2 h. La placa se lavó 3 x con tampón de lavado y a continuación se pusieron respectivamente 100 µl de las muestras y patrones sobre la placa. Los sobrenadantes se utilizaron para la determinación de IL-6 en una dilución de 1:2 en tampón de reactivo y para la determinación de IFN-gamma sin diluir. La serie de dilución patrón para IL-6 comprendía las
15 siguientes concentraciones: 12,5; 25; 50; 100; 200; 350; 700 pg/ml. La serie de dilución patrón para IFN-gamma comprendía las siguientes concentraciones: 12,5; 25; 50; 100; 250; 500; 1000 pg/ml. Se realizaron respectivamente determinaciones dobles. El tiempo de incubación ascendió a 2 h. Después de lavado tres veces con tampón de lavado se pusieron respectivamente 100 µl del “anticuerpo de detección” en una concentración de 100 ng/ml (IL-6) o 200 ng/ml (IFN-gamma) en tampón de reactivo sobre la placa. Después de un tiempo de incubación de 2 h, la placa se lavó
20 3 x con tampón de lavado y se pusieron respectivamente 100 µl de “Estreptavidina-HRP” 1:200 diluidos en tampón de reactivo en las cavidades. El tiempo de incubación ascendió a 20 min. Después de una última etapa de lavado de 3 veces se pusieron respectivamente 100 µl de la solución de sustrato (“Reactivo de Color” A y B en la relación 1:1) sobre las placas y se incubaron en oscuridad durante 20 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ 1 M) y se midió la absorción en las cavidades individuales en el aparato de lectura de microplaca a 450 nm. La
25 evaluación se realizó con el software SoftMax Pro 2.6. La curva patrón se calculó con un ajuste de 4 parámetros.

INF-alfa

30 La determinación de IFN-alfa en los sobrenadantes de cultivo celular de PBMC se realizó con el kit “ELISA para Interferón-alfa Humano” de la empresa Biosource de forma correspondiente a la instrucción adjunta. Por cavidad se pusieron 100 µl de los patrones y muestras en las tiras de microtitulación ya provistas de anticuerpos y contenidas en el kit bloqueadas y se incubaron durante 1 h a TA. Los sobrenadantes se utilizaron diluidos 1:2 con “tampón de dilución” y la serie de dilución patrón comprendía las siguientes concentraciones: 156; 312; 625; 1250; 2500; 5000 pg/ml. Después de una etapa de lavado se añadieron respectivamente 100 µl del “Concentrado de Anticuerpo D” en “tampón
35 de dilución C” por cavidad y se incubaron durante 1 h a TA. La placa se lavó 3 x y se pusieron respectivamente 100 µl de HRP en “Diluyente de HRP” sobre las placas y se incubaron durante 1 h. La solución se retiró mediante lavado de 4 veces y se pipetearon respectivamente 100 µl de “solución de sustrato G” en las cavidades. La incubación se realizó en oscuridad durante 20 min y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de “solución de detención H”. En el aparato de lectura de microplacas se midió la absorción a 450 nm. La evaluación se realizó con el software SoftMax
40 Pro 2.6. La curva patrón se calculó con un ajuste de punto a punto.

IL-8/CXCL8

45 La determinación de IL-8/CXCL8 en los sobrenadantes de cultivo celular de células HEK293 se realizó con el kit “Sistema de Desarrollo de ELISA DuoSet” de la empresa R&D Systems de forma correspondiente a la instrucción adjunta y era idéntica a la descrita con IL-6 e IFN-. La serie de dilución patrón comprendía las siguientes concentraciones: 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 pg/ml. Los sobrenadantes se utilizaron sin diluir. Las concentraciones de anticuerpos utilizadas ascendieron a: “anticuerpo de captura” 4 µg/ml, “anticuerpo de detección” 20 ng/ml.

Preparación y descripción de moléculas de ADN multiméricas

55 Para investigar la influencia de características estructurales que favorecen particularmente la capacidad para la configuración de estructuras de G se prepararon combinaciones de moléculas de ADN monoméricas con motivos poli(G) en diversas regiones con el procedimiento de acuerdo con la invención, que aparte de la liofilización se corresponde con la preparación del monómero. Para esto se combinaron entre sí respectivamente tres secuencias diferentes para tallo (S) y bucle (L) que por un lado se diferencian en la cantidad y localización de bases de guanina, sin embargo, también en la estructura secundaria del bucle predicha mediante el programa “DNA mfold”. Las secuencias individuales y sus características estructurales están reproducidas en la siguiente tabla:

60

65

ES 2 357 692 T3

TABLA 3.1

Características estructurales y secuencias L1-L3, S1-S3 (rojo: poli(G))

Nombre	Secuencia	Características estructurales	
		Secuencia poli(G)	Bucle que tiende a abierto
L1	T CAT TGG AAA ACG TTC TTC GGG GCG TTC TT	corta (G ₄) dentro de motivo CG	no
L2	T CAT TCC ATA TCG TTC TTC GTG TCG TTC TT	ninguna	sí
L3	T CGG GGG GTA TCG TTC TTC GTG TCG TTC TT	larga (G ₆) fuera del motivo CG	sí
S1	5'-CCT AGG GGT TAC CAC CT... 3'-CCA ATG GTG GA...	corta	
S2	5'-CTG CAG CTG TAG CAG CT... 3'-GAC ATC GTC GA...	ninguna	
S3	5'-CCT AGG GGT GGG GGC CT... 3'-CCA CCC CCG GA...	larga (G ₄ TG ₅)	

El siguiente esquema proporciona una visión general acerca de las combinaciones usadas y su nomenclatura usada por lo demás:

TABLA 3.2

Nomenclatura de las moléculas con diversas combinaciones de bucle/tallo

	S1	S2	S3
L1	30L1	-	MS
L2	ML	KG	GS
L3	-	GL	GLS

Se pudo mostrar que las moléculas de dSLIM poliméricas, que en el sentido de la invención también se pueden denominar moléculas multiméricas o moléculas oligoméricas, son bastante bien adecuadas para provocar en un organismo una respuesta inmune aumentada. Esta respuesta inmune aumentada permitió utilizar los agentes ventajosamente en relación con agentes quimioterapéuticos. La combinación de agentes quimioterapéuticos y el agente de acuerdo con la invención conduce frente al efecto aditivo de los dos agentes a un efecto sinérgico durante el tratamiento de tumores. Mediante la combinación del agente de acuerdo con la invención, que se puede obtener mediante las etapas del procedimiento que se han mencionado (véase reivindicación principal), se refuerzan todos los efectos de los agentes quimioterapéuticos o citostáticos utilizados de forma adicional. Incluso cuando ya se combinaron formas monoméricas de moléculas de dSLIM con agentes quimioterapéuticos o citostáticos, el efecto que se consigue mediante la combinación de la forma multimérica o polimérica de dSLIM con citostáticos fue completamente sorprendente. En la aplicación práctica de un agente de combinación de la forma monomérica de dSLIM y los citostáticos se mostró que se pueden mejorar solamente determinadas propiedades de los citostáticos, no sin embargo - tal como en la forma polimérica - la totalidad de sus propiedades. También la activación del sistema inmune era sorprendentemente mayor por la forma polimérica/multimérica de dSLIM, de tal forma que se pudo obtener un resultado total durante el tratamiento de tumores que estaba sorprendentemente mejorado con respecto al uso de la forma monomérica de citostáticos. De este modo se pudo evitar particularmente la configuración de metástasis mediante la utilización de moléculas de

ES 2 357 692 T3

dSLIM multiméricas en un organismo cuando junto con estos agentes se administraron citostáticos/agentes quimioterapéuticos. La administración conjunta en el sentido de la invención significa la administración simultánea al igual que la no simultánea de ambos agentes.

- 5 La figura 3.1.1 muestra de forma ilustrativa las dos estructuras secundarias diferentes calculadas para las tres secuencias de bucle de “DNA mfold” de las moléculas de dSLIM 30L1 (tal como MS) y KG (tal como ML, GS, GL, GLS). En KG no se predijo en las condiciones seleccionadas ningún emparejamiento de bases en el bucle a diferencia de 30L1.

10 *Preparación de diferentes moléculas monoméricas y multiméricas*

La figura 3.1.2 muestra el resultado de la separación de respectivamente 0,3 μg de las preparaciones de ligación y de la digestión con T7 de muestra de las diversas moléculas dSLIM además del ODN 30L1 en un gel de agarosa al 3%. En todos los carriles en los que se separaron las diversas moléculas se puede observar una banda justo debajo de la altura a la que ha avanzado el fragmento de 100 pb del marcador, que se corresponde con la molécula monomérica. En el carril que contenía el ODN 30L1 es visible una banda por debajo de la banda para las moléculas monoméricas. En el caso de las moléculas que contenían L3 (GL, GLS) se puede ver una distribución borrosa del ADN en la zona superior del gel hasta los bolsillos, que en GLS está claramente más marcada y en GLS en la preparación de digestión con T7 está disminuida en comparación con la preparación de ligación. En el caso de las moléculas que contenían motivos poli(G) largos (GL, GS, GLS, MS), las bandas en el gel son relativamente borrosas en comparación con las demás moléculas (30L1, KG, ML). En los carriles sobre los que se aplicaron las preparaciones de digestión con T7, las intensidades de la fluorescencia, particularmente en la zona superior del gel, son menores que en los carriles que se dotaron de preparación de ligación.

25 En la figura 3.1.3 están reproducidos los cromatogramas de una purificación posterior mediante HPLC de las diversas moléculas. Está representada respectivamente la absorción a 260 nm (línea azul) frente al volumen que ha fluido a través de la columna después de la inyección (línea de color rosa discontinua) de la muestra a separar. La línea verde representa el gradiente de tampón NaCl del 0%, 50% y 100% del tampón NaCl 1 M (T20N1000). El primer pico con su máximo en 2,5 ml y T20N1000 al 0% (F2) se corresponde con las moléculas no unidas, el segundo pico con su máximo en 8 ml y T20N1000 a 50% (F3), con las moléculas con una menor afinidad por la fase estacionaria (en ambas fracciones no se pudo comprobar ADN a pesar de la aplicación de 12 veces la cantidad en comparación con la fracción F4 en el gel de agarosa). El tercer pico con su máximo en 14 ml y T20N1000 al 100% (F4) se corresponde con las moléculas monoméricas.

35 *Figura 3.1.3*

Cromatogramas de la purificación mediante HPLC de diversas moléculas monoméricas y multiméricas

40 a) 30L1 b) ML, c) KG, d) MS, e) GS, f) GLS, g) GL, columna: 1 ml de DMAE; cantidad de aplicación: 700 μg ; caudal 1 ml/min; tampón A: Tris 20 mM pH 7; tampón B: Tris 20 mM, NaCl 1 M; pH 7; gradiente: tampón B al 0%, 50%, 100%.

En la comparación de los cromatogramas de las diversas moléculas es evidente que F4, en las moléculas que no contienen motivos poli(G) largos, es decir, ni S3 ni L3 (30L1, ML, KG) tiene un solo pico. Por el contrario, en las moléculas que contienen S3 puede observarse un saliente en F4. En las moléculas que contienen L3 (GL, GLS) el máximo tiene dos picos, diferenciándose la distribución de las intensidades entre GL y GLS. El GLS, ambos máximos parciales tienen aproximadamente la misma intensidad, mientras que en GL el máximo parcial observado con un mayor volumen presenta una mayor intensidad que el del menor volumen. Los máximos secundarios o salientes que se presentan se fraccionaron por separado mediante intervención manual. Las fracciones se denominaron de forma correspondiente a la secuencia temporal de su elución F1 y F2.

Sobre el gel de agarosa que está representado en la Figura 3.1.4 están aplicadas las fracciones de dSLIM que se han descrito anteriormente de la separación mediante HPLC después de la precipitación con etanol, es decir, los productos finales. En todos los carriles se puede ver la banda correspondiente a las moléculas monoméricas justo por debajo de la amplitud de avance del fragmento de 100 pb del marcador. En ML y KG se puede observar una segunda banda más débil justo por encima de esta banda, que presenta en ML una mayor intensidad. GL, MS y GLS muestran una movilidad ligeramente mayor en el gel que las demás moléculas. Por encima de la banda de dSLIM se puede observar en las moléculas que no contienen motivos poli(G) largos (30L1, KG, MS) una distribución no discreta de la intensidad hasta la altura de aproximadamente 200 pb. En KG y ML se puede observar además una débil banda a la altura del fragmento de 200 pb del marcador.

Figura 3.1.4

Diversas moléculas monoméricas y multiméricas después de la precipitación con etanol

65 Gel de agarosa al 3%, cantidad de aplicación 0,3 μg , marcador 100 pb 0,5 mg (100 pb, 30L1, 30L1, KG, ML, GL-F1, GL-F2, MS-F1, MS-F2, GS-F1, GS-F2, GLS-F1, GLS-F2, 100 pb).

ES 2 357 692 T3

En las moléculas en las que se observó durante la purificación mediante HPLC una distribución de varios picos y se fraccionaron los máximos, respectivamente la fracción 1 se corresponde principalmente con la banda monomérica, mientras que los carriles sobre los que se aplicaron las fracciones 2 muestran principalmente una distribución de la intensidad a lo largo de una amplia zona por encima de la banda monomérica. A este respecto se parecen las distribuciones de la intensidad de MS y GS que alcanzan aproximadamente partiendo de la banda monomérica una altura de avance correspondiente a 500 pb. Por el contrario, en GL ésta comienza por encima de 200 pb y alcanza el bolsillo del gel. A diferencia de esto, en GLS se puede observar partiendo de la banda monomérica una distribución del ADN a lo largo de todo el carril.

10 Figura 3.1.6

Desnaturalización térmica de diversas moléculas monoméricas y multiméricas

15 Gel PAGE nativo al 8% (C del 2,6%), cantidad de aplicación 0,25 μg , marcador 25 pb 0,3 μg (25 pb, no tratado, desnaturalización 95°C 10 min; 30L1, MS, ML, KG, GS, GL-F2, GLS-F2).

En el gel en la Figura 3.1.6 se puede ver cómo la desnaturalización térmica de las diversas moléculas influye sobre su comportamiento de avance en el gel. Para esto se dividieron las preparaciones y se calentó una parte durante 10 min a 95°C y se enfrió inmediatamente sobre hielo y se aplicó. Las bandas a observar se corresponden con las del gel descrito en 3.1.5, sin embargo, en este caso también es visible ADN no separado en MS y GS en el bolsillo del gel y en MS se puede ver una segunda banda que avanza a la misma altura que la segunda banda de 30L1. En el caso de GS y MS se trata de otro lote de producción que en gel mostrado en la Figura 3.1.5, en la que los máximos secundarios no se recogieron por separado en el fraccionamiento de HPLC. La comparación de las bandas en el gel de dSLIM desnaturalizado y no desnaturalizado muestra que después del calentamiento en todas las moléculas la intensidad de la 1ª banda está disminuida y la de la 2ª banda, aumentada. La banda que aparece en los carriles ML y KG en el tercio superior del gel ya no se puede ver después de la desnaturalización. Tampoco se puede seguir observando el ADN en los bolsillos de los carriles sobre los que se aplicaron MS y GS después de la desnaturalización. En los carriles GL-F2 y GLS-F2 la cantidad del ADN en el bolsillo también está disminuida, en cambio se hace visible una mayor cantidad de bandas dispuestas de forma regular por encima de la 2ª banda.

30

Para comprobar si la modificación causada por la desnaturalización es reversible se dividieron las muestras desnaturalizadas y se incubaron respectivamente durante 3 días a 4°C o 37°C. Las preparaciones de dSLIM no tratadas se conservaron a 4°C y se dividieron asimismo después de 3 días y se calentó respectivamente una alícuota durante 10 min a 95°C y se puso inmediatamente sobre hielo. Los resultados de la PAGE nativa, con la que se separaron las preparaciones, están representados en las Figuras 3.1.7 y 3.1.8. Las muestras no tratadas y desnaturalizadas muestran en el gel el mismo comportamiento de avance que el que se describió para el gel representado en la Figura 3.1.6. Las muestras desnaturalizadas que se incubaron a 4°C se corresponden en su comportamiento de avance con las muestras desnaturalizadas directamente antes de la aplicación. Las muestras incubadas a 37°C muestran un comportamiento de avance en el gel que se corresponde sustancialmente con el de las muestras no tratadas. Sin embargo, la intensidad de la segunda banda en 30L1, MS y GS es mayor que en éstas. Una diferencia también consiste en la cantidad del ADN que permanece en el bolsillo del gel en GS y MS, que en comparación con la muestra no tratada ya solamente es muy pequeña.

35

40

Molécula dimerica y fracciones de 30L1 monoméricas

45

Para comprobar si en el caso de la banda a observar en el tercio superior se trata de una banda correspondiente a un dímero se aplicó una fracción (F3), que se obtuvo de una gran cantidad de moléculas monoméricas mediante separación por HPLC y que representa esta banda, junto con la molécula dimerica 60L1 sobre una PAGE nativa.

50 Figura 3.1.9

Comparación de la fracción 3 con la molécula dimerica 60L1

55 Gel PAGE nativo al 8% (C del 5%), cantidad de aplicación 0,25 μg , marcador 25 pb 0,3 μg (25 pb, F3, F3 95°C, 60L1, 60L1 95°C, fracción 1 (F1), fracción 2 (F2), fracción 3 (F3), fracción 4 (F4) de la purificación mediante HPLC de dSLIM30L1, 60L1).

Las bandas observadas avanzan a la misma altura. Si las muestras se aplican de forma desnaturalizada sobre un gel, entonces las bandas se encuentran más por encima en el gel en comparación con un carril sobre el que se aplicaron las muestras no tratadas. Los correspondientes carriles de la PAGE nativa están representados en la Figura 3.1.9 junto el resultado de la separación de las cuatro diversas fracciones obtenidas mediante el fraccionamiento por HPLC del monómero 30L1.

60

Medio de incubación, unión de proteína

65

Para investigar hasta qué punto las condiciones en el cultivo celular, particularmente la presencia de proteínas, influyen sobre las moléculas usadas para la estimulación, las mismas se incubaron en medio de cultivo celular durante 0, 5 y 27 h a 37°C y se separaron junto con las moléculas disueltas en agua mediante PAGE nativa. Las proteínas que se

ES 2 357 692 T3

encuentran en el medio se comprobaron en el gel después de la tinción del ADN con ayuda de tinción de Coomassie. Los resultados están representados en las Figuras 3.1.10 y 3.1.11.

Figura 3.1.10

5

Incubación de moléculas monoméricas en medio

Gel PAGE nativo al 8% (C del 5%), cantidad de aplicación 0,25 μg , marcador 25 pb 0,3 μg , marcador 50 pb 0,3 μg (50 pb, 27 h medio, 5 h medio, 0 h medio, H₂O: 30L1, ML, F3, KG, 25 pb).

10

Gel PAGE nativo al 8% (C del 2,6%), cantidad de aplicación 0,25 μg , 25 pb 0,35 μg (27 h medio, 5 h medio, 0 h medio, H₂O: GL, 25 pb).

15

Recorte de la tinción con Coomassie de PAGE nativo al 8% (C del 5%) de la Figura 3.1.11 a) (27 h medio, 5 h medio, 0 h medio, H₂O: ML).

20

Las Figuras 3.1.10 a y 3.1.10 b muestran la PAGE teñida con bromuro de etidio sobre la que se aplicaron las moléculas. En la Figura 3.1.10 c está representado de forma ilustrativa un recorte del gel teñido con Coomassie para la comparación de las amplitudes de avance. La comparación de los carriles con las diferentes preparaciones muestra que en todas las moléculas en el medio aparece una banda en el bolsillo de gel que no está presente en los carriles de H₂O (con excepción de GL). La banda que aparece en la zona superior del gel en H₂O con 30L1 y la fracción 3 presenta en el medio una menor amplitud de avance que se encuentra a la altura de la banda de proteína inferior. La intensidad de las bandas tanto de ADN como de proteína disminuye con creciente duración de incubación. En el caso de GL, la intensidad de la 2ª banda en el medio aumenta en comparación con H₂O.

25

Figura 3.1.11

Incubación de ODN M362 en medio

30

Gel PAGE nativo al 12% (C del 5%), cantidad de aplicación 0,25 μg , marcador 25 pb 0,3 μg (25 pb, H₂O, 0 h medio, 5 h medio, 27 h medio).

35

Recorte de tinción con Coomassie de gel PAGE nativo al 12% (C del 5%) de la Figura 3.1.12 a) (H₂O, 0 h medio, 5 h medio, 27 h medio).

40

La Figura 3.1.11 muestra la PAGE nativa sobre la que se aplicó la molécula de control protegida con fosforotioato M362. En este caso se puede observar claramente que la banda de ADN visible en el borde inferior del gel en H₂O ha desaparecido en el medio. En lugar de esto se puede ver sin embargo una banda en el borde superior del gel, que coincide en la amplitud de avance con la banda de proteína inferior (Figura 3.1.11 b) así como una banda en los bolsillos del gel. También en este caso se puede observar una disminución de la intensidad de las bandas de ADN con creciente tiempo de incubación.

45

Para verificar que las modificaciones observadas estaban causadas por la presencia de proteínas y no por otros constituyentes del medio, las moléculas se diluyeron para la comparación también en medio sin adición de FCS. En la Figura 3.1.12 están representados los correspondientes carriles de los geles de forma ilustrativa para dSLIM (KG) y M362. En los carriles en los que los ODN y las moléculas se separaron en medio sin FCS, la distribución de la intensidad se corresponde con aquellos a los que se aplicaron los ODN y dSLIM disueltos en agua. Los ODN y las moléculas disueltos en medio con FCS muestran por el contrario un comportamiento de avance en la PAGE nativa que se corresponde con el descrito para las Figuras 3.1.10 y 3.1.11 para los carriles a los que se aplicaron las moléculas monoméricas y ODN diluidos en medio.

50

Efecto inmunoestimulador: estimulación de PBMC

55

El efecto inmunomodulador de las diversas moléculas se investigó en PBMC que se aislaron de donaciones de sangre humana. Para esto, las PBMC se incubaron con la respectiva molécula o la molécula de control M362 en una concentración final de 1 μM durante 48 h y se midió la cantidad de IL-6, IFN-alfa e IFN-gamma en los sobrenadantes de cultivo celular con ayuda de ELISA. Como control sirvieron células que se incubaron sin adiciones.

60

Los resultados de ELISA de sobrenadantes de PBMC que se aislaron de 4 donaciones de sangre (donante A-D) están representados en los diagramas en la figura 3.2.1 a-c. Los valores se corresponden respectivamente a los valores promedio de determinaciones dobles y las barras de error representan la doble desviación típica determinada a partir de esto. Para los valores indicados con * se realizaron adicionalmente determinaciones dobles en la estimulación de las PBMC y los valores indicados se corresponden con los valores medios de los cuatro resultados de ELISA obtenidos. Las barras de error se corresponden con el doble de la desviación típica de estos cuatro valores.

65

ES 2 357 692 T3

Figura 3.2.1 a-c

Resultados de ELISA de IFN-gamma (a), IFN-alfa (b), IL-6 (c) de PBMC

- 5 Sobrenadantes de PBMC ($2,4 \times 10^6$ células por preparación en $600 \mu\text{l}$) de diversos donantes A-D, estimulación 48 h con dSLIM/ODN M362 $1 \mu\text{M}$, intervalo de medición convencional --, * determinación doble de cultivo celular, barra de error: 2 x desviación típica de determinación doble de ELISA (*determinación doble de cultivo celular + determinación doble de ELISA = 4 valores).
- 10 Observando los diagramas es evidente en primer lugar que las concentraciones de citocinas en los sobrenadantes de los diversos donantes se diferencian intensamente, por lo que se dificulta una comparación de los datos. Las desviaciones típicas de los valores determinados adicionalmente en el cultivo celular como determinación doble se pueden comparar con las desviaciones típicas que se determinaron solamente a partir de la determinación doble en ELISA, lo que indica que las diferencias se basan en diversidades de las PBMC. En las preparaciones no estimuladas
- 15 en todos los donantes no se comprobó ninguna concentración de citocina o sólo muy bajas. En la determinación de la concentración de IL-6 e IFN-gamma, algunos valores determinados se encuentran en el borde superior o fuera del intervalo de medición convencional, que alcanzó en IFN-gamma 10.000 pg/ml y en IL-6 para DSLIM 3500 pg/ml para M362 7000 pg/ml .
- 20 Para posibilitar una mejor capacidad de comparación de los datos de los diversos donantes se normalizaron los valores de citocina obtenidos. Para esto se calculó la proporción porcentual de las concentraciones de citocina determinadas con el valor determinado para M362 para cada donante. Los valores medios de los datos normalizados de este modo de los cuatro donantes están representados en los diagramas en la Figura 3.2.2 a-c. Las barras de error se corresponden con la respectiva desviación del valor medio. Debido a las grandes diferencias que se observaron entre
- 25 los donantes individuales, ésta es muy grande. La representación, sin embargo, posibilita al menos la estimación de una tendencia para las moléculas individuales.

Figura 3.2.2 a-c

Valores medios normalizados de los resultados de ELISA de IFN-gamma (a), IFN-alfa (b), IL-6 (c)

- Resultados de ELISA véase la Figura 3.2.1 normalizados: cantidad de citocina en % de M362 por donante, valores medios de 4 donantes, barras de error: desviación de valor medio.
- 35 Para IFN-gamma, los valores calculados para las moléculas ensayadas se encontraban entre el 40% y el 80% con respecto a los valores de M362, mientras que los valores para KG, ML y GLS-F2 se encontraban más bien en la zona inferior y para GL-F2, más bien en la superior.
- Los valores medios porcentuales de las diversas construcciones para IFN-alfa se correspondían aproximadamente con los de M362, con excepción de los valores calculados para GL-F1, GLS-F1 y GL-F2, que ascendían sólo aproximadamente al 50% de los de M362.
- Los valores medios de las proporciones porcentuales de M362 para IL-6 se encontraban para 30L1, MS, GS, GL-F2 y GLS-F2 por debajo del 50%, mientras que MS y GLS-F2, las construcciones con la menor concentración de endotoxina, también presentaban los valores más bajos. Ligeramente por encima del 50% con respecto a M362 se encontraban los valores para GL-F1 y GL-F2, para los que no existen valores de endotoxina. Los máximos valores de IL-6, que se corresponden con los de M362 o se encuentran por encima del 100%, los presentaban las células estimuladas con KG y ML. En estas dos construcciones también se midió la máxima concentración de endotoxina.

50 Figura 3.3.2

Resultados de ELISA de IL-8 de HEK293-TLR9 duración de la estimulación

- 55 Sobrenadantes de HEK293-TLR9: $400 \mu\text{l}$ /preparación (5×10^5 células/ml); estimulación 6 h, 24 h, 48 h con ODN 2006 $2,5 \mu\text{M}$; $0,5 \mu\text{g/ml}$ de LPS; estimulación 3 días después de la siembra de las células (cambio de medio después de 48 h y antes de la estimulación); barras de error: 2 x desviación típica de la determinación doble de ELISA.
- Proporciones de las cantidades de quimiocinas de preparaciones estimuladas frente a no estimuladas de a); barras de error: suma de errores relativos de la determinación doble de ELISA.
- 60 Las concentraciones de quimiocinas medidas son relativamente bajas. Sin embargo, se puede observar un aumento de la cantidad de IL-8/CXCL8 con duración de incubación creciente en todas las preparaciones que, sin embargo, de 24 h a 48 h ya solamente es muy reducida. También en este caso los respectivos valores para células estimuladas con LPS y no estimuladas son aproximadamente iguales y los de células que se estimularon con ODN 2006 en comparación con las células no estimuladas están aumentados el factor 1,5. En las proporciones de la cantidad de IL-8/CXCL8 determinada en diversos momentos de preparaciones estimuladas frente a no estimuladas no se puede reconocer ninguna diferencia. Por tanto, se realizó además la estimulación durante 24 h.
- 65

ES 2 357 692 T3

Figura 3.3.4

Resultados de ELISA de IL-8 de HEK293-Null de diversas moléculas monoméricas

5 Sobrenadantes de HEK293-Null: 400 μ l/preparación (1×10^6 células/ml); estimulación 24 h con ODN 2006/dSLIM
2 μ M; 0,5 μ g/ml de LPS; estimulación 4 días después de la siembra de las células (cambio de medio después de 48 h
y antes de la estimulación); barras de error: 2 x desviación típica de la determinación doble de ELISA.

10 Proporciones de las cantidades de quimiocinas de preparaciones estimuladas frente a no estimuladas de a); barras
de error: suma de errores relativos de la determinación doble de ELISA.

En ninguna de las preparaciones incubadas con los diversos estimulantes puede observarse una diferencia signifi-
cativa de la secreción de IL-8/CXCL8 en comparación con la preparación no estimulada.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 357 692 T3

REIVINDICACIONES

1. Molécula multimérica para la modulación de la actividad del sistema inmune humano o animal que se puede preparar mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- proporción de una secuencia de ácido oligodesoxirribonucleico 5-fosforilado en agua,
- liofilización hasta que se obtiene un residuo seco y a continuación resuspensión en una solución tampón,
- adición de una ADNligasa de T4, por lo que se obtiene una mezcla de reacción e
- incubación de la mezcla de reacción a 37°C durante al menos 30 minutos.

2. Molécula de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada** porque la secuencia de oligodesoxirribonucleótidos comprende las siguientes secuencias:

- a) GTTCCTGGAG ACGTTCTTAG GAACGTTCTC CTTGACGTTG GAGAGAAC o
- b) ACCTTCCTTG TACTAACGTT GCCTCAAGGA AGGTTGATCT TCATAACGTT GCCTAGATCA o
- c) comprende una secuencia de ácido oligodesoxirribonucleico con la secuencia de bases AACG TTCTTC GGGG CGTT,
- d) y presentando la secuencia de ácido oligodesoxirribonucleico una longitud de 40 a 1.600 nucleótidos.

3. Molécula de acuerdo con la reivindicación precedente, **caracterizada** porque la secuencia de bases de acuerdo con la característica c) está contenida en la secuencia CCTAGGGGTT ACCACCTTCA TTGGAAAACG TTCTTC GGGG CGTTCTTAGG TGGTAACC CCTAGGGGTT ACCACCTTCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGTTC TTAGG TGGTAACC.

4. Molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque la molécula comprende una cadena parcialmente monocatenaria, cerrada covalentemente de restos de desoxirribonucleósido.

5. Molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque la molécula comprende la secuencia de bases $N^1N^2CGN^3N^4$, siendo N^1N^2 un elemento del grupo GT, GG, GA, AT o AA, N^3N^4 un elemento del grupo CT o TT, así como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina y T desoxitimidina.

6. Molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque la secuencia de bases $N^1N^2CGN^3N^4$ está colocada en la zona monocatenaria de la cadena cerrada de restos de desoxirribonucleósido.

7. Molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada** porque uno o varios sustituyentes están unidos mediante enlaces covalentes a la molécula.

8. Molécula de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el sustituyente está seleccionado entre uno de los grupos que comprenden péptidos, proteínas, sacáridos, estructuras antigénicas, ADN y/o ARN.

9. Agente de combinación, **caracterizado** porque comprende una molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6 y un agente quimioterapéutico.

10. Agente de combinación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que comprende anticuerpos, alquilantes, análogos de platino, intercaladores, antibióticos, inhibidores de la mitosis, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, antimetabolitos y/o *L*-asparaginasa, hidroxycarbamida, mitotano y/o amanitina.

11. Agente de combinación de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los alquilantes se seleccionan entre el grupo que comprende:

- derivados de mostaza de nitrógeno, particularmente
 - ciclofosfamida,
 - ifosfamida,
 - trofosfamida,

ES 2 357 692 T3

- melfalan y/o
- clorambucilo
- 5 - alquilsulfonatos, particularmente
 - busulfan y/o
 - treosulfan
- 10 - nitrosoureas, particularmente
 - carmustina,
 - 15 - lomustina,
 - nimustina,
 - estramustina y/o
 - 20 - estreptozotocina
- procarbazona y dacarbazona,
- 25 - temozolomida y/o
- tiotepa
- 30 y/o porque los análogos de platino se seleccionan entre el grupo que comprende:
 - cisplatino,
 - carboplatino y/o
 - 35 - oxaliplatino
- 40 y/o porque los intercaladores se seleccionan entre el grupo que comprende:
 - antraciclinas, particularmente
 - doxorubicina (adriamicina),
 - 45 - daunorubicina,
 - epirubicina y/o
 - idarrubicina,
 - 50 - mitoxantrona,
 - amsacrina y/o
 - 55 - doxifluridina
- y/o porque los antibióticos se seleccionan entre el grupo que comprende:
 - 60 - bleomicina,
 - actinomicina D (dactinomicina) y/o
 - mitomicina
 - 65

ES 2 357 692 T3

y/o porque los inhibidores de la mitosis se seleccionan entre el grupo que comprende:

- alcaloides de la *Vinca rosea*, particularmente

- 5 - vinorelbina,
- vincristina (oncovina),
- 10 - vinblastina y/o
- vindesina

y/o porque los taxanos se seleccionan entre el grupo que comprende:

- 15 - paclitaxel y/o
- docetaxel

20 y/o porque los inhibidores de la topoisomerasa se seleccionan entre el grupo que comprende:

- inhibidores de la topoisomerasa-I, particularmente

- 25 - camptotecina,
- topotecan y/o
- irinotecan y/o

30 - inhibidores de la topoisomerasa-II, particularmente

- etopósido
- 35 - tenipósido

y/o porque los antimetabolitos se seleccionan entre el grupo que comprende:

40 - antagonista de ácido fólico, particularmente

- metotrexato,

- análogos de pirimidina, particularmente

- 45 - 5-fluorouracilo,
- capecitabina,
- 50 - arabinósido de citosina (citarabina) y/o
- gemcitabina,

- análogos de purina, particularmente

- 55 - 6-tioguanina,
- pentostatina,
- 60 - azatioprina,
- 6-mercaptopurina,
- fludarabina y/o
- 65 - cladribina.

ES 2 357 692 T3

12. Molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 y/o agente de combinación de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11 para el uso como fármaco.

5 13. Uso de una molécula de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 y/o un agente de combinación de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11 para la fabricación de un agente para la modulación de un sistema inmune humano o animal o para la modulación de la actividad del sistema inmune, siendo preferentemente la modulación una estimulación o un aumento de la actividad del sistema inmune.

10 14. Uso de acuerdo con la reivindicación precedente, **caracterizado** porque la estimulación comprende una respuesta inmune mediada por o independiente de linfocitos T, preferentemente la respuesta inmune comprende una proliferación de linfocitos B y/o una activación de linfocitos B.

15 15. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la estimulación del sistema inmune comprende una secreción de citocinas.

16. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 y/o el agente de combinación de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11 se utiliza como adyuvante en la vacunación terapéutica o profiláctica.

20 17. Uso de una molécula de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 y/o un agente de combinación de acuerdo con una de las reivindicaciones 9 a 11 para la fabricación de un agente para el tratamiento de una alteración del crecimiento celular, siendo preferentemente la alteración del crecimiento celular una enfermedad tumoral.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

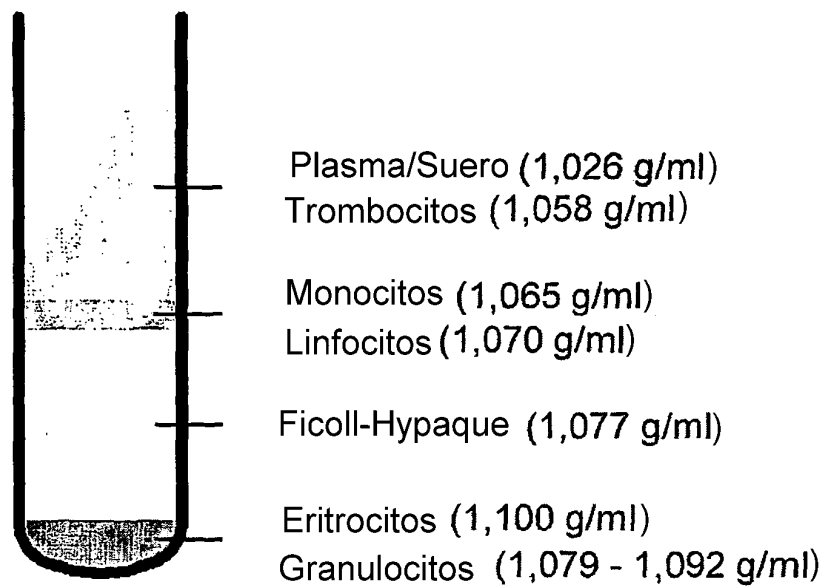
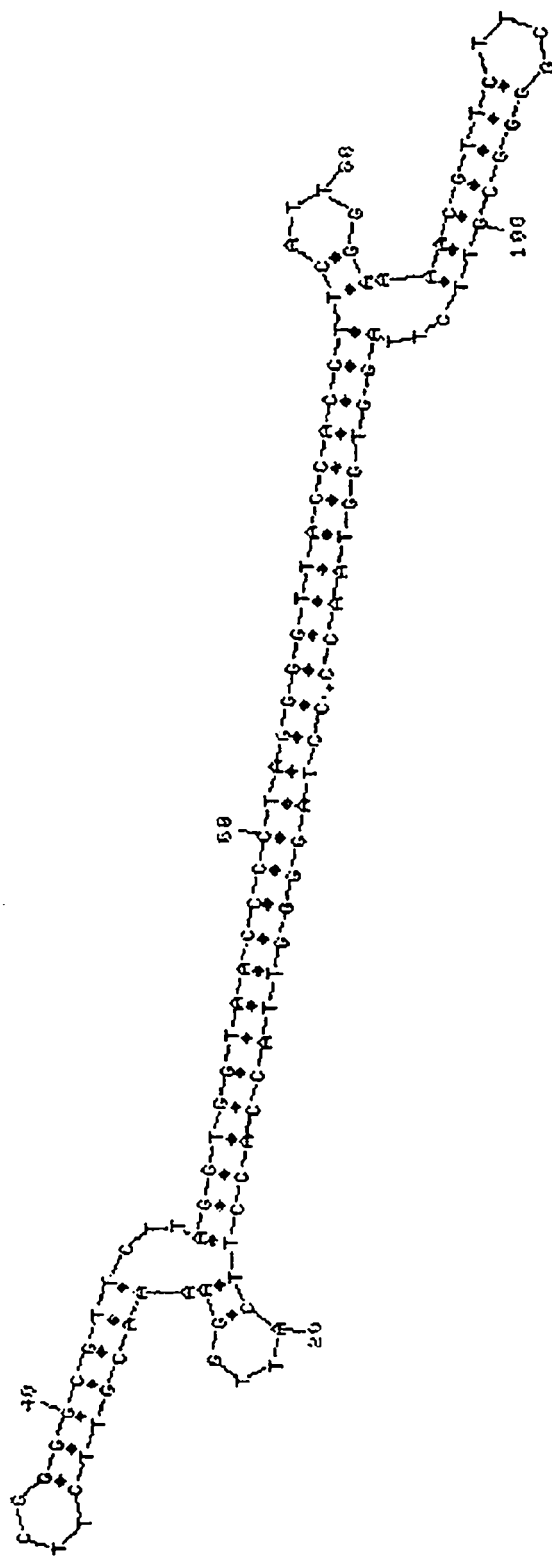


Figura 2.5.1: centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque para el aislamiento de PBMC según [Luttmann 2004]



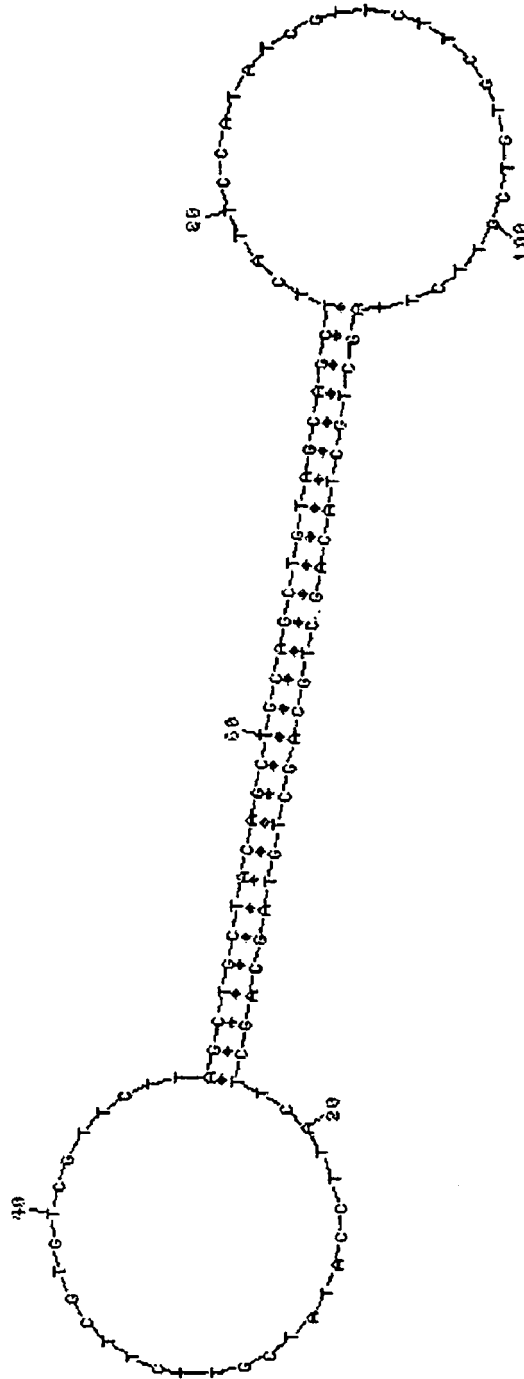


Figura 3.1.1: estructuras secundarias calculadas por "DNA mfold"
Condiciones: NaCl 150 ml, MgCl₂ 0,5 mM y 37°C a) 30L1, b) KG

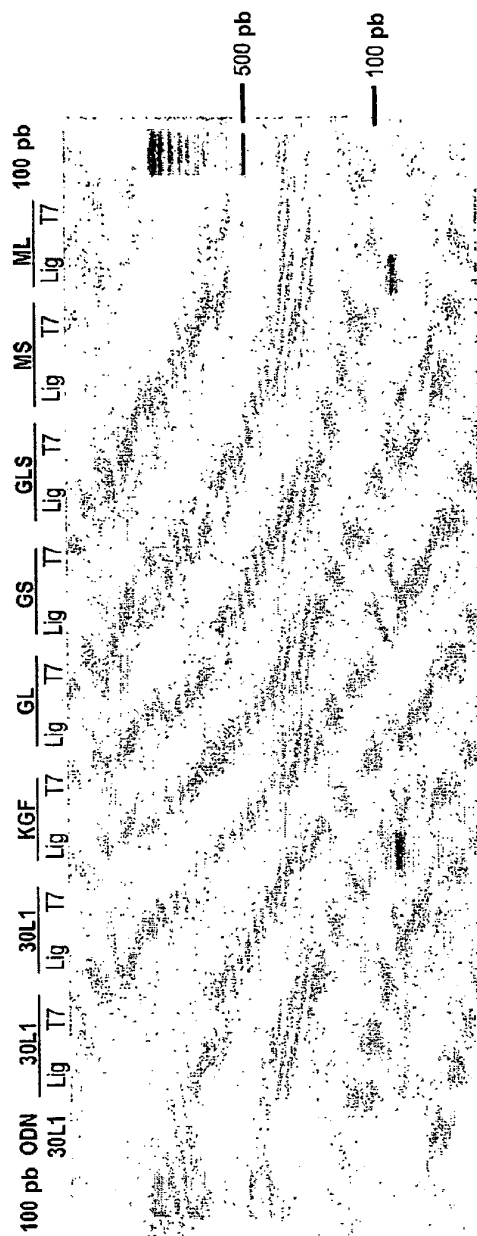
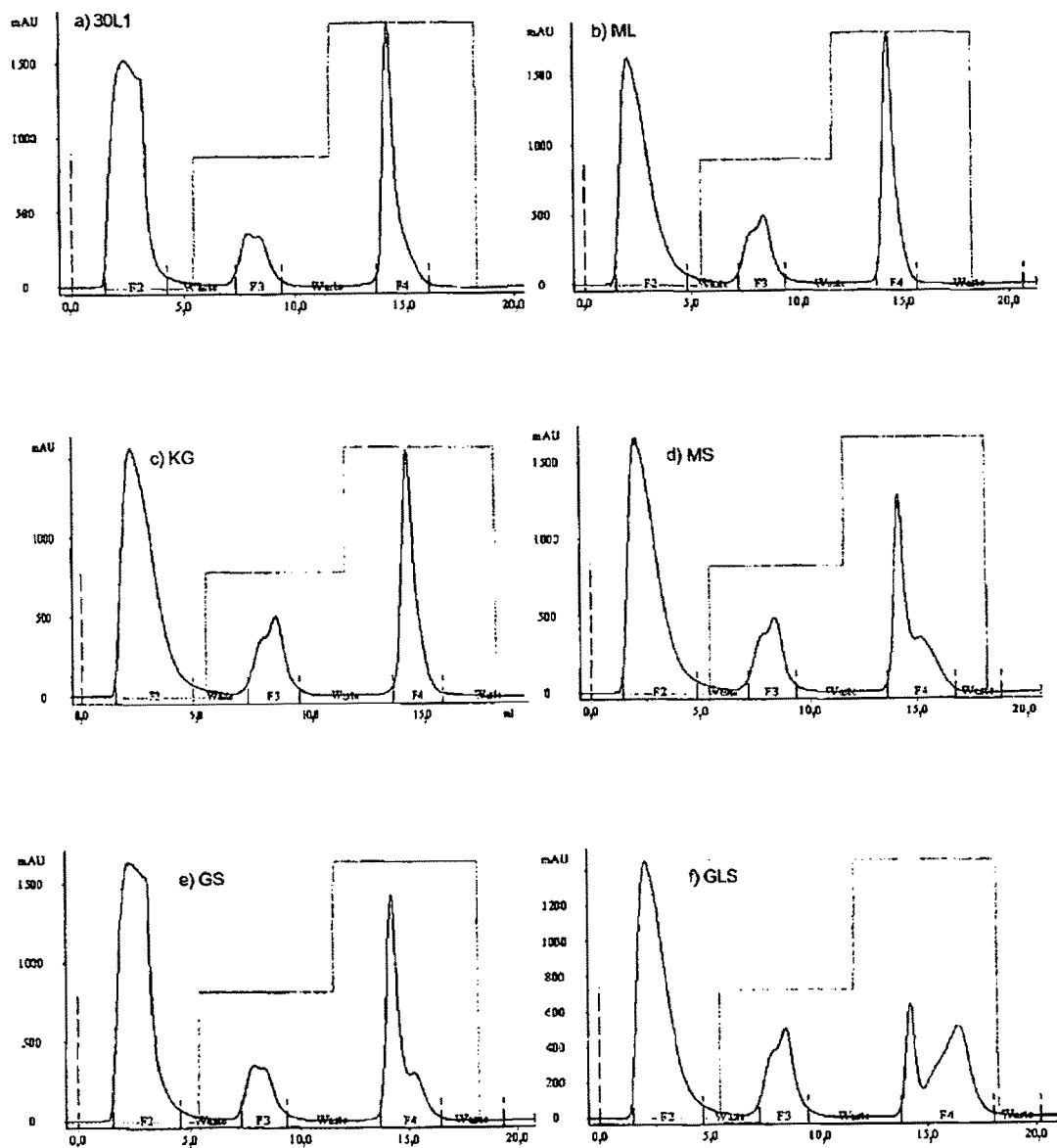


Figura 3.1.2: ligación y digestión con T7 de diversos dSLIM

Gel de agarosa al 3%, cantidad de aplicación respectivamente 0,3 μ g, marcador 100 pb 0,5 μ g (100 pb, ODN30L1, respectivamente ligación, digestión con T7: 30L1, 30L1, KGF, GL, GS, GLS, MS, ML)

ES 2 357 692 T3



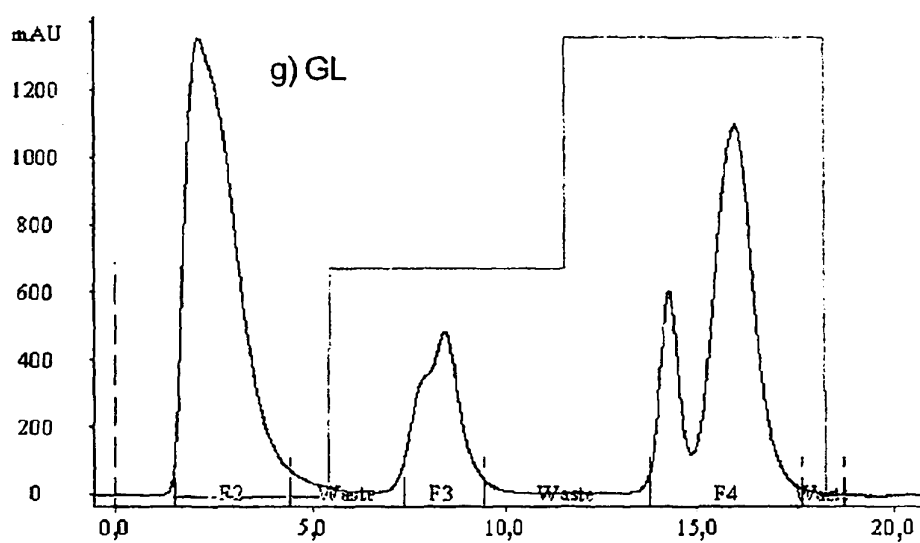


Figura 3.1.3: cromatogramas de la purificación mediante HPLC de diversos dSLIM
 a) 30L1 b) ML, c) KG, d) MS, e) GS, f) GLS, g) GL; columna: 1 ml de DMAE; cantidad de aplicación: 700 μ g; caudal 1 ml/min; tampón A: Tris 20 mM pH 7; tampón B: Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 7; gradiente: tampón B al 0%, 50%, 100%, — absorción 260 nm, — gradiente de NaCl, ---- inyección, fraccionamiento de F2-F4

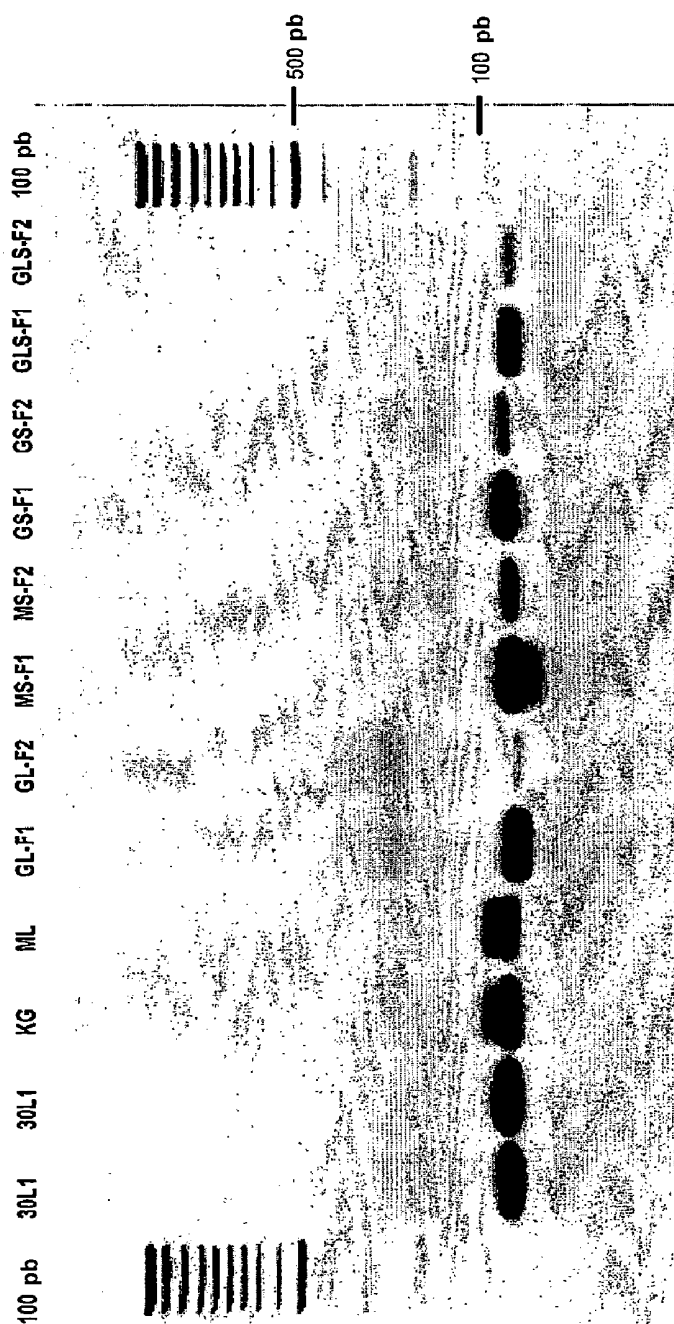


Figura 3.1.4: diversos dSLIM después de la precipitación con etanol
 Gel de agarosa al 3%, cantidad de aplicación 0,3 μg , marcador 100 pb 0,5 μg (100 pb, 30L1, 30L1, KG, ML, GL-F1, GL-F2, MS-F1, MS-F2, GS-F1, GS-F2 GLS-F1, GLS-F2, 100 pb)

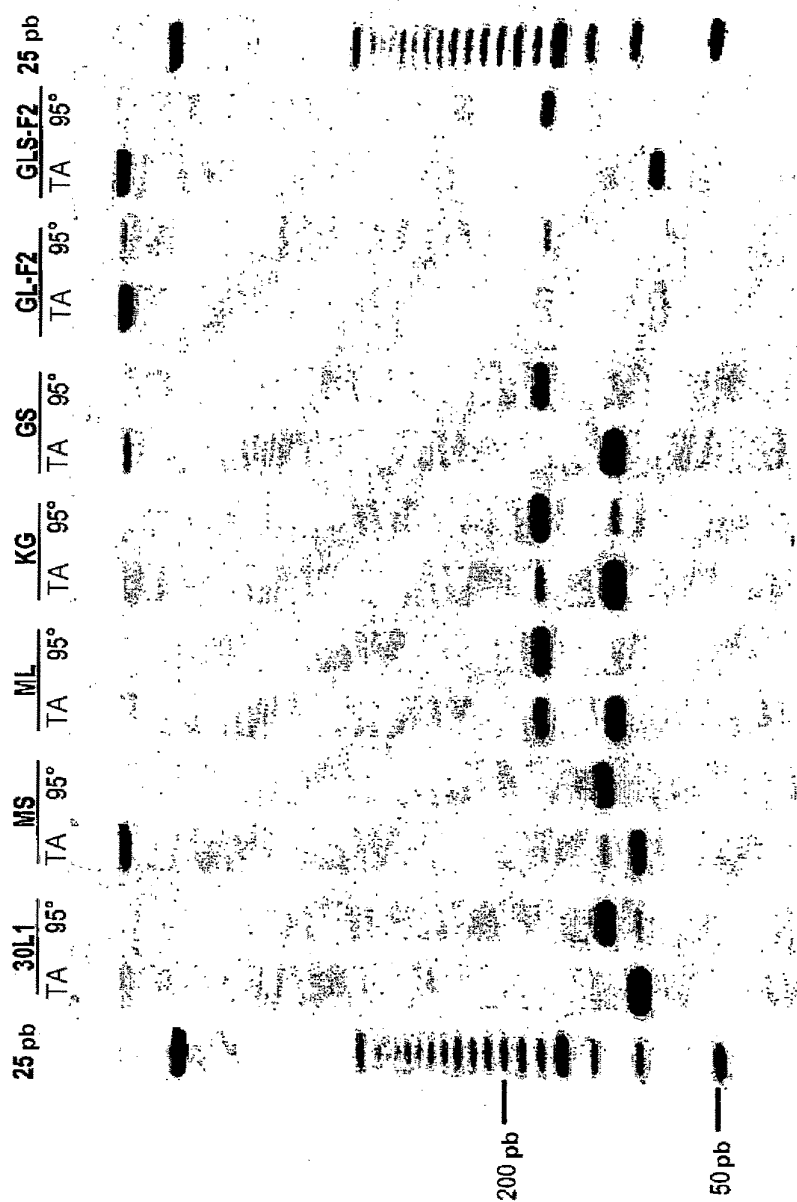


Figura 3.1.6: desnaturalización térmica de diversos dSLIM

Gel PAGE nativo al 8% (C del 2,6%), cantidad de aplicación 0,25 μ g, marcador 25 pb 0,3 μ g (25 pb, no tratado, desnaturalización 95°C 10 min; 30L1, MS, ML, KG, GS, GL-F2, GLS-F2)

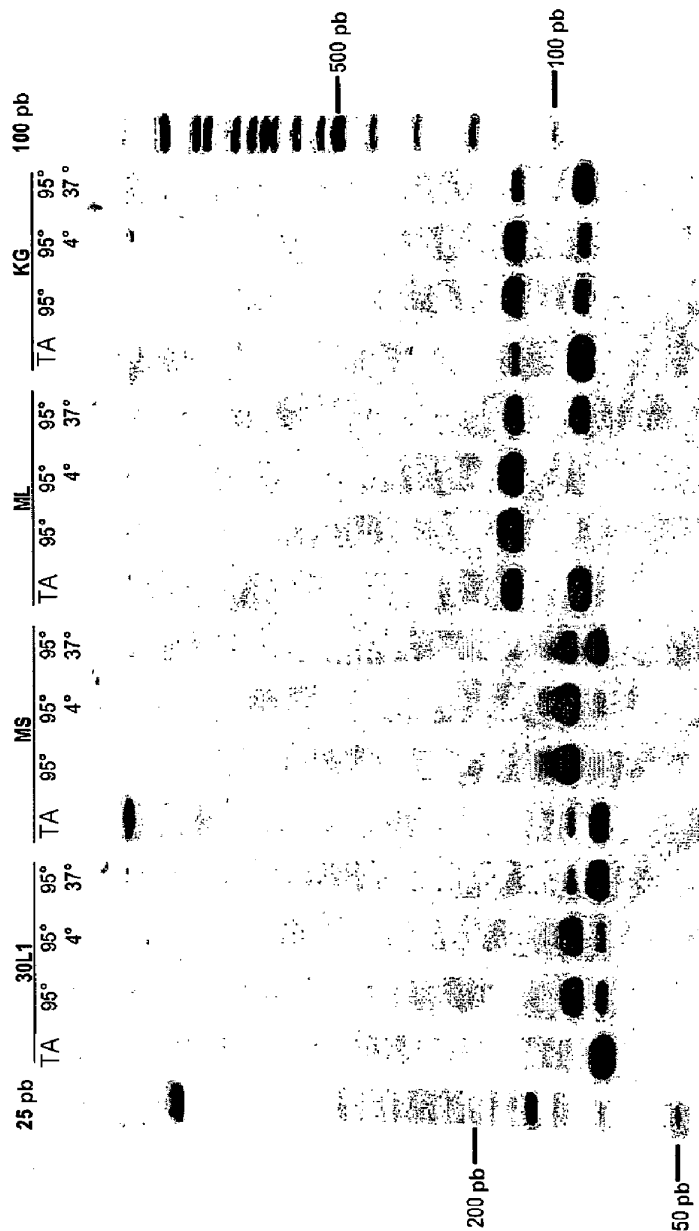


Figura 3.1.7: desnaturalización térmica y renaturalización de diversos dSLIM
 Gel PAGE nativo al 8% (C del 2,6%), cantidad de aplicación 0,25 μ g, marcador 25 pb 0,3 μ g, marcador 100 pb 0,3 μ g (25 pb, no tratado, desnaturalización 95°C 10 min; 3 d 4°C después de la desnaturalización, 3d 37°C después de la desnaturalización: 30L1, MS, ML, KG, 100 pb)

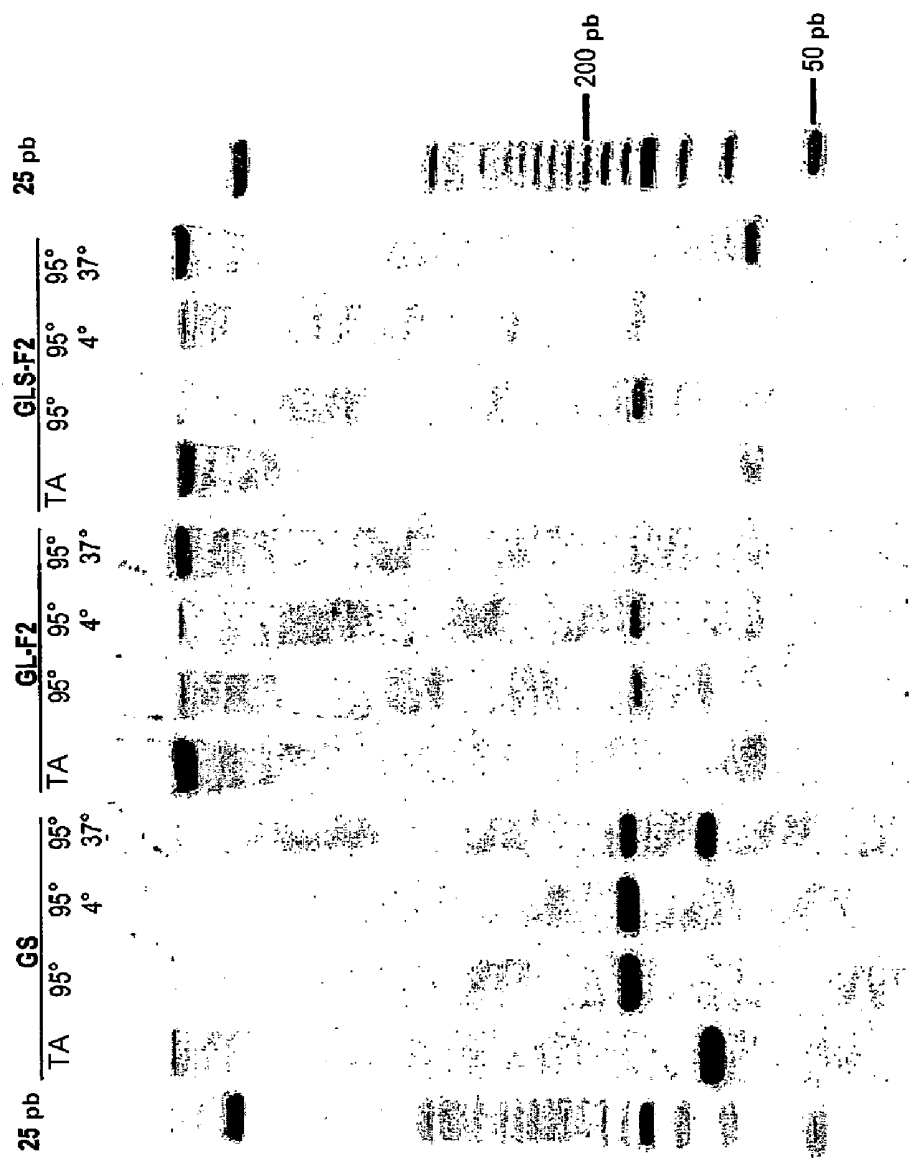


Figura 3.1.8: desnaturalización térmica y renaturalización de diversos dSLIM

Gel PAGE nativo al 8% (C del 2,6%), cantidad de aplicación 0,25 µg, marcador 25 pb 0,3 µg, marcador 100 pb 0,3 µg (25 pb, no tratado, desnaturalización 95°C 10 min; 3 d 4°C después de la desnaturalización, 3d 37°C después de la desnaturalización: GS, GL-F2, GLS-F2, 100 pb)

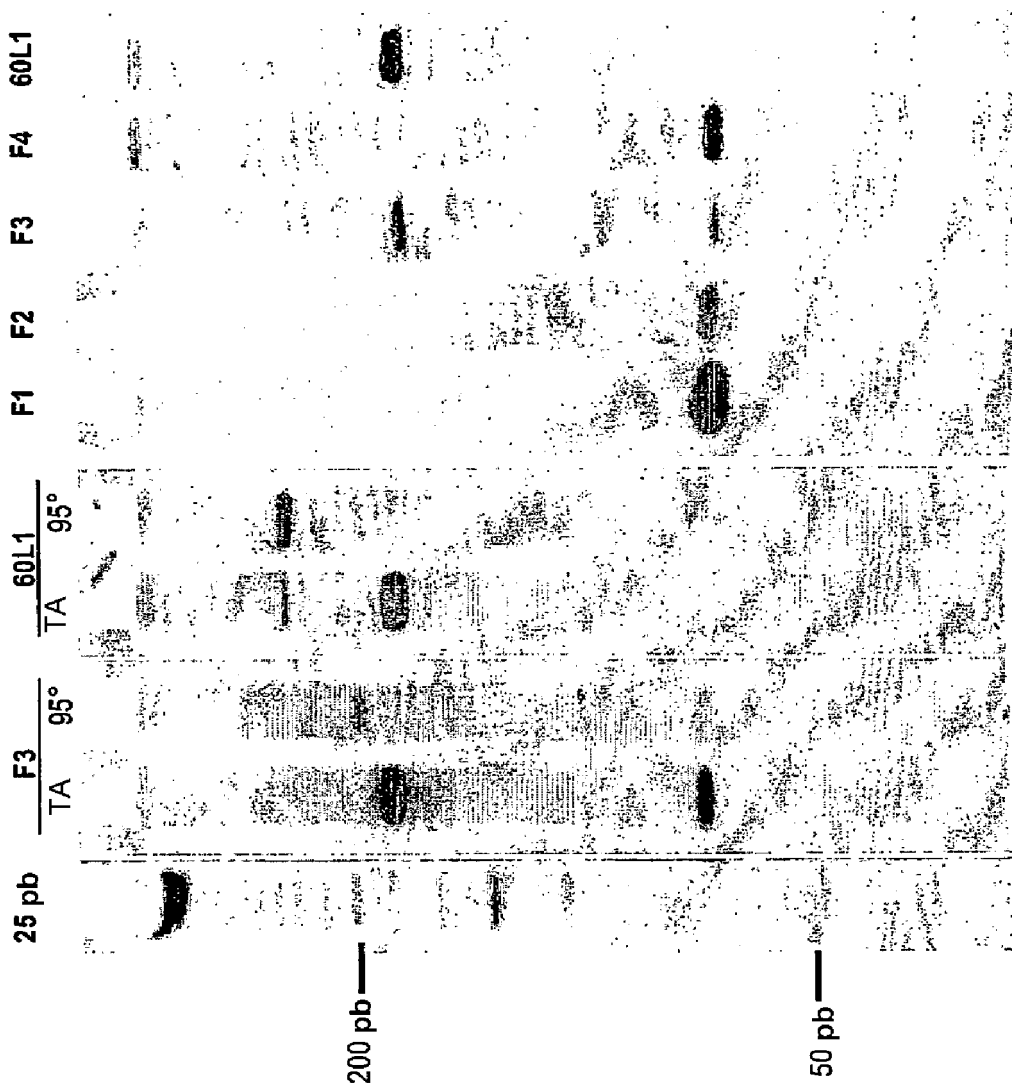


Figura 3.1.9: comparación de la fracción 3 con molécula de modelo dimérica 60L1

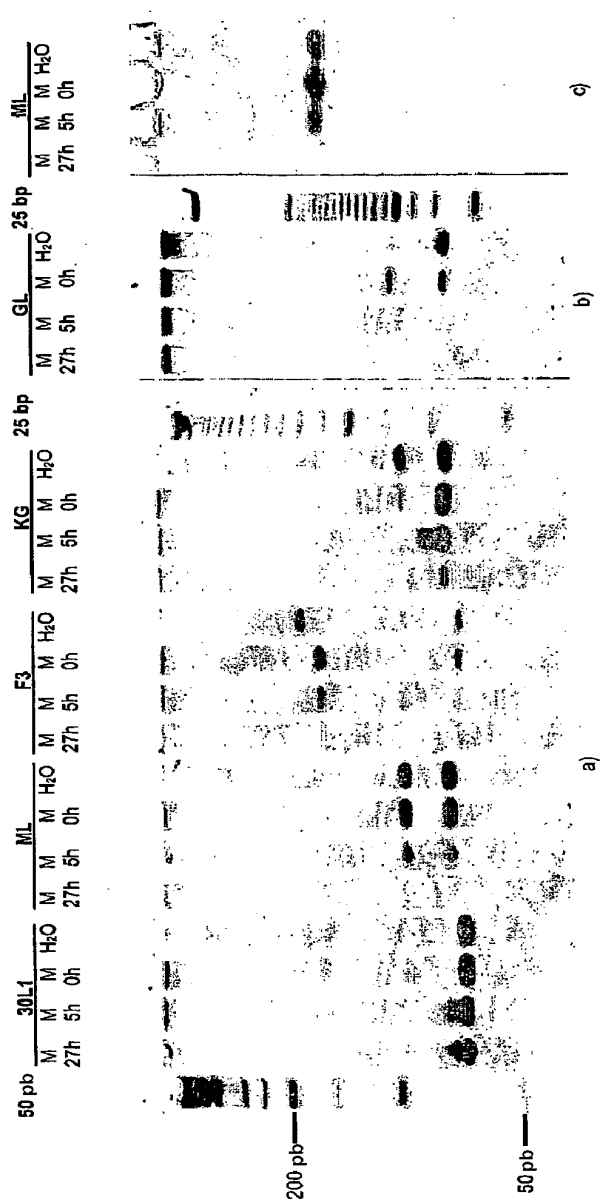


Figura 3.1.10: incubación de dSLIM en medio

- a) Gel PAGE nativo al 8% (C del 5%), cantidad de aplicación 0,25 μg , marcador 25 pb 0,3 μg , marcador 50 pb 0,3 μg (50 pb, 27 h medio, 5 h medio, 0 h medio, H₂O: 30L1, ML, F3, KG 25 pb)
- b) Gel PAGE nativo al 8% (C del 2,6%), cantidad de aplicación 0,25 μg , 25 pb 0,35 μg , (27 h medio, 5 h medio, 0 h medio, H₂O: GL, 25 pb)
- c) Recorte de tinción con Coomassie de PAGE nativo al 8% (C del 5%) de la Figura 3.1.11 a) (27 h medio, 5 h medio, 0 h medio, H₂O: ML)

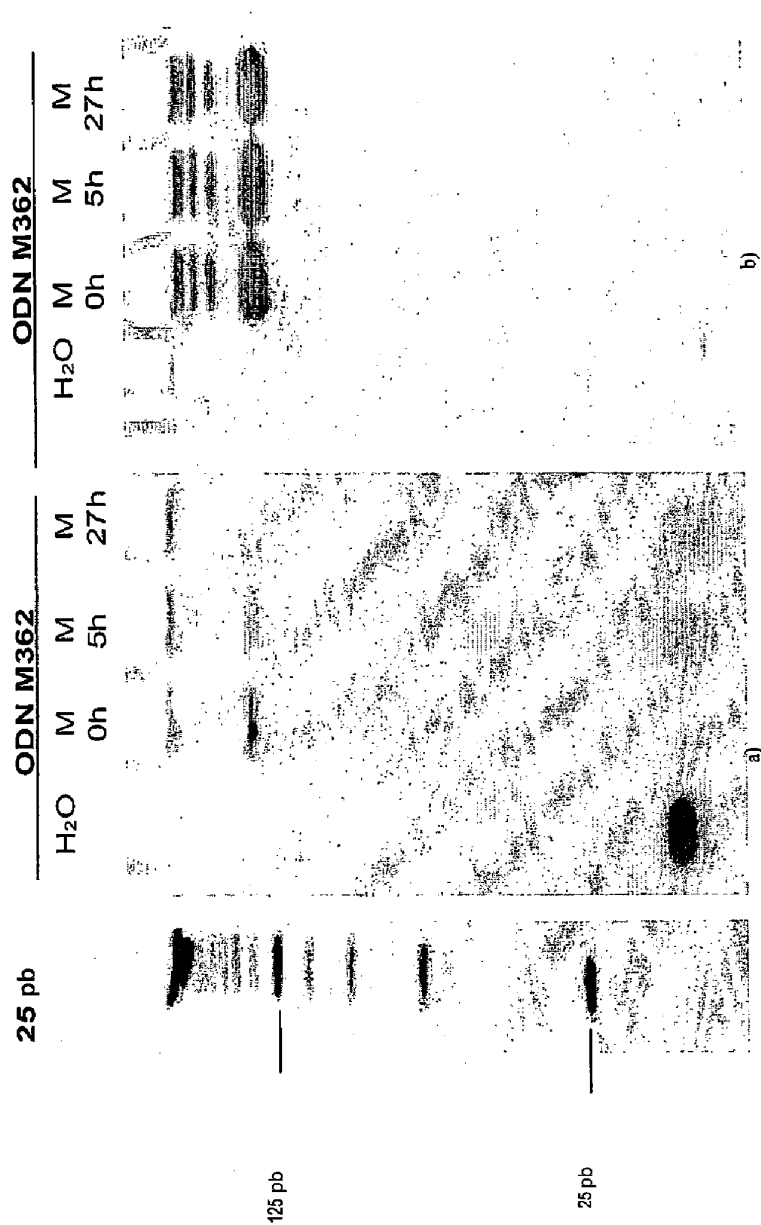


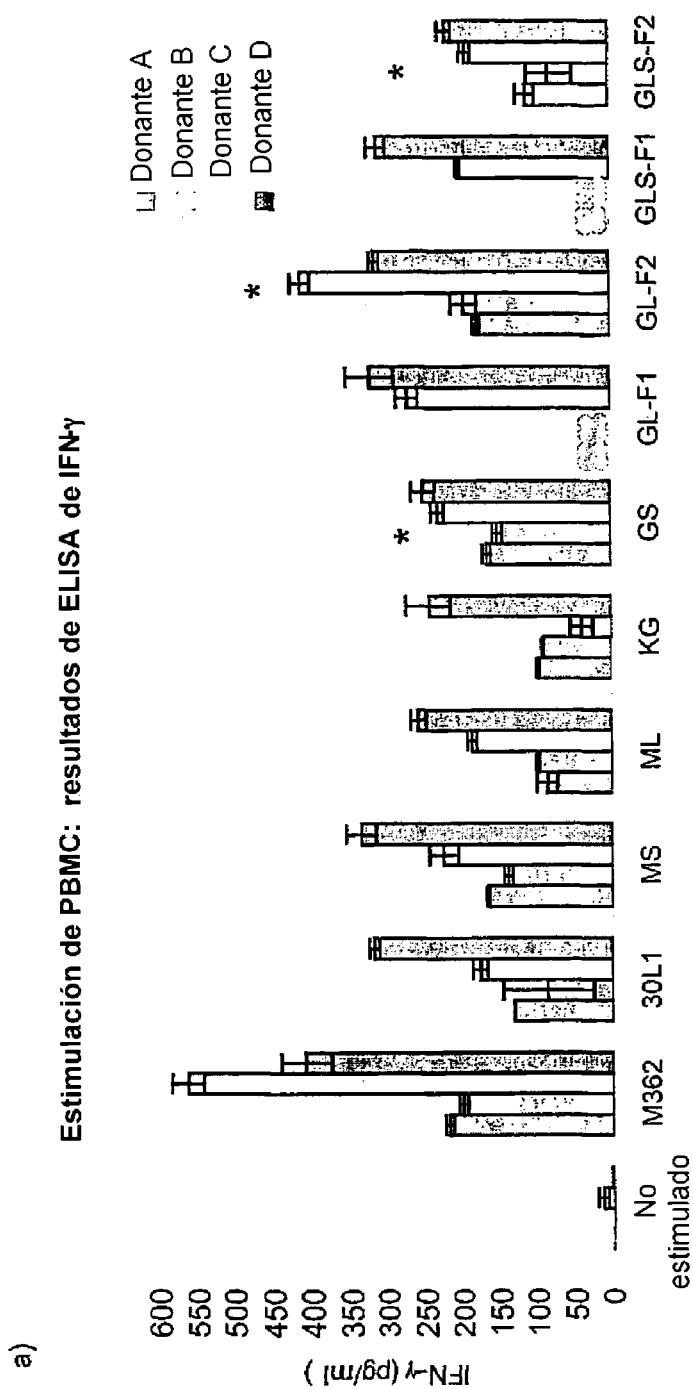
Figura 3.1.11: incubación de ODN M362 en medio

- a) Gel PAGE nativo al 12% (C del 5%), cantidad de aplicación 0,25 μ g, marcador 25 pb 0,3 μ g (25 pb, H₂O, 0 h medio, 5 h medio, 27 h medio)
- b) Corte de tinción con Coomassie de gel PAGE nativo al 12% (C del 5%) de la Figura 3.1.12 a) (H₂O, 0 h medio, 5 h medio, 27 h medio)

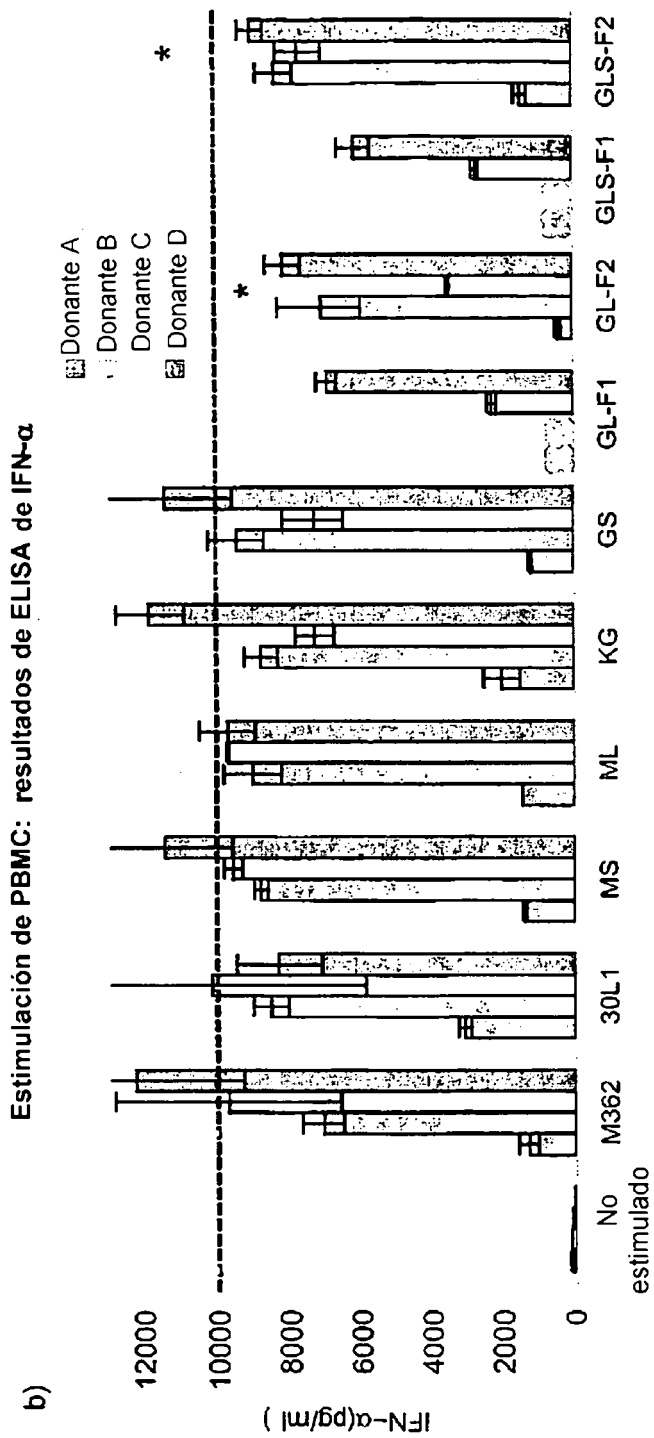


Figura 3.1.12: incubación de dSLIM y ODN M362 en medio con y sin FCS

- a) Gel PAGE nativo al 4-20%, cantidad de aplicación M362 0,05 μg , marcador 25 pb 0,2 μg (25 pb, H₂O, medio sin FCS (M-), medio con FCS (M+), 24 h medio con FCS)
- b) Recorte de tinción con Coomassie de gel PAGE nativo al 4-20% de la Figura 3.1.13 a) (25 pb, H₂O, medio sin FCS (M+), medio con FCS (M+), 24 h medio con FCS)
- c) Gel PAGE nativo al 4-20%, cantidad de aplicación KG 0,12 μg , marcador 25 pb 0,2 μg (25 pb, H₂O, medio sin FCS (M-), medio con FCS (M+), 24 h medio con FCS)
- d) Recorte de tinción con Coomassie de gel PAGE nativo al 4-20% de la Figura 3.1.13 c) (25 pb, H₂O, medio sin FCS (M-), medio con FCS (M+), 24 h medio con FCS)



Endotoxina (UE/mg ADN): 3 <1 6 8 1 1 <1



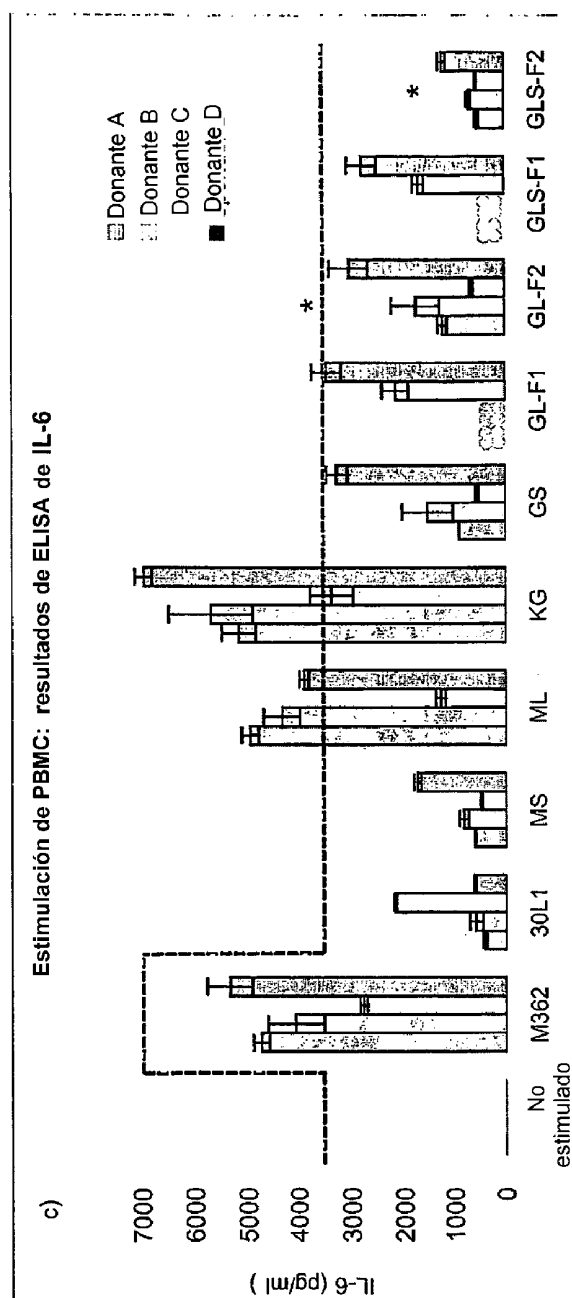
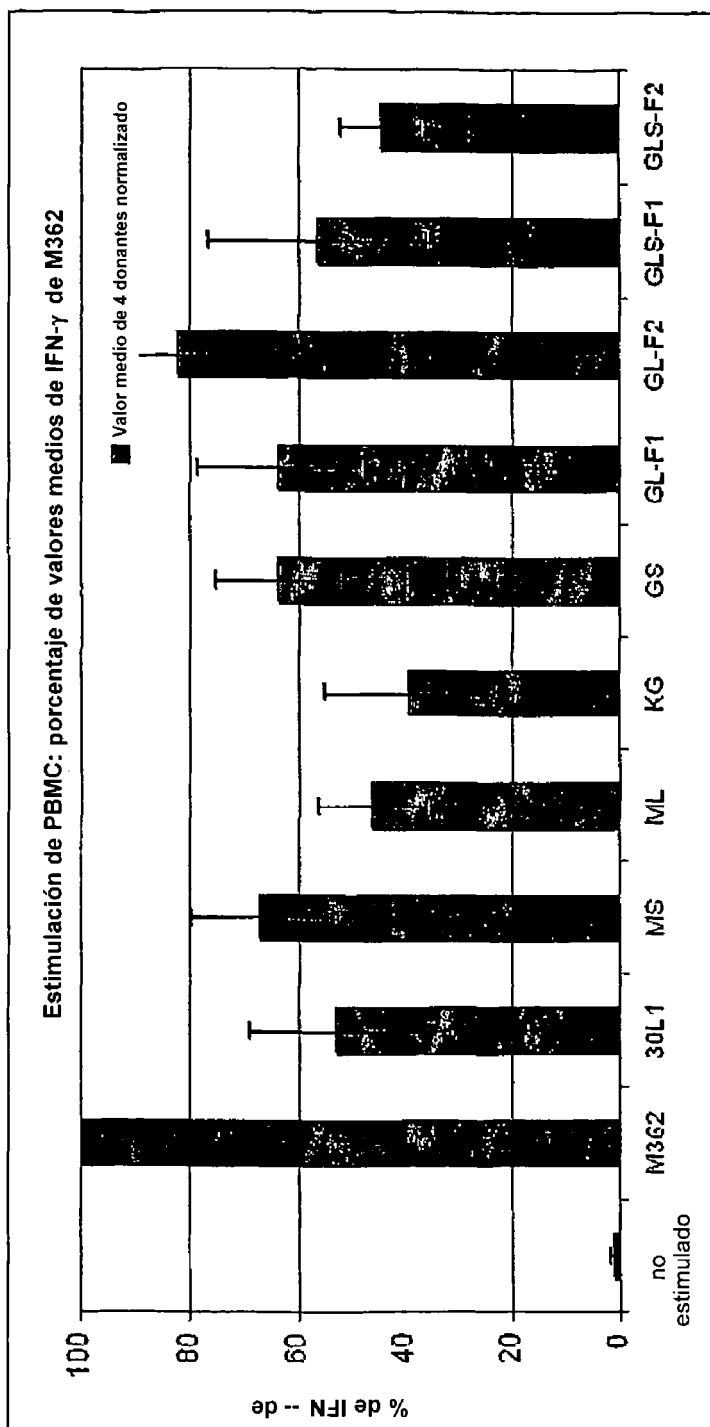
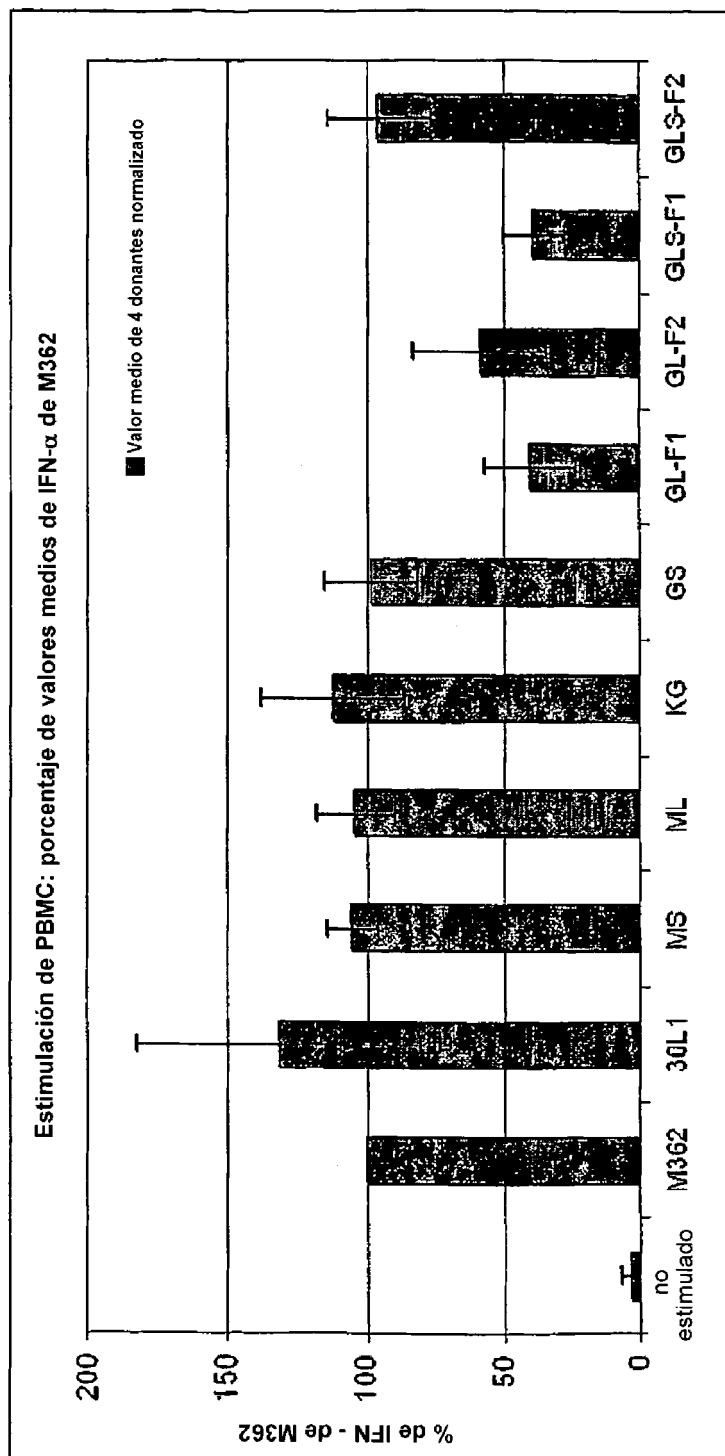


Figura 3.2.1 a-c: resultados de ELISA de IFN-g (a), IFN-a (b), IL-6 (c) de PBMC Sobrenadantes de PBMC ($2,4 \times 10^6$ células por preparación en $600 \mu\text{l}$) de diversos donantes A-D, estimulación durante 48 h con dSLIM/ODN M362, intervalo de medición convencional ---, * determinación doble de cultivo celular, barras de error: $2 \times$ desviación típica de la determinación doble de ELISA (*determinación doble de cultivo celular + determinación doble de ELISA = 4 valores)





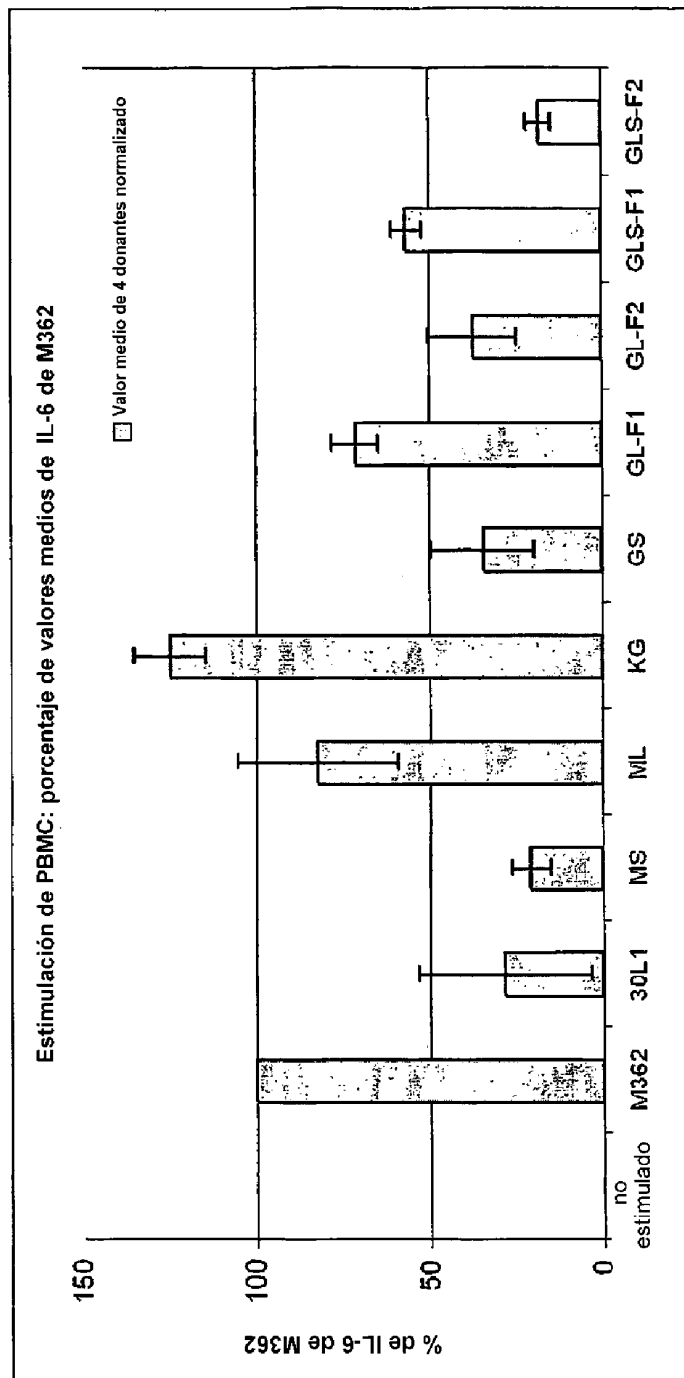
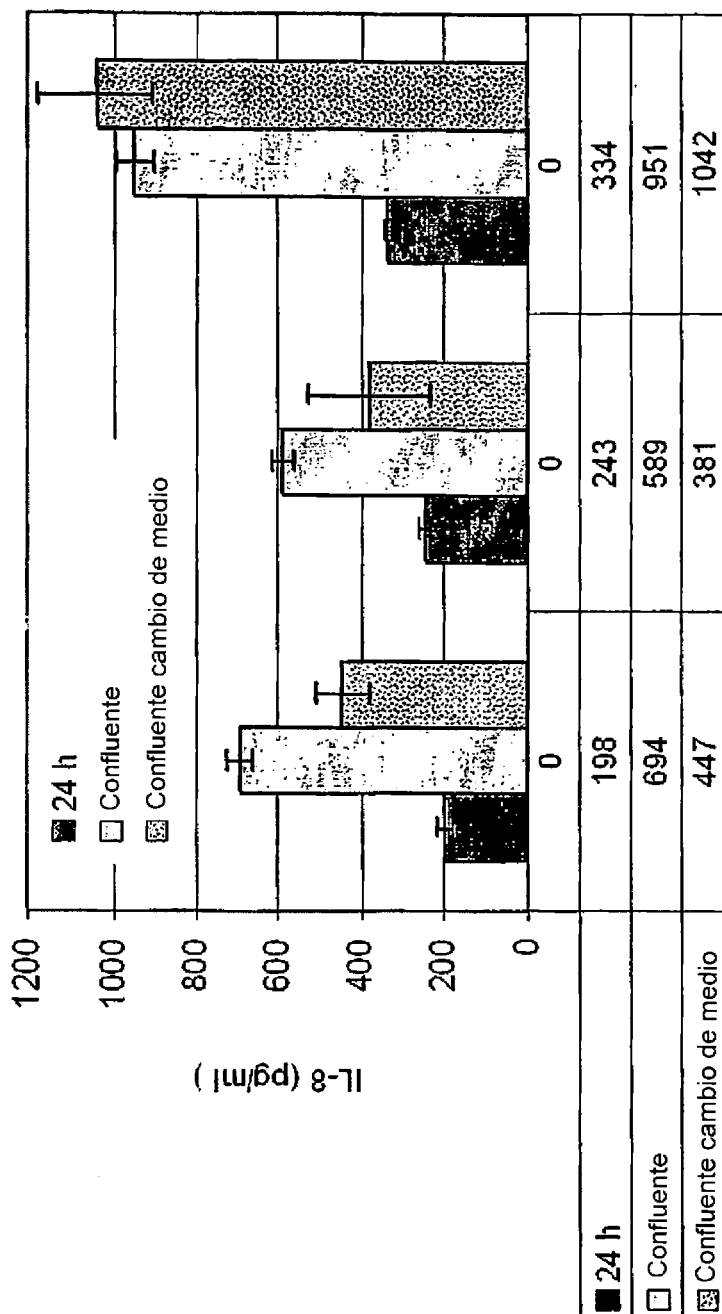


Figura 3.2.2 a-c: valores medios normalizados de los resultados de ELISA de IFN-g (a), IFN-a (b), IL-6 (c) resultados de ELISA véase la Figura 3.2.1 normalizados: cantidad de citocina en % de M362 por donante, valores medios de 4 donantes, barras de error: desviación del valor medio.

Resultados de IL-8 de ELISA de HEK293-TLR9: condiciones de estimulación



a)

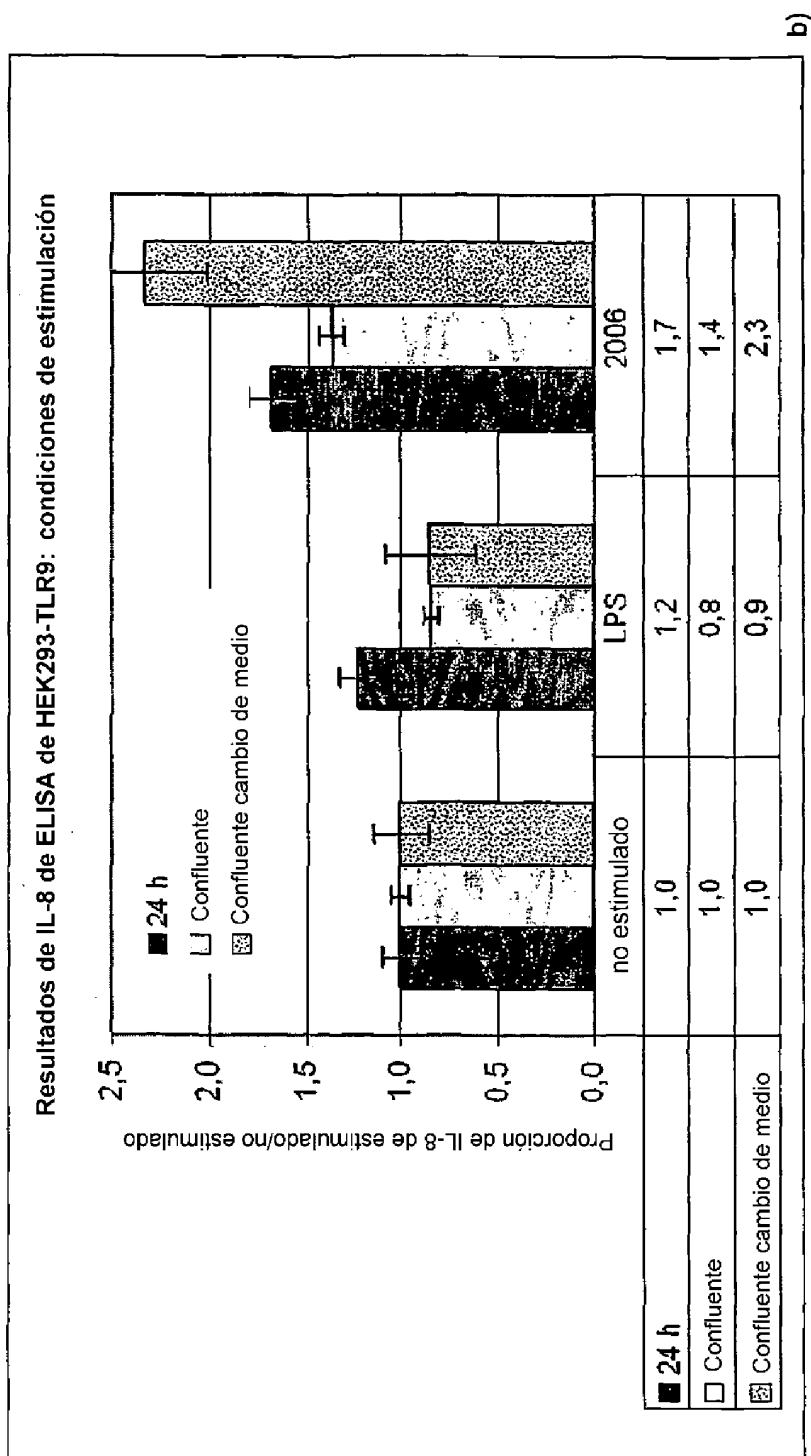
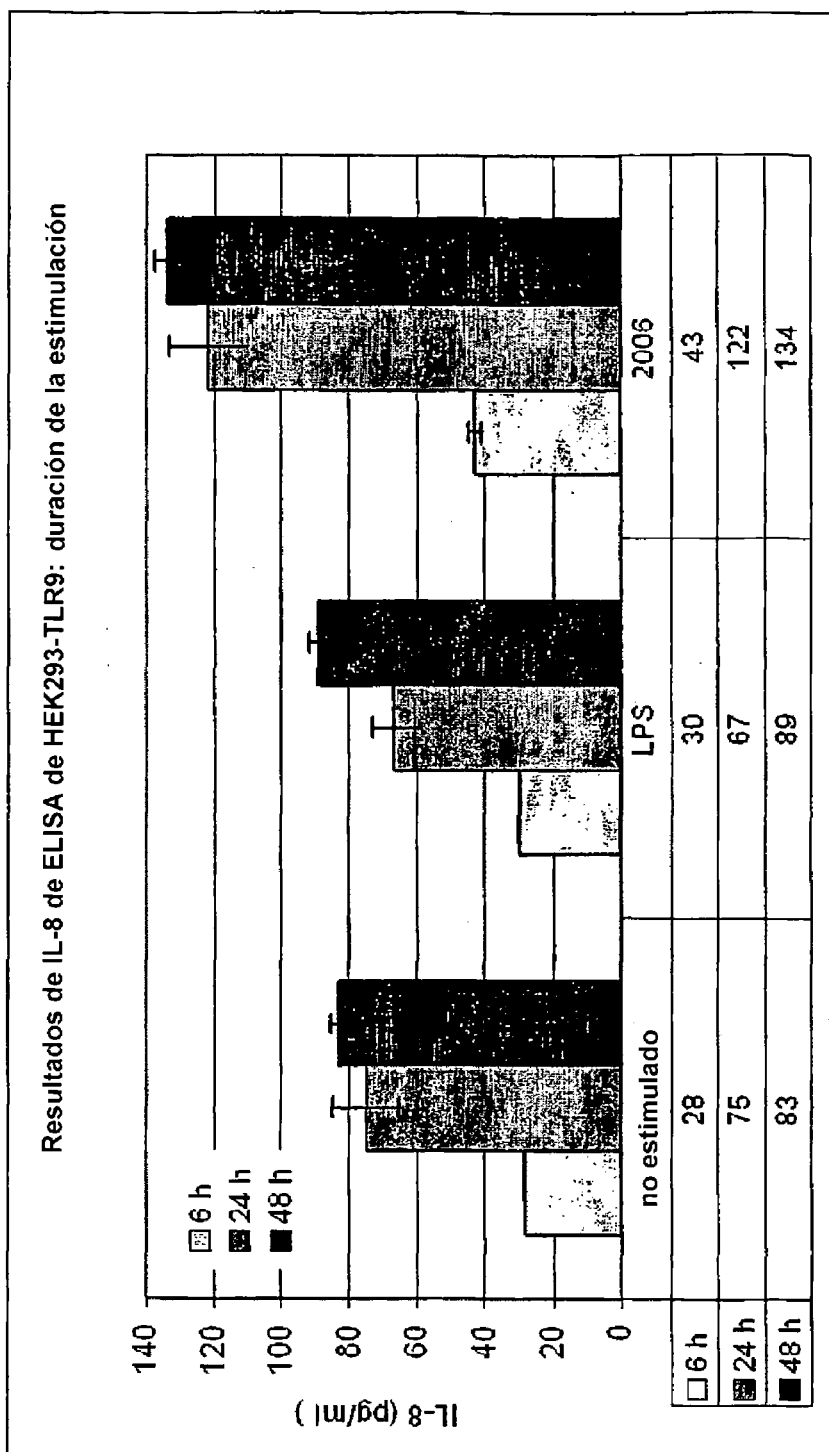


Figura 3.3.1: resultados de ELISA de IL-8 de HEK293-TLR9 condiciones de estimulación



a)

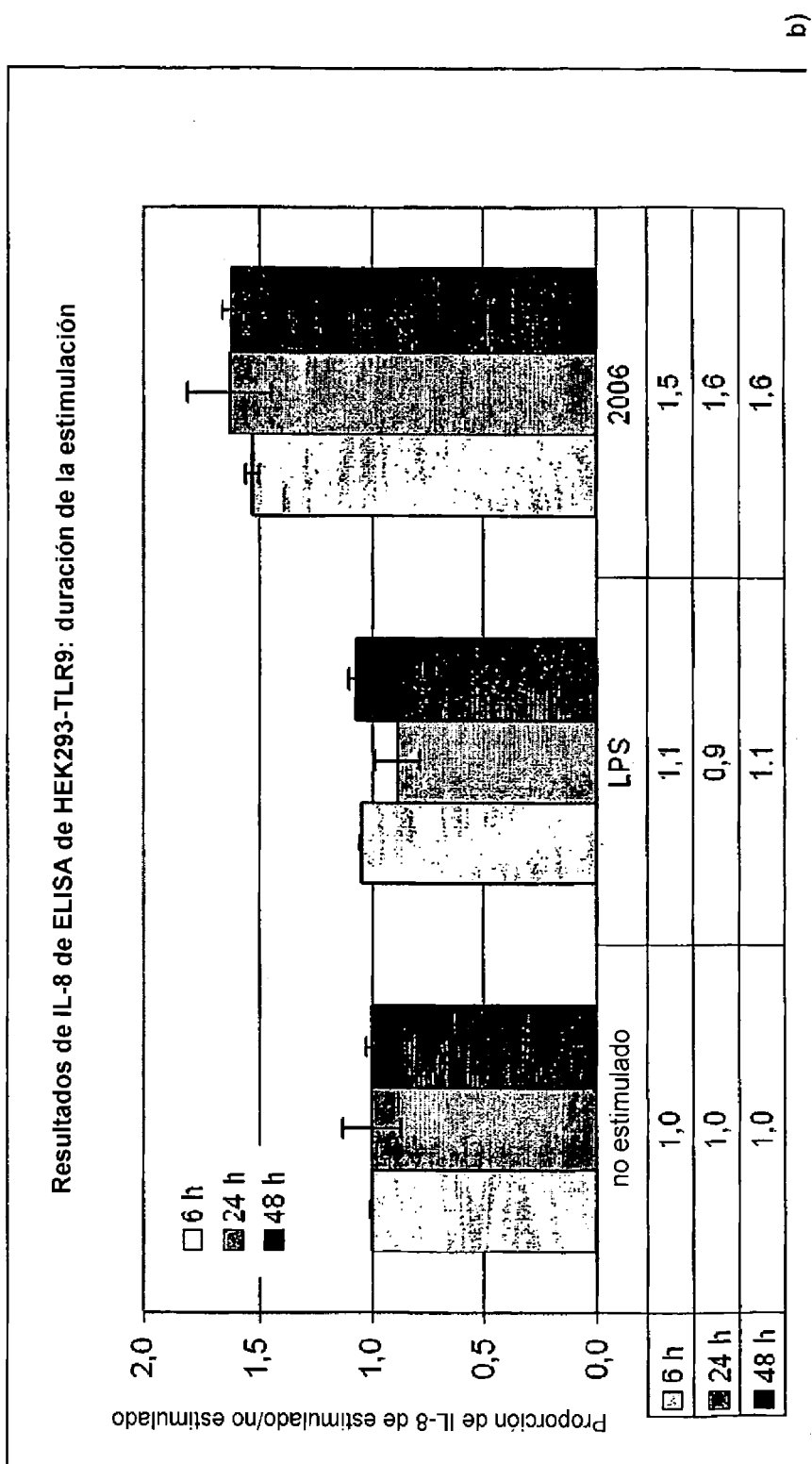
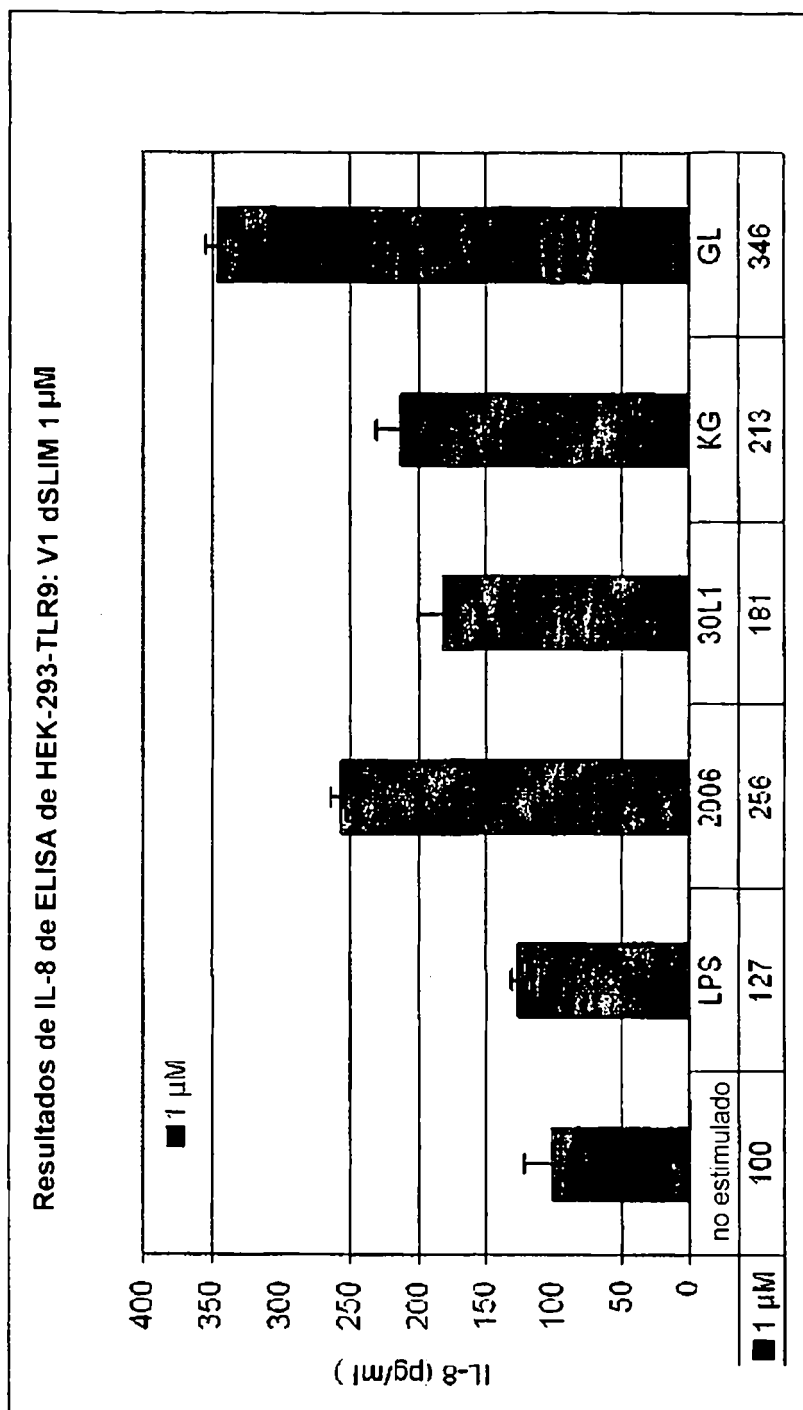
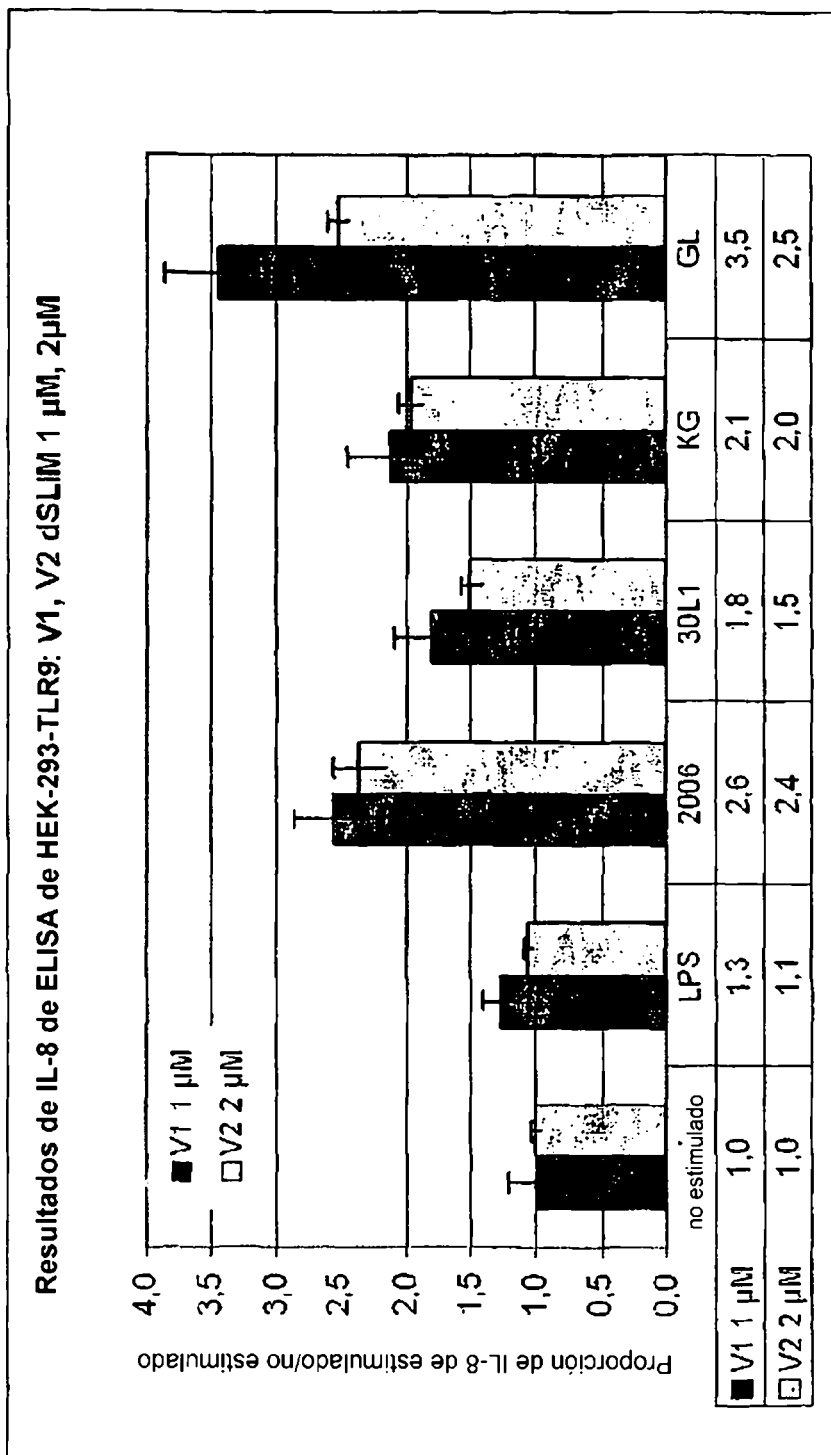


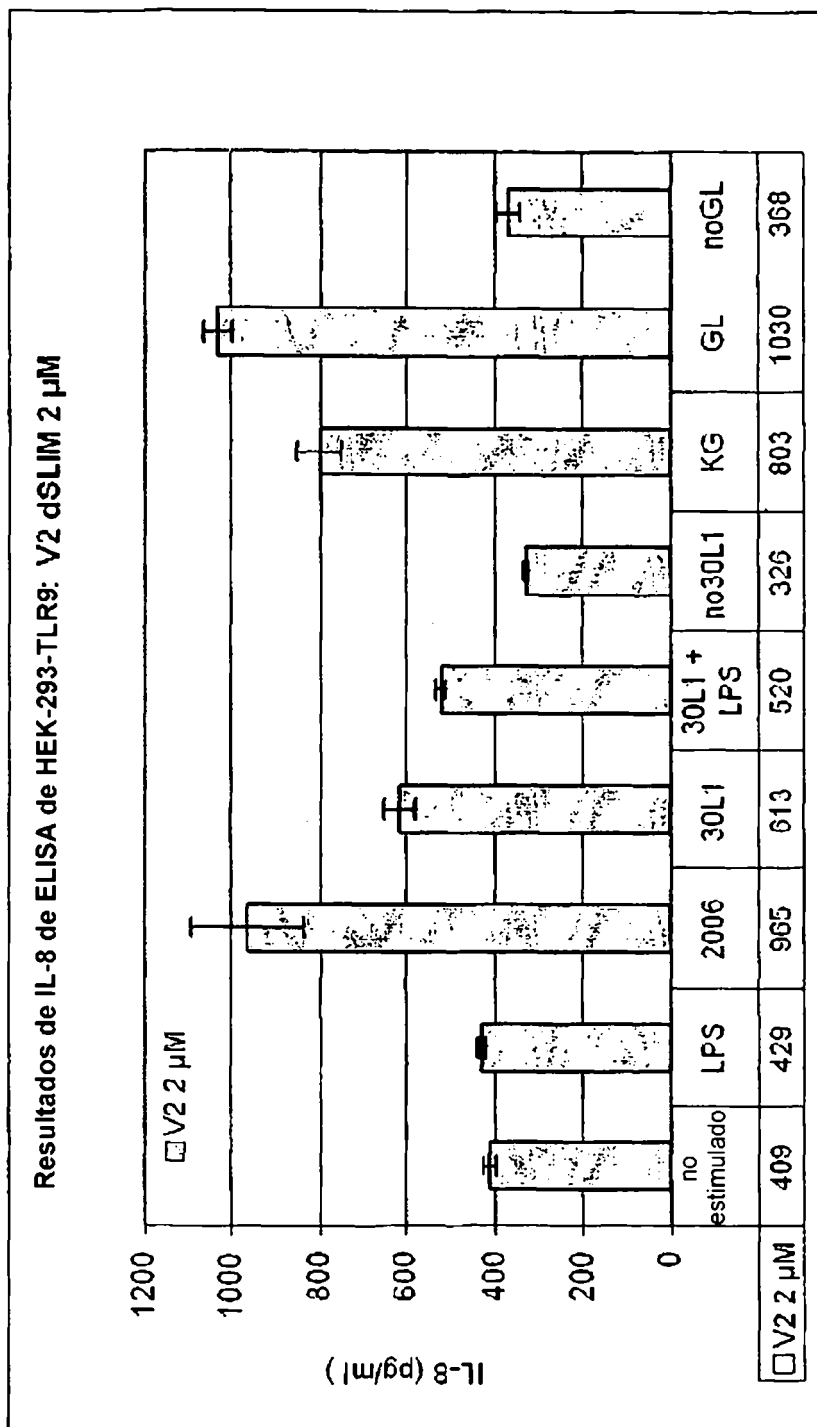
Figura 3.3.2: resultados de ELISA de IL-8 de HEK293-TLR9 duración de la estimulación



a)



b)



c)

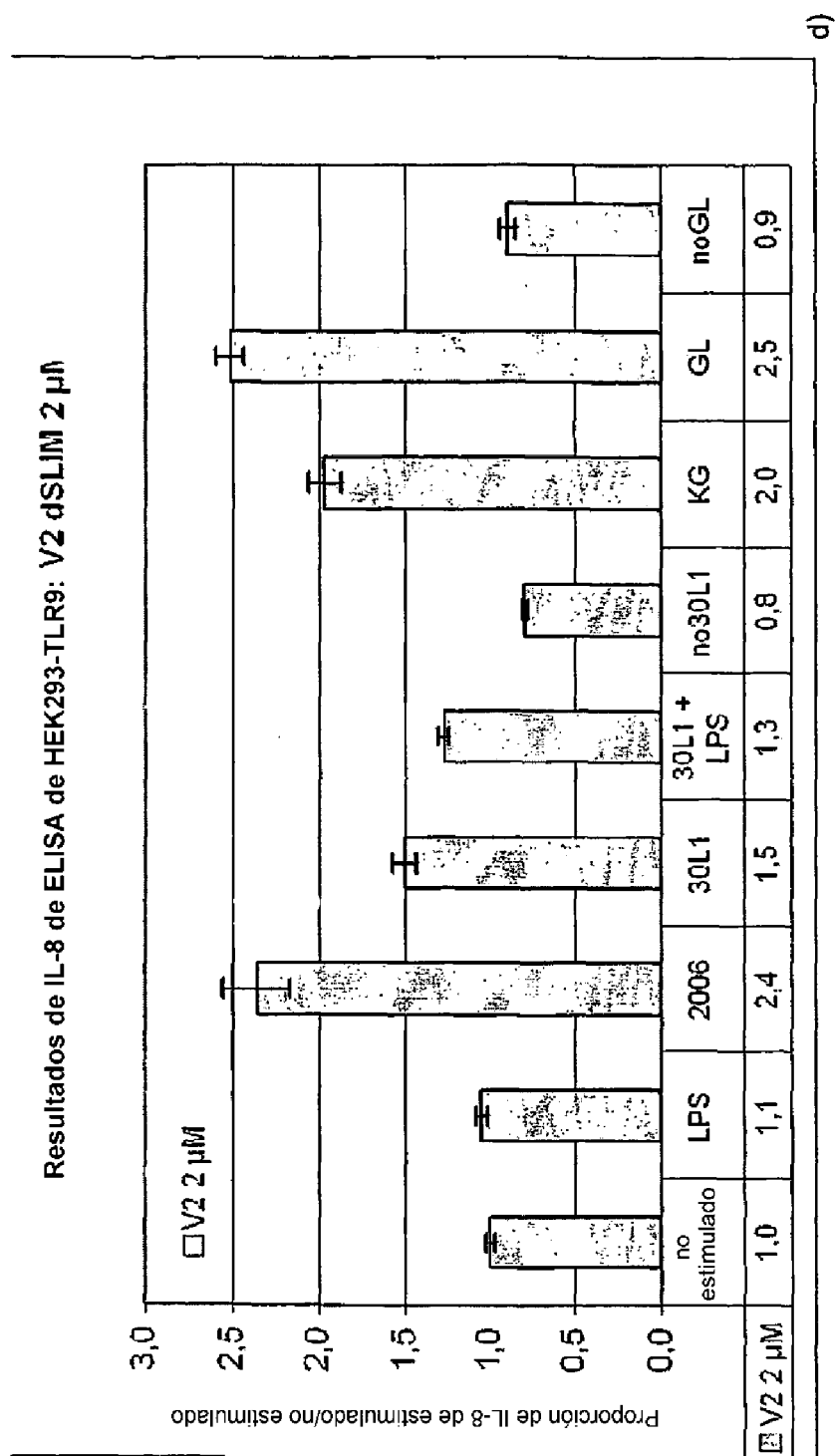
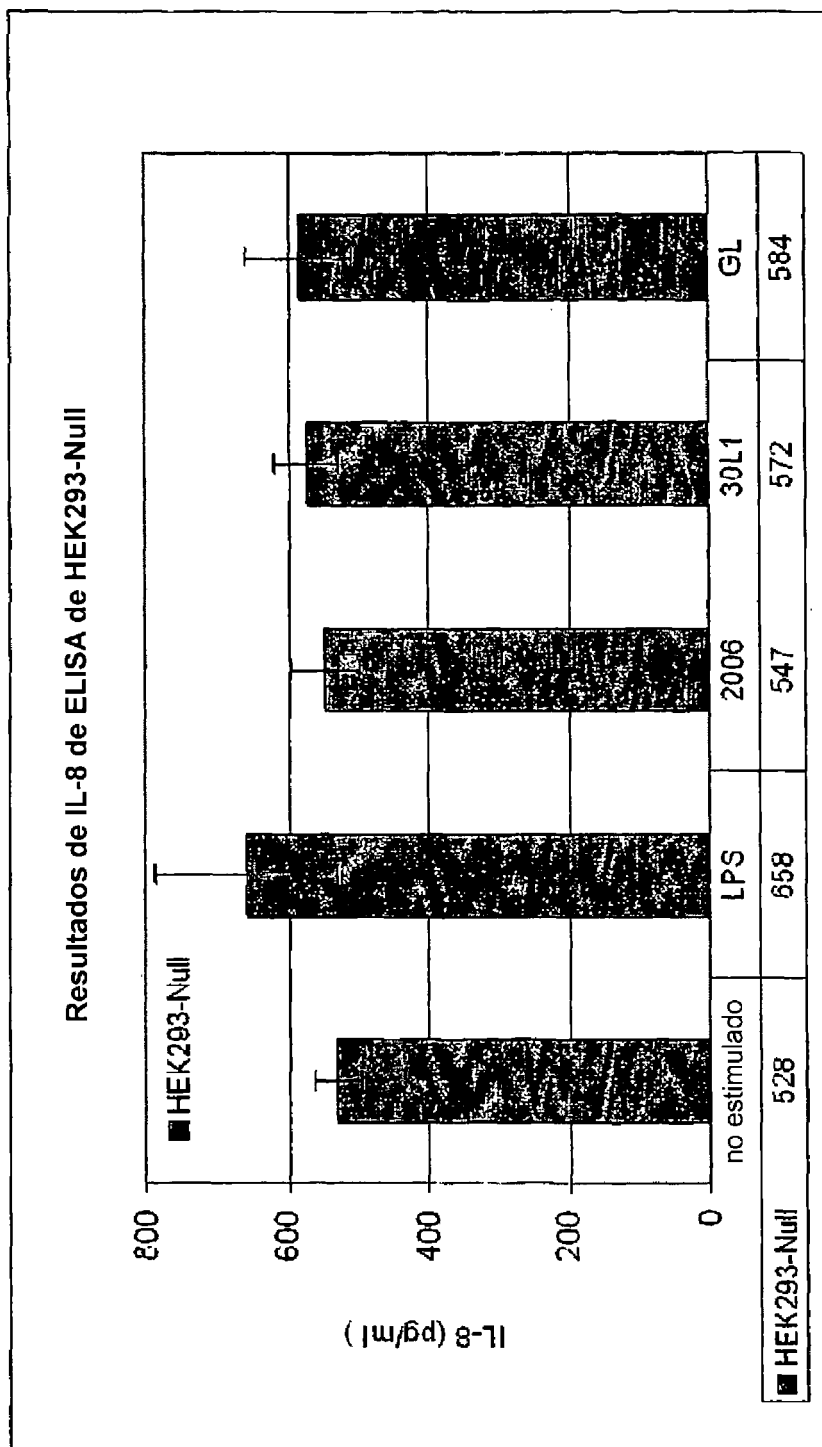


Figura 3.3.3: resultados de ELISA de IL-8 de HEK293-TLR9 diversos dSLIM



a)

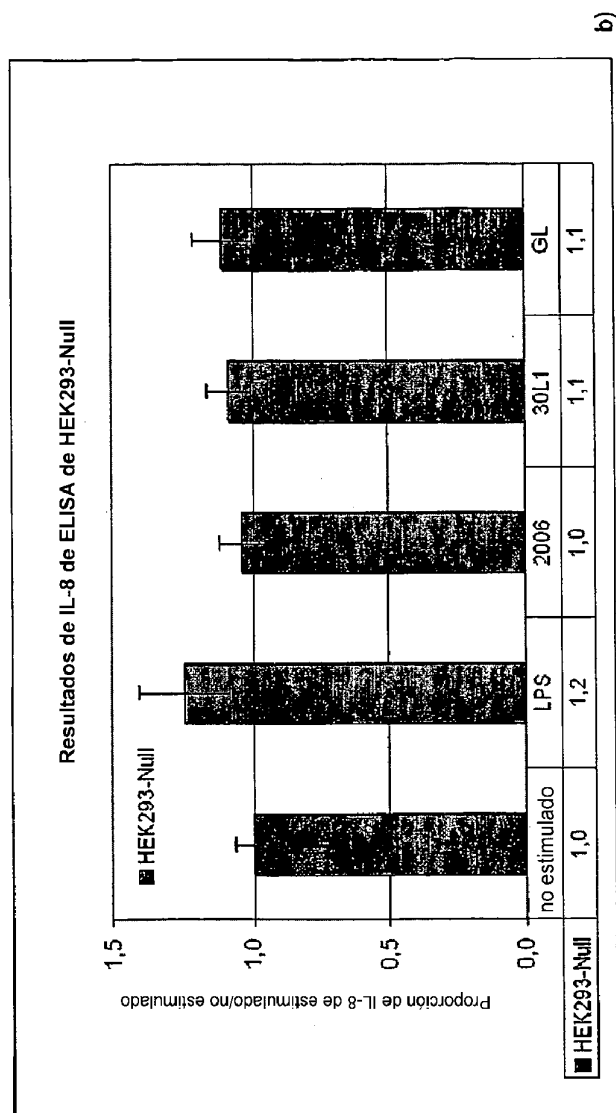


Figura 3.3.4: resultados de ELISA de IL-8 de HEK-293-Null de diversas construcciones de dSLIM

- a) Sobrenadantes de HEK293-Null: 400 μ l/preparación (1 x 10⁶ células/ml); estimulación 24 h con ODN 2006/dSLIM 2 μ M; 0,5 μ g/ml de LPS; estimulación 4 días después de la siembra de las células (cambio de medio después de 48 h y antes de la estimulación); barras de error: 2 x desviación típica de la determinación doble de ELISA.
- b) Proporciones de las cantidades de quimiocinas de las preparaciones estimuladas a no estimuladas de a); barras de error: suma de errores relativos de la determinación doble de ELISA