

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 941**

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012** **PCT/US2012/070186**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13096229**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012** **E 12860171 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 2795326**

54 Título: **Marcaje de glóbulos blancos con oligonucleótidos de fosforotioato**

30 Prioridad:

19.12.2011 US 201161577502 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.10.2017

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US

72 Inventor/es:

MEHRPOUYAN, MAJID y
SHARKEY, MARYBETH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 639 941 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

Marcaje de glóbulos blancos con oligonucleótidos de fosforotioato

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del análisis celular. Los oligonucleótidos de fosforotioato (PS-ODN) son una variante de ADN normal en la que uno de los oxígenos que no forman puentes se reemplaza por un átomo de azufre.

Descripción de la técnica relacionada

10 El marcaje de glóbulos blancos (WBC) o leucocitos usando un compuesto de unión que se une a todos los glóbulos blancos es útil tanto en el análisis de células mediante, por ejemplo, citometría de flujo y microscopía, como en el enriquecimiento o separación de glóbulos blancos de, por ejemplo, sangre entera. Normalmente, se usa un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de la superficie celular que es expresada por todos los WBC, tal como CD45. CD45 (también conocido como antígeno común leucocitario, GP180 o T200) se encuentra en todas las células hematopoyéticas excepto en las de origen de glóbulos rojos.

15 Para el análisis celular, un anticuerpo anti-CD45 se marca con un marcador detectable, p. ej., un colorante fluorescente, para facilitar la detección de las células. Los anticuerpos se mezclan con la muestra que contiene glóbulos blancos, de modo que las células se marquen fluorescentemente a través de la unión del anticuerpo al marcador de la superficie celular. A continuación, las células marcadas se pueden identificar y enumerar usando un instrumento, tal como un citómetro de flujo o un microscopio. Los anticuerpos anti-CD45 marcados con colorante están disponibles comercialmente de, por ejemplo, BD Biosciences (San Jose, CA). Para el enriquecimiento o la separación, el anticuerpo anti-CD45 normalmente se conjuga a una superficie sólida, tal como la superficie de partículas magnéticas. Las partículas magnéticas conjugadas a anticuerpo se mezclan con la muestra que contiene glóbulos blancos, de modo que las células se marquen magnéticamente a través de unión del anticuerpo al marcador de la superficie celular. Las células marcadas magnéticamente se pueden concentrar al poner la muestra en un campo magnético.

25 Normalmente, las células marcadas magnéticamente se lavan para separar las células de la muestra. Las nanopartículas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti-CD45 están disponibles comercialmente, por ejemplo, de BD Biosciences (San Jose, CA). B. Jahrsdorfer, y cols. 2005. J. Immun. Method. 297: 259-263 describen un estudio que demuestra que los oligodesoxinucleótidos de fosforotioato (PS-ODN) suprimen la unión no específica de conjugados de anticuerpos monoclonales basados en Cy5, incluyendo los que contienen PE-Cy5 y Cy5 solo, a monocitos y macrófagos. Esta supresión parece estar mediada por la unión de PS-ODN a CD64, bloqueando de ese modo la unión de Cy5 a su receptor. Concluyen que PS-ODN se puede usar como un reactivo para prevenir la unión no específica de inmunoconjugados basados en Cy5 a monocitos en ensayos de citometría de flujo. E. R. Kandimalla y cols. 2001. Bioorg. Med. Chem. 9: 807-813, describen oligonucleótidos de CpG y sus síntesis. Los oligonucleótidos de CpG se usan como moléculas estimulantes para la activación de ciertas células del sistema inmunitario.

Breve resumen de la invención

Se hace referencia a la invención en las reivindicaciones.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

40 La figura 1 muestra esquemáticamente un método para la modificación y el marcaje de bases de citosina en PS-ODN con FITC.

La figura 2 muestra esquemáticamente una reacción para la modificación y el marcaje del extremo 5' de PSODN con FITC.

45 La figura 3 muestra datos que demuestran la unión de PS-ODN#2 a glóbulos blancos totales. Las subpoblaciones leucocitarias de granulocitos, monocitos y linfocitos se marcan como G, M y L, respectivamente.

La figura 4 muestra datos que demuestran la unión de PS-ODN#5 a glóbulos blancos totales. Las subpoblaciones leucocitarias de granulocitos, monocitos y linfocitos se marcan como G, M y L, respectivamente.

La figura 5 muestra datos procedentes de un análisis de células teñidas con FITC-PS-ODN#2 y CD19-PE-Cy7.

La figura 6 muestra datos procedentes de un análisis de células teñidas con FITC-PS-ODN#5 y CD19-PE-Cy7.

La figura 7 muestra datos que demuestran el enriquecimiento magnético de glóbulos blancos procedentes de una muestra de sangre entera usando partículas PS-ODN-IMag y separación magnética.

5 Descripción detallada de la invención

A fin de que la invención descrita en la presente se pueda entender a fondo, un número de términos se definen explícitamente, posteriormente. Los términos no definidos explícitamente están destinados a tener su significado habitual en los campos de la microscopía, la citometría, la inmunología y la biología, en general.

Los términos glóbulos blancos y leucocitos se usan intercambiabilmente en la presente. Por "sangre entera" se entiende una muestra fluida de sangre que se extrae en presencia de un anticoagulante de un mamífero y posteriormente no se fracciona sustancialmente.

Un "reactivo de marcaje", según se usa en la presente, se refiere a cualquier reactivo que comprenda un resto detectable y sea capaz de unirse a un analito de interés, p. ej., una célula, para obtener un analito marcado. Normalmente, una reacción de detección de la presente invención comprenderá un PS-ODN conjugado a un marcador detectable, tal como un colorante fluorescente. La unión de un PS-ODN unido a colorante a leucocitos da como resultado que los leucocitos se marquen con el colorante.

Un "reactivo de captura", según se usa en la presente, se refiere a cualquier reactivo que sea capaz de unirse a un analito de interés, p. ej., una célula, y que bien se una a, o bien sea capaz de unirse a, una superficie sólida. Normalmente, una reacción de detección de la presente invención comprenderá un PS-ODN conjugado a una superficie sólida. La unión de un PS-ODN unido a colorante a leucocitos da como resultado que los leucocitos se inmovilicen sobre la superficie sólida.

La presente invención implica usar reactivos de marcaje y captura que comprenden oligonucleótidos de fosforotioato (PS-ODN). Los PS-ODN de esta invención se pueden unir a todos los glóbulos blancos (leucocitos) de un modo indiscriminado, y permiten el marcaje, la captura o la concentración de leucocitos de un modo que conserven la integridad antigénica de las células. Las partículas o los colorantes se pueden conjugar directamente al PS-ODN o, preferiblemente, se conjugan al PS-ODN a través de un conector. La presente invención proporciona métodos para capturar, enriquecer o concentrar leucocitos, que comprenden las etapas de poner en contacto un fluido que contiene leucocitos con PS-ODN unido a una superficie sólida bajo condiciones tales que los leucocitos se unan al PS-ODN y de ese modo sean capturados por la superficie sólida. Preferiblemente, los leucocitos capturados en la superficie se separan del fluido para un análisis o uso adicional. Un análisis o uso adicional puede comprender poner en contacto los leucocitos capturados con inmunoconjugados monocíticos. El uso de reactivos de captura unidos superficialmente, en general, para capturar, enriquecer o concentrar células es muy conocido en la técnica. Los reactivos de captura son adecuados para el uso en cualquiera de estos métodos conocidos. La presente invención también implica usar reactivos para el enriquecimiento o la separación magnética de leucocitos. Los reactivos pueden comprender una partícula magnéticamente sensible conjugada a oligonucleótidos de fosforotioato (PS-ODN).

La partícula o el reactivo de captura magnéticamente sensible se puede conjugar directamente al PS-ODN o, preferiblemente, se puede conjugar al PS-ODN a través de un conector. La presente invención proporciona métodos para enriquecer magnéticamente leucocitos, que comprenden las etapas de añadir partículas magnéticas conjugadas a PS-ODN a un fluido que contiene leucocitos bajo condiciones tales que las partículas magnéticas conjugadas a PS-ODN se unan a los leucocitos, y aplicar un campo magnético a leucocitos marcados magnéticamente localizados.

Preferiblemente, los leucocitos magnéticamente marcados o capturados se separan del fluido para un análisis o un uso adicional. En algunas realizaciones, el análisis o uso adicional de las células concentradas o capturadas puede comprender unir las células concentradas o separadas a cualesquiera inmunoconjugados leucocíticos conocidos tales como un granulocito, un monocito o un linfocito (p. ej. anti-CD 19, anti-CD56, anti-CD 19, anti-CD 20, anti-CD 8, anti-CD 4, anti-CD 33, anti-CD 45 etc.). Los métodos de esta invención proporcionan beneficiosamente la concentración o la separación de leucocitos mientras que conservan la especificidad antigénica hacia marcadores de interés.

Oligonucleótidos de fosforotioato (PS-ODN)

Los oligonucleótidos de fosforotioato (PS-ODN) y sus síntesis se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, véanse las Patentes de EE. UU. N° 5.644.048 y 5.571.902, y Jahrsdörfer y cols., 2005, J. Immun. Method. 297: 259-263. Los métodos de síntesis descritos en estas referencias son adecuados para el uso en la generación de los PS-ODN de la presente invención.

Las moléculas de PS-ODN de cualquier longitud pueden ser adecuadas para el uso como reactivos de detección o captura en la presente invención. Preferiblemente, la longitud puede estar entre 15 y 30, más preferiblemente entre 15 y 25, nucleótidos de longitud. Estudios previos sobre diferentes secuencias de PS-ODN (Tabla 1) sugerían que la especificidad de la secuencia no es un factor determinante o requisito previo para la unión a glóbulos blancos, así, cualquier secuencia de PS-ODN de cualquier longitud se puede incorporar en los métodos y los reactivos. Los reactivos de PS-ODN pueden tener uno o más enlaces fosforotioato en combinación con uno o más enlaces fosfato convencionales. En una realización preferida, el PS-ODN comprende una secuencia seleccionada de ODN#1, ODN#2, ODN#3, ODN#4 y ODN#5, mostrados en la Tabla 1, posteriormente. En realizaciones más preferidas, el PS-ODN se selecciona de ODN#1, ODN#2, ODN#3, ODN#4 y ODN#5, mostrados en la Tabla 1, posteriormente. Más preferiblemente, el PS-ODN es bien ODN#2 o bien ODN#5.

Tabla 1

El asterisco (*) indica la unión de fosforotioato entre nucleótidos.

```
ODN#1 T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T
ODN#2 T*G*C*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T
ODN#3 G*G*G*G*G*A*C*G*A*T*C*G*T*C*G*G*G*G*G*G
ODN#4 G*G*G*G*G*A*G*C*A*T*G*C*T*G*G*G*G*G*G*G
ODN#5 T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G
```

Sin limitarse por una teoría, los datos sugieren que los PS-ODN se unen a carbohidratos y proteínas sobre la superficie celular de un modo no específico, y que la presencia de tior en el esqueleto de fosfodiéster del PS-ODN está implicada en la unión no específica a la superficie celular. Comparaciones de diferentes secuencias de PS-ODN (Tabla 1) sugieren que la especificidad de secuencia no es un factor determinante o un requisito previo para la unión a glóbulos blancos. Según se describe en los ejemplos, posteriormente, los PS-ODN marcados con fluoresceína se unen a glóbulos blancos totales, incluyendo linfocitos, monocitos y granulocitos, indiscriminadamente. El uso de PS-ODN marcados en el extremo 5' o en las bases de citosina proporcionaba resultados equivalentes, lo que indica que ni el extremo 5' ni las bases de citosina son críticos para la unión de PS-ODN a la superficie celular de glóbulos blancos.

Reactivos de detección

Los reactivos de detección fluorescentes comprenden PS-ODN conjugado a un marcador detectable, tal como un colorante fluorescente (fluoróforo). Los colorantes fluorescentes (fluoróforos) adecuados para el uso en la presente invención se pueden seleccionar de cualquiera de los muchos colorantes adecuados para el uso en ensayos biológicos, incluyendo citometría de flujo y aplicaciones de obtención de imágenes. Sin embargo, la invención no se limita al uso de colorantes fluorescentes, y se puede usar cualquiera de los reactivos de detección útiles en un método de análisis óptico que se unan al analito de interés y permitan la detección óptica, tales como nanopartículas detectables mediante dispersión Raman mejorada superficialmente (SERS).

Los colorantes fluorescentes son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente de un número de fuentes. Colorantes fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, ficoeritrina ("PE"), isotiocianato de fluoresceína ("FITC"), alofocianina ("APC"), Texas Red ("TR", Molecular Probes, Inc.), complejo de peridina-clorofila ("PerCp"), CY5 (Biological Detection System) y conjugados de los mismos con PE (p. ej., PE/CY5, PE/APC y PE/TR); etc. Un gran número de colorantes está disponible comercialmente de una variedad de fuentes, tales como, por ejemplo, Molecular Probes (Eugene, OR) y Exciton (Dayton, OH). Los reactivos de detección se pueden conjugar a PS-ODN usando cualquiera de un número de métodos muy conocidos para conjugar marcadores a oligonucleótidos. Dos reacciones de conjugación preferidas se muestran en las figuras 1 y 2.

Reactivos de captura

Los reactivos de captura comprenden un oligonucleótido de fosforotioato (PSODN) conjugado a una superficie sólida, o capaz de ser unido a una superficie sólida. Se puede usar una amplia gama de superficies sólidas en la presente invención, incluyendo, por ejemplo, cuentas, placas, portaobjetos, columnas, canales microfluídicos, etc. La superficie sólida se puede conjugar directamente al PS-ODN o, preferiblemente, se conjuga al PS-ODN a través de un conector. Son muy conocidos en la técnica métodos para conjugar ácidos nucleicos a una superficie sólida. Alternativamente, el PS-ODN se puede unir a un miembro de un par de unión, y la superficie sólida unirse al otro miembro del par de unión, de modo que la unión del PS-ODN a la superficie sólida se pueda llevar a cabo después de la unión del PS-ODN a la célula. Ejemplos de pares de unión que son adecuados para unir el PS-ODN a la

superficie sólida son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, un anticuerpo y sus pares de antígeno elegidos como diana, y estreptavidina y biotina.

Reactivo de captura magnético

Los reactivos de captura magnéticos son partículas magnéticas unidas a PSODN. Según se usa en la presente, "partículas magnéticas" se refiere a cualquier partícula que contenga un material magnético o magnéticamente sensible. Las partículas magnéticas pueden ser de cualquier conformación, pero normalmente son aproximadamente esféricas ("microesferas"). Las partículas magnéticas adecuadas para el uso en la presente invención tienen preferiblemente un diámetro en el intervalo de nanómetros a micrómetros, normalmente aproximadamente de 0,01 a 50 μm de diámetro, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 10 μm , más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a 0,4 μm . Preferiblemente, las partículas magnéticas son paramagnéticas o superparamagnéticas. Las partículas magnéticas adecuadas para el uso en la presente invención están disponibles comercialmente de un número de fuentes, incluyendo, pero no limitadas a, BD Biosciences (San Jose, CA), Invitrogen (Carlsbad, CA), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania) y Polysciences (Warrington, PA). En general, las partículas magnéticas vendidas para el uso en ensayos de separación celular son adecuadas para el uso en la presente invención. La conjugación de las partículas magnéticas a PS-ODN se puede llevar a cabo usando cualquiera de un número de métodos muy conocidos para conjugar oligonucleótidos a partículas magnéticas. Las partículas magnéticas están disponibles comercialmente con grupos superficiales reactivos adecuados para el uso en la conjugación a oligonucleótidos. Alternativamente, como con otras superficie sólidas, el PS-ODN se puede unir a un miembro de un par de unión, y la partícula magnética se puede unir al otro miembro del par de unión, de modo que la unión del PS-ODN a la partícula magnética se pueda llevar a cabo después de la unión del PS-ODN a la célula.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se indican a fin de proporcionar a los expertos normales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo elaborar y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni están destinados a representar que los experimentos posteriores sean todos o cada uno de los experimentos realizados.

Ejemplo 1

Unión de PS-ODN#2 a glóbulos blancos totales.

Se sintetizaron PS-ODN#2 marcados con FITC, conjugados a residuos de citosina, como se muestra en la figura 1. Se incubaron muestras de sangre de 50 μl con 5 μg bien de PS-ODN#5 no marcado o bien de FITC-PS-ODN#2 durante 30 minutos, seguido por tratamiento con solución de lisis BD FACS™. Las células se centrifugaron, se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo. Los datos se muestran en la figura 3.

Los resultados muestran que los PS-ODN#2 marcados con FITC se unen a las tres poblaciones de glóbulos blancos (linfocitos, monocitos y granulocitos), es decir, todos los glóbulos blancos. Los resultados muestran además que los PS-ODN se pueden marcar con FITC en el extremo 5' o en las bases de citosina (figura 1 y 2). Estas modificaciones (marcaje con FITC) bien en el extremo 5' o bien en las bases de citosina no suprimen la capacidad de los PS-ODN para unirse a la superficie celular (mostrado en la figura 3 y 4) donde los PS-ODN marcados se unen a las tres poblaciones de glóbulos blancos.

Ejemplo 2

Unión de PS-ODN#5 a glóbulos blancos totales.

Se sintetizaron PS-ODN#5 marcados con FITC en el extremo 5', como se muestra en la figura 2. Se incubaron muestras de sangre de 50 μl con 5 μg bien de PS-ODN#5 no marcado o bien de FITC-PS-ODN#5 durante 30 minutos, seguido por tratamiento con solución de lisis BD FACS™. Las células se centrifugaron, se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo. Los datos se muestran en la figura 4. Los resultados muestran que los PS-ODN#5 marcados con FITC se unen a las tres poblaciones de glóbulos blancos (linfocitos, monocitos y granulocitos), es decir, todos los glóbulos blancos. Los resultados muestran además que los PS-ODN se pueden marcar con FITC en el extremo 5' o en las bases de citosina (figura 1 y 2). Estas modificaciones (marcaje con FITC) bien en el extremo 5' o bien en las bases de citosina no suprimen la capacidad de los PS-ODN para unirse a la superficie celular (mostrado en la figura 3 y 4) donde los PS-ODN marcados se unen a las tres poblaciones de glóbulos blancos.

Ejemplo 3

Tinción de células con FITC-PS-ODN#2 y CD19-PE-Cy7.

5 Una muestra de sangre de 50 µl se incubó con 5 µg de FITC-PS-ODN#2 y 150 ng de anti-CD19-PECy7 durante 30 minutos, seguido por tratamiento con solución de lisis BD FACS™. Las células se centrifugaron, se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo. Los datos se muestran en la figura 5. Los datos indican que el PS-ODN marcado se une a todos los glóbulos blancos. Por otra parte, la unión del PS-ODN marcado no enmascara al antígeno específico sobre la superficie celular, según se muestra por la tinción de las células usando un anticuerpo específico para CD 19 marcado. Así, la unión de PS-ODN a la superficie celular proporciona un método para teñir células que mantiene la integridad antigénica de las células.

10 Ejemplo 4

Tinción de células con FITC-PS-ODN#5 y CD19-PE-Cy7.

15 Una muestra de sangre de 50 µl se incubó con 5 µg de FITC-PS-ODN#5 y 150 ng de anti-CD19-PE5Cy7 durante 30 minutos, seguido por tratamiento con solución de lisis BD FACS™. Las células se centrifugaron, se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo. Los datos se muestran en la figura 6. Los datos indican que el PS-ODN marcado se une a todos los glóbulos blancos. Por otra parte, la unión del PS-ODN marcado no enmascara al antígeno específico sobre la superficie celular, según se muestra por la tinción de las células usando un anticuerpo específico para CD 19 marcado.

Ejemplo 5

Separación magnética de glóbulos blancos totales con PS-ODN-IMag.

20 Se conjugaron partículas magnéticas (partículas magnéticas BD IMag, BD Biosciences, San Jose, CA) a PS-ODN#5. Una muestra de 50 µl de sangre entera se incubó con 32 µg de Fe de partículas magnéticas conjugadas a PS-ODN#5 durante 30 minutos, seguido por tratamiento con solución de lisis BD FACS™. Las células se separaron magnéticamente usando un imán de separación de células BD IMagnet™ (BD Biosciences, San Jose, CA), se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo. Como un control, una muestra de células no tratadas se analizó
25 mediante un citómetro de flujo. Los datos se presentan en la figura 7.

Los resultados muestran que pueden usarse partículas magnéticas conjugadas a PS-ODN para enriquecer o separar glóbulos blancos mediante cualquier método de separación (p. ej., separación magnética). Una ventaja de los presentes métodos es que los marcadores de la superficie celular se dejan intactos para el marcaje y el análisis
30 de anticuerpos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para marcar indiscriminadamente leucocitos en una muestra fluida de sangre entera, que comprende la etapa de añadir un oligonucleótido de fosforotioato conjugado a dicha muestra bajo condiciones tales que el oligonucleótido de fosforotioato conjugado se una a los leucocitos.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además añadir un inmunoconjugado a la muestra bajo condiciones tales que el inmunoconjugado se una a los leucocitos.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el oligonucleótido de fosforotioato conjugado se conjuga a un colorante fluorescente, o en el que el oligonucleótido de fosforotioato conjugado se conjuga a un reactivo de captura, preferiblemente en donde el reactivo de captura es magnético.
4. El método según la reivindicación 3, que comprende además colocar la muestra en un campo magnético de modo que los leucocitos unidos a los reactivos de captura magnéticos se concentren.
5. El método según la reivindicación 4, que comprende además añadir un inmunoconjugado a los leucocitos concentrados bajo condiciones tales que el inmunoconjugado se una a los leucocitos, preferiblemente en donde el inmunoconjugado es un anticuerpo anti-CD19.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido de fosforotioato tiene entre 15 y 25 nucleótidos de longitud.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el oligonucleótido de fosforotioato (PS-ODN) comprende una secuencia seleccionada de los PS-ODN que consisten en ODN#1, ODN#2, ODN#3, ODN#4, y ODN#5, mostrados en la Tabla 1.
8. Una muestra de sangre entera que contiene leucocitos marcados indiscriminadamente obtenibles según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

Figura 1

Marcaje de bases de citosina en PS-ODN con FITC

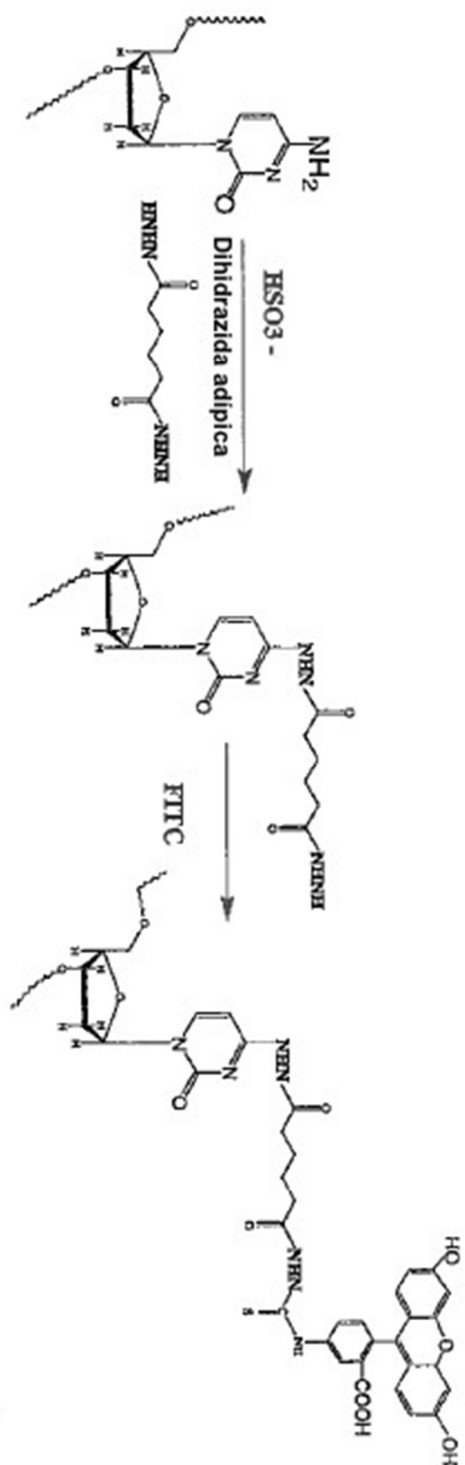


Figura 2

Marcaje del extremo 5' de PS-OND con FITC

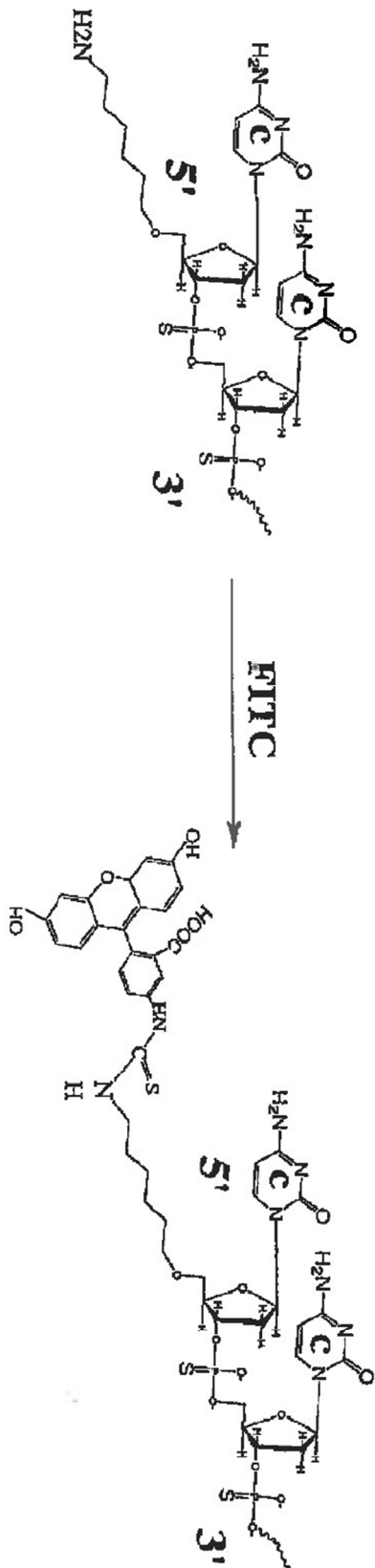
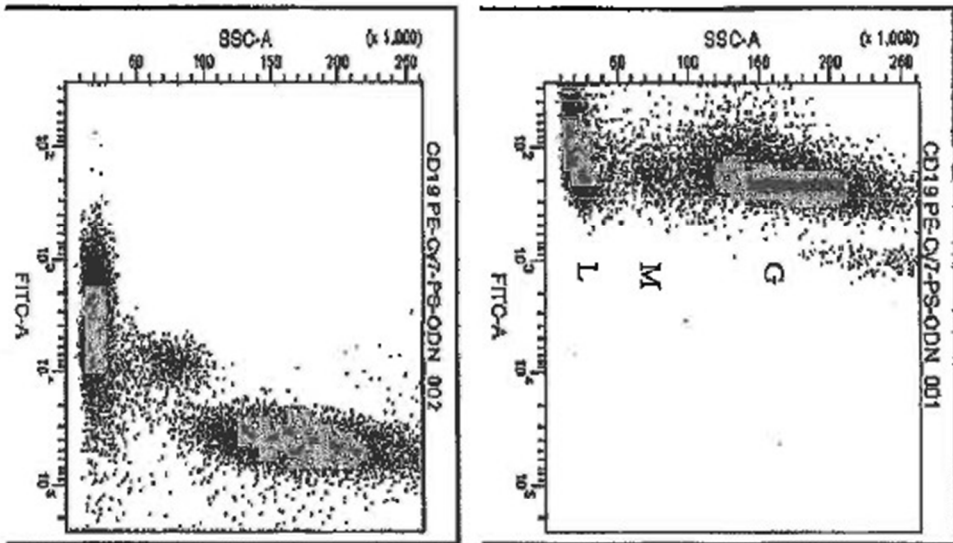


Figura 3



PS-ODN#2 (no marcado)

PS-ODN#2 marcado con FITC en las bases de citosina

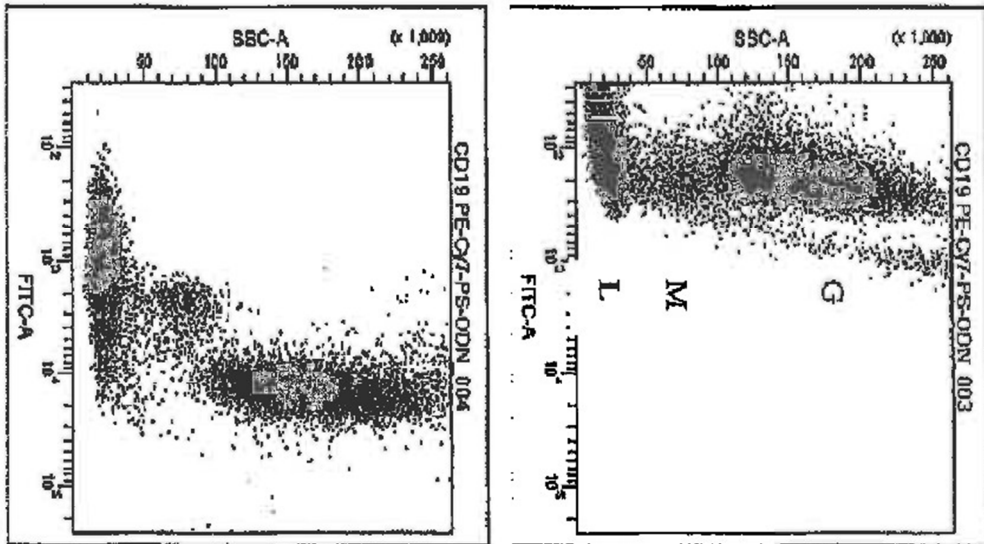


Figura 4

PS-ODN#5 (no marcado)

PS-ODN#5 marcado con FITC en el extremo 5'

Figura 5

Tinción de células con FITC-PS-ODN#2 y CD19-PE-Cy7

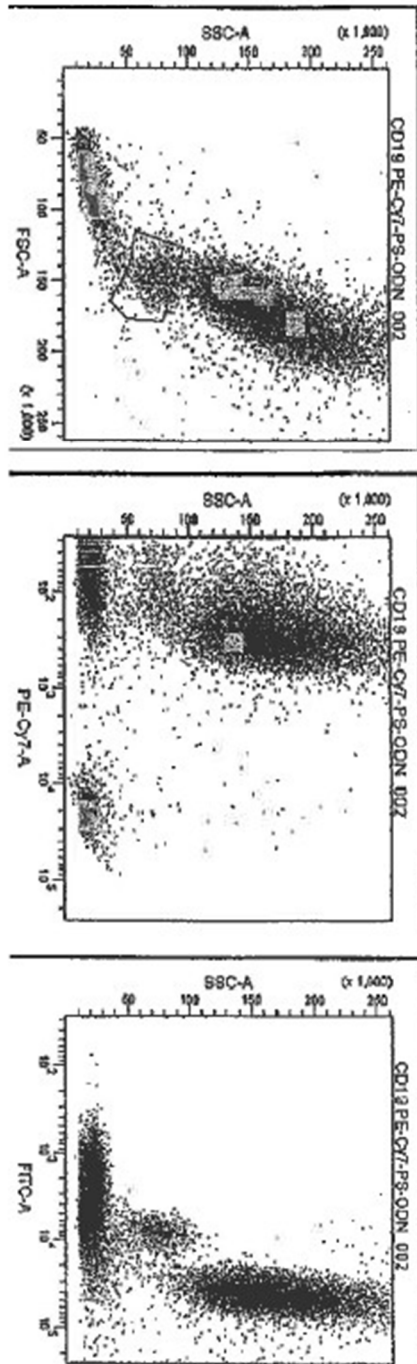


Figura 6

Tinción de células con FITC-PS-ODN#5 y CD19-PE-Cy7

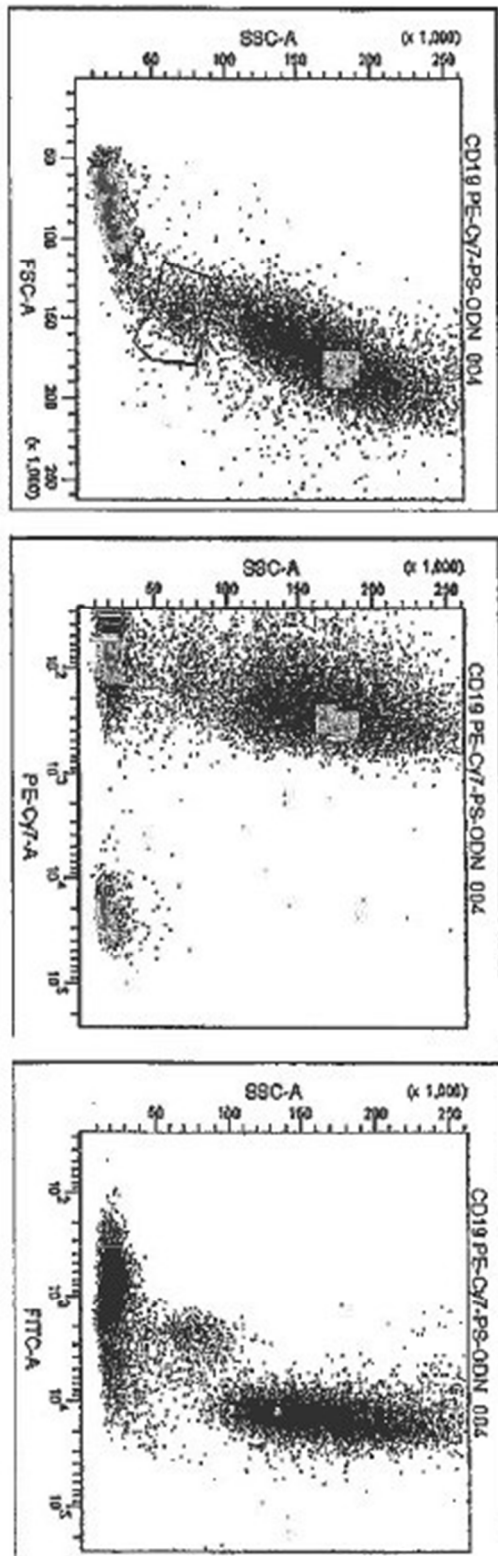
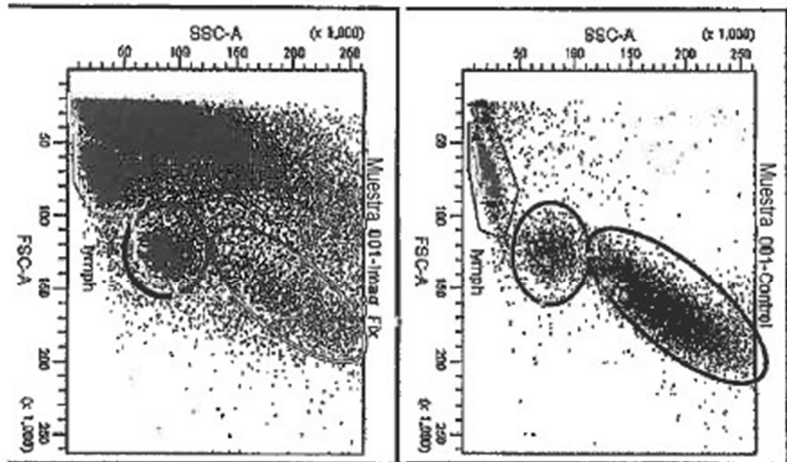


Figura 7



Células no tratadas (Control)

Células tratadas con PS-ODN-IMag y separadas magnéticamente