(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 653 639**

(51) Int. CI.:

C12N 15/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2012 PCT/JP2012/053583**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12117855**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2012 E 12752311 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2682462**

(54) Título: **Complejo ácido nucleico-polisacárido**

(30) Prioridad:

28.02.2011 JP 2011043310
10.08.2011 WO PCT/JP2011/068265

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2018

(73) Titular/es:

NAPAJEN PHARMA, INC. (100.0%)
527, 533 Airport Boulevard
Burlingame, California 94010, US

(72) Inventor/es:

RII, KO;
SAKURAI, KAZUO;
KOBAYASHI, MASAKAZU;
ANDO, HIRONORI;
HIGUCHI, SADAHARU y
TAKAHARA, SHIRO

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Complejo ácido nucleico-polisacárido

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un complejo ácido nucleico-polisacárido muy estable de un siRNA y esquizofilano. De igual forma, la presente invención se refiere a un método para controlar la función de una célula que expresa la dectina-1, tal como una célula dendrítica, y obtener un efecto terapéutico eficaz al inhibir la expresión de un gen deseado mediante el uso del complejo ácido nucleico-polisacárido, y a un fármaco para ser usado en el método. Además, la presente invención se refiere a un método para la inmunomodulación y un fármaco para ser usado en éste. En particular, la presente invención se refiere a un fármaco o similar para ser usado en la supresión del rechazo que se produce en el trasplante de órganos y para ser usado en el tratamiento de alergias y enfermedades autoinmunitarias, mediante el uso de un siRNA contra un factor coestimulador y un complejo ácido nucleico-polisacárido muy estable de esquizofilano.

Antecedentes de la técnica

La interferencia por ARN (iARN), descubierta en 1998, tiene una eficacia y persistencia marcadamente superiores a la de los métodos antisentido convencionales y es un método innovador para la inhibición de la expresión génica, y, por lo tanto, ha generado esperanzas para su aplicación farmacéutica. Sin embargo, un ARN bicatenario (a saber, siRNA) que muestra actividad de iARN a menudo se degrada durante el proceso que va desde la administración hasta la captación en una célula diana, o se degrada en una célula, y ha sido difícil formar un complejo RISC, a saber, su sustancia activa, en una célula. Así pues, incluso aunque es un método inhibidor de expresión génica superior, no se obtiene un efecto suficiente y, por lo tanto, todavía no se dispone aún de un producto farmacéutico que utilice un siRNA.

Los siRNA sin modificar los degradan las nucleasas que están presentes en, por ejemplo, la sangre, y unos pocos siRNA sin modificar muestran un efecto de iARN en una célula desada. En consonancia, se han realizado diferentes modificaciones químicas en los siRNA para incluir resistencia a las nucleasas. Sin embargo, es necesaria una dosis elevada para la introducción eficaz en una célula. De igual forma, se sabe que, debido a la administración de un nucleótido bicatenario en un organismo vivo en una dosis alta mejora una reacción inmunitaria natural, y aparece un efecto inintencionado, a saber, una reacción inmunoestimuladora. De acuerdo con esto, se necesita una técnica de administración para introducir específicamente un siRNA en una célula deseada. Para las técnicas de administración de siRNA, se han desarrollado técnicas para incluir un siRNA, tales como liposomas y nanomicelas macromoleculares. Sin embargo, en términos de tropismo hacia la diana, estas técnicas de administración todavía están dentro del significado de acción selectiva pasiva y, para solucionar este inconveniente, se necesita un procedimiento que dé a conocer, por ejemplo, una molécula que se fije la célula deseada a un fármaco de siRNA.

Con tal técnica convencional de antecedente, existe una necesidad de acción selectiva positiva y de una técnica de administración de un siRNA que muestra una actividad de iARN significativa dentro de la célula deseada. Así pues, como método de administración de un siRNA a una célula dendrítica, se ha propuesto un complejo de esquizofilano y un siRNA con adición de polidesoxiadenina (véase la cita 1 de la bibliografía de patentes). Sin embargo, no es necesariamente posible obtener un efecto terapéutico satisfactorio con la técnica de la cita 1 de la bibliografía de patentes.

Por otra parte, se ha descrito hasta la fecha que la polidesoxiadenina con fosforotioatos puede formar un complejo estable con el esquizofilano (véase la cita 1 de la bibliografía que no son patentes). Sin embargo, se cree que un complejo de esquizofilano y un siRNA al que se ha añadido polidesoxiadenina con fosforotioatos no es capaz de mostrar un efecto de interferencia por ARN eficaz por las razones que vienen a continuación. En el complejo de esquizofilano y un siRNA que lleva añadido polidesoxiadenina, la porción que forma el complejo entre la polidesoxiadenina y el esquizofilano sirve de impedimento estérico para la formación de un complejo RISC. Por lo tanto, en el complejo de esquizofilano y un siRNA que lleva añadido polidesoxiadenina, la porción donde se forma el complejo con el esquizofilano necesita ser retirada antes de formar un complejo RISC en una célula, pero la polidesoxiadenina con fosforotioatos y el esquizofilano tienen una estabilidad notablemente alta y, así pues, no es fácil de retirar. Además, ya que la polidesoxiadenina con fosforotioatos es poco probable que se solucione enzimáticamente, es difícil retirar la porción donde se forma un complejo entre el esquizofilano y un siRNA al cual se añade la polidesoxiadenina con fosforotioatos (en particular, un siRNA de 21 restos que no está afectado por la acción de Dicer). Por lo tanto, se cree que, con respecto al complejo de esquizofilano y un siRNA al cual se añade la polidesoxiadenina con fosforotioatos (en particular, un siRNA de 21 restos), no es posible separar del siRNA en una célula la polidesoxiadenina con fosforotioatos y esquizofilano, lo que hace difícil la formación de un complejo RISC.

Por lo tanto, hoy día se cree que un complejo de esquizofilano y un siRNA al cual se añade una polidesoxiadenina con fosforotioatos (en particular, un siRNA de 21 restos) no es utilizable desde el punto de vista técnico para que exhiba con eficacia un efecto de interferencia por ARN.

Lista de citas

Bibliografía que no son patentes

[BNP 1] *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77, 1101-1110 (2004).

Bibliografía de patentes

[BP 1]Solicitud de patente internacional WO 2009/078470

Compendio de la invención

Problema técnico

Un objetivo principal de la presente invención es dar a conocer un complejo ácido nucleico-polisacárido muy estable de un siRNA y esquizofilano; un método para controlar la función de una célula que expresa la dectina-1, tal como una célula dendrítica, y obtener un excelente efecto terapéutico mediante la inhibición de la expresión de un gen deseado mediante el uso del complejo ácido nucleico-polisacárido; y un fármaco para ser usado en el método. Además, otro objeto principal de la presente invención es dar a conocer un método para modular una función inmunitaria y un fármaco para ser usado en éste. Además, otro objetivo principal de la presente invención es dar a conocer un fármaco para ser usado en la supresión del rechazo que se produce en el trasplante de órganos.

Solución del problema

Habiendo realizado la investigación diligente para solucionar los problemas anteriores, los inventores hallaron que, sorprendentemente, en el caso en el que se añade a un siRNA la polidesoxiadenina en la que al menos parte de la porción de los enlaces fosfodiéster está como fosforotioato, y se somete a la formación del complejo con el esquizofilano, se obtiene un complejo que tiene una estabilidad superior, modula la función de una célula que expresa la dectina-1, que reconoce específicamente el esquizofilano, cuando el complejo se administra a la célula, y ofrece un efecto terapéutico deseado. Además, los inventores también hallaron que un complejo ácido nucleico-polisacárido preparado por la adición de la polidesoxiadenina a un siRNA que está dirigido contra un gen que afecta a la función *in vivo* de la cual es responsable la célula que expresa la dectina-1, y al someter la polidesoxiadenina a la formación del complejo con el esquizofilano, puede modular la inmunidad *in vivo* y puede inducir de manera preventiva o terapéutica la inmunodepresión. Realmente, los inventores hallaron que en los modelos de trasplante de corazón se muestra un efecto muy excelente mediante el uso de un siRNA contra la CD40. Además, los inventores también hallaron que un complejo ácido nucleico-polisacárido en el que el esquizofilano y un siRNA de 21 restos que tiene una hebra sentido a la cual se ha añadido la polidesoxiadenina con fosforotioatos están formando complejo permite que la hebra antisentido se incorpore en un complejo de RISC, lo que hace posible que exhiba con eficacia un efecto de interferencia por ARN. Basándose en estos hallazgos, los inventores llevaron a cabo más investigaciones y llegaron a la presente invención.

La presente invención da a conocer, por ejemplo, un complejo ácido nucleico-polisacárido y un método para producir el complejo ácido nucleico-polisacárido que se describe a continuación.

Punto 1. Una preparación farmacéutica para suprimir el rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante, que comprende un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y un polinucleótido que contiene un siRNA al cual se ha añadido polidesoxiadenina, contra un factor coestimulador.

Punto 2. La preparación farmacéutica de acuerdo con el punto 1, en donde el siRNA es de 21 restos y el polinucleótido contiene la polidesoxiadenina que tiene enlaces fosfodiéster que están al menos parcialmente modificados como fosforotioatos y que está añadida a una hebra sentido del siRNA.

Punto 3. La preparación farmacéutica de acuerdo con el punto 1 o 2, en donde al menos el 50% de los enlaces fosfodiéster de la polidesoxiadenina están como fosforotioatos.

Punto 4. La preparación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde el factor coestimulador es el que se expresa en una célula que expresa la dectina-1.

Punto 5. La preparación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde el factor coestimulador es cualquiera de CD40, B7.1 y B7.2.

Punto 6. La preparación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde el factor coestimulador es CD40.

Punto 7. La preparación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde el tratamiento de trasplante es trasplante de riñón, trasplante de corazón, trasplante de pulmón, trasplante de médula ósea, trasplante de piel o trasplante de córnea.

Punto 8. Un método para suprimir el rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante, que comprende la

etapa de administrar un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y un polinucleótido que contiene un siRNA al cual se ha añadido polidesoxiadenina, contra un factor coestimulador, a un animal que necesita el tratamiento o la profilaxis de resistencia o rechazo a un órgano o tejido trasplantado.

Punto 9. Uso de un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y un polinucleótido que contiene un siRNA al cual se ha añadido polidesoxiadenina, contra un factor coestimulador, para la fabricación de un fármaco para suprimir el rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante.

Punto 10. Un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y un polinucleótido en el que la polidesoxiadenina que tiene enlaces fosfodiéster que están al menos parcialmente modificados como fosforotioatos se añade a un siRNA que está dirigido contra un gen deseado.

Punto 11. El complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con el punto 10, en donde el siRNA es de 21 restos y se le añade el polinucleótido en el que la polidesoxiadenina que tiene enlaces fosfodiéster que están al menos parcialmente como fosforotioatos están añadidos a una hebra sentido del siRNA.

Punto 12. El complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con el punto 10 u 11, en donde la polidesoxiadenina tiene de 30 a 50 nucleótidos.

Punto 13. El complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con cualquiera de los puntos 10 a 12, en donde al menos el 50% de los enlaces fosfodiéster de la polidesoxiadenina son fosforotioatos.

Punto 14. El complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con cualquiera de los puntos 10 a 13, en donde el gen deseado es un gen que se expresa en una célula que expresa la dectina-1.

Punto 15. El complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con cualquiera de los puntos 10 a 14, en donde el gen deseado es un factor coestimulador que se expresa en una célula que expresa la dectina-1.

Punto 16. El complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con el punto 15, en donde el factor coestimulador es un gen del CD40.

Punto 17. Una composición farmacéutica que contiene un complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con cualquiera de los puntos 10 a 16.

Punto 18. Una función moduladora para una célula que expresa la dectina-1, que contiene un complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con cualquiera de los puntos 10 a 16.

Punto 19. La función moduladora de acuerdo con el punto 18, en donde una función de la célula que expresa la dectina-1 es una función inmunomoduladora.

Punto 20. Un inmunomodulador que contiene un complejo ácido nucleico-polisacárido de acuerdo con cualquiera de los puntos 10 a 16.

Punto 21. Un método para modular una función de una célula que expresa la dectina-1, que incluye la etapa de poner en contacto un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y polinucleótido en el que la polidesoxiadenina que tiene enlaces fosfodiéster que están al menos parcialmente como fosforotioatos está añadida a un siRNA que está dirigido contra un gen que afecta una función *in vivo* de la cual es responsable una célula que expresa la dectina-1, con una célula que expresa la dectina-1.

Punto 22. El método de acuerdo con el punto 21, en donde la modulación de la función de la célula que expresa la dectina-1 es la inmunomodulación.

Punto 23. Un método para modular una función inmunitaria, que incluye la administración de un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y polinucleótido en el que la polidesoxiadenina que tiene enlaces fosfodiéster que están al menos parcialmente como fosforotioatos está añadida a un siRNA que está dirigido contra un gen que afecta una función *in vivo* de la cual es responsable una célula que expresa la dectina-1, con un animal que necesita la modulación de la función inmunitaria.

Punto 24. Uso de un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y polinucleótido en el que la polidesoxiadenina que tiene enlaces fosfodiéster que están al menos parcialmente como fosforotioatos está añadida a un siRNA que está dirigido contra un gen que afecta a una función *in vivo* de la cual es responsable una célula que expresa la dectina-1, para la fabricación de un modulador de la función inmunitaria.

Efecto de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede inducir una actividad de iARN mediante la introducción eficaz de un siRNA en una célula diana, y una enfermedad pertinente para la célula destinataria se puede tratar mediante la modulación de la función de la célula destinataria. Además, también es posible dar a conocer un método de tratamiento que se basa en la inducción de la inmunodepresión con un fármaco de siRNA en dosis baja que le saca

partido al complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención. En particular, es posible suprimir con eficacia el rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante mediante el uso del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 4, o dicho de otra manera, un siRNA al cual está unido la poli(dA) modificada con S puede producir un efecto de interferencia por ARN sin haber ido escindido por Dicer.

La figura 2 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 8, a saber, la inhibición de la recuperación de la proliferación por una alorreacción.

La figura 3 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 8, o dicho de otra manera, las células que dan positivo para CD11c con un complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG inducen la inmunodepresión en la RLM con precultivo.

La figura 4 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 9 (9-B), o dicho de otra manera, un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibió significativamente la activación de los linfocitos en la RLM *ex vivo.*

En la figura 5 se muestran imágenes que presentan los resultados del ejemplo 10, a saber, células HEK 293T y células dHEK tratadas con el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647.

En la figura 6 se muestran los resultados del ejemplo 10. Es decir, con respecto a las células HEK 293T y a las células dHEK tratadas con el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647, una gráfica que muestra los resultados de medir el nivel de la captación del complejo (intensidad de la fluorescencia de Alexa 647) (figura 6A) y una gráfica que muestra el nivel de expresión de la dectina-1 en la superficie celular (intensidad de fluorescencia de FITC) (figura 6B).

La figura 7 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 11 (11-A), o dicho de otra manera, la administración de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibió significativamente la activación de los linfocitos.

La figura 8 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 11 (11-B), o dicho de otra manera, la administración de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibió significativamente la activación de los linfocitos.

La figura 9 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 13, o dicho de otra manera, en un modelo de ratón para trasplante de corazón heterotópico al que se ha administrado un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG, el latido cardíaco del corazón trasplantado es normal durante un largo periodo de tiempo y la tasa de supervivencia después del trasplante es alta.

Descripción de las realizaciones

1. Complejo ácido nucleico-polisacárido que contiene esquizofilano y siRNA que lleva añadido polidesoxiadenina que podría tener fosforotioatos, y las aplicaciones del mismo

Con respecto al complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, se añade una cola de polidesoxiadenina a al menos un extremo de una hebra sentido o de una hebra antisentido que constituye un siRNA dirigido contra un gen deseado, y se forma una triple hélice mediante una hebra de polidesoxiadenina y dos hebras de esquizofilano. En la presente invención, al menos parte de los enlaces fosfodiéster de la cola de polidesoxiadenina podrían estar como fosforotioatos.

El complejo de la presente invención contiene un siRNA compuesto por una secuencia de bases que concuerda con la secuencia deseada del gen deseado como una porción responsable de un efecto de la interferencia por ARN. Aquí, el siRNA puede ser una secuencia que concuerda al 100% con la secuencia deseada, o se podrían remplazar o añadir una o varias bases, siempre y cuando se obtenga el efecto de interferencia por ARN deseado.

Aquí, el gen deseado es un gen al que se le puede inhibir la expresión génica mediante un efecto de interferencia por ARN. Con respecto al complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, el gen deseado no está particularmente limitado y se puede seleccionar idóneamente basándose en la aplicación del complejo ácido nucleico-polisacárido.

El gen deseado de la presente invención no está particularmente limitado, pero desde el punto de vista del uso en las aplicaciones farmacéuticas, es idóneo un gen que está implicado en un estado de enfermedad y del que se espera la inhibición de su expresión. Ejemplos específicos de genes deseados incluyen (a) un gen que codifica un factor implicado en el comienzo de un estado de enfermedad o en el empeoramiento de un síntoma al mismo tiempo que se produce un exceso de su producto de transcripción a través de estímulos externos o similares, y (b) un gen deseado que tiene un sitio mutado y codifica un factor que está implicado directamente en el comienzo de una enfermedad al mismo tiempo que produce su producto de transcripción.

Los ejemplos de genes deseados incluyen genes que codifican factores que inducen la inflamación, tales como las citocinas tales como TNFα, interleucina y MIF.

También están contemplados dentro del gen deseado (a) los genes que codifican factores que determinan el encendido y apagado de las actividades intracelulares. Los ejemplos de tales genes incluyen proteína cinasas (por ejemplo, Raf, MEK y Jaks), factores de transcripción (por ejemplo, Stats), y similares.

Además, el gen deseado (a) abarca un gen deseado que codifica un receptor de la superficie celular y también un gen deseado que codifica un factor que influye en el comienzo o en el agravamiento de un estado patológico a través del receptor de la superficie celular. Ejemplos de tales genes incluyen genes que codifican receptores del factor de la necrosis tumoral (TNFR), receptores del factor de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGFR), receptores de interleucinas, y similares.

El gen deseado (b) se refiere a un gen deseado que tiene un sitio mutado y codifica un factor que induce el comienzoo el agravamiento de un estado patológico, tal como la inflamación o la muerte celular, ya que su producto de transcripción ocasiona que se pierda la función de una célula normal o se erija como una sustancia citotóxica. Los ejemplos de tales genes incluyen la mutación V617F de Jak2, la mutación de repetición de CAG de ATN1, la mutación V30M de TTR, la mutación R125C de KT14, y similares.

En la presente invención, el gen deseado es preferiblemente un gen que se expresa en una célula que expresa la dectina-1 y que influye en la función *in vivo* de la cual es responsable la célula. La dectina-1 es un receptor (receptor de reconocimiento de patrones) que tiene un dominio de reconocimiento de cadenas de azúcares de un tipo de leptina de tipo C sobre la membrana celular. La dectina-1 tiene por fuera de la célula una región que reconoce específicamente los ß-1,3-glucanos, y dentro de la célula tiene un motivo, denominado motivo 1 de activación con tirosinas de inmunorreceptor (ITAM, por su nombre en inglés), que emite una señal de activación. Una vez que reconoce el ß-1,3-glucano, la dectina-1 facilita la producción del NF-κB o una citocina inflamatoria para inducir una respuesta de defensa biológica. En la presente invención, los ejemplos de células que expresan la dectina-1 incluyen macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y similares. Se sabe que el esquizofilano tiene un esqueleto de ß-1,3-glucano y que se introduce en una célula que expresa la dectina-1 a través de una señal inducida cuando se fija a la dectina-1 que está presente en la membrana celular de una célula que expresa la dectina-1. El complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención se introduce en una célula que expresa la dectina-1 porque el esquizofilano, que es componente del complejo, es reconocido por la dectina-1. De igual forma, la selección de un siRNA que actúa selectivamente sobre un gen que influye en la función *in vivo* de la cual es responsable una célula que expresa la dectina-1 como el siRNA que ha de estar contenido en el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención hace posible inducir *in vivo* la inmunodepresión y modular la inmunidad.

En el caso en el que se considere un gen deseado cualquier gen que se expresa en una célula que expresa la dectina-1 e influye en la función *in vivo* de la cual es responsable esta célula, el gen no está particularmente limitado y se puede seleccionar idóneamente basándose en la aplicación del complejo. Los ejemplos de tales genes incluyen CD40, B7.1(CD80), B7.2(CD86), CCR7, CCL21, DC-SIGN, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN-α, IFN-γ y similares. Tales genes también incluyen un gen que codifica una proteína que interviene en la cascada de señalización. Desde el punto de vista de inducir con más eficacia la inmunomodulación, en especial la inmunodepresión, en un cuerpo vivo, un gen deseado idóneo podría ser un gen que es relevante para la presentación del antígeno, tal como un gen que codifica un factor coestimulador (también denominado una molécula coestimuladora), p. ej., CD40, B7.1(CD80) y B7.2(CD86). Entre otras cosas, en el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, el uso de un siRNA contra un gen que codifica el factor coestimulador puede suprimir con eficacia el rechazo que se produce en el trasplante de órganos.

En un ejemplo idóneo del siRNA que constituye el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, el ARN de la hebra sentido y el ARN de la hebra antisentido se componen, cada uno, de 21 ribonucleótidos, con un extremo protuberante compuesto por 2 ribonucleótidos que se forman en el extremo en 5' del ARN de la hebra sentido, así como el extremo 5' del ARN de la hebra antisentido. Es decir, en el caso de tal ARN bicatenario, del 1.º al 19.º ribonucleótido desde el extremo 3' del ARN de la hebra antisentido son complementarios a los ribonucleótidos 3.º a 21.º del extremo en 5' del ARN de la hebra sentido. En la presente memoria, tal siRNA de 21 restos también se denomina un siRNA de tipo 21-mérico. El siRNA de 21 restos no es escindible por Dicer. En la presente memoria, el siRNA de 21 restos representa un siRNA que muestra un efecto de iARN sin llegar a ser escindido por Dicer. En el caso en el que la polidesoxiadenina modificada con fosforotioatos se añade a la hebra sentido en el siRNA de 21 restos, el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención puede mostrar con eficacia un efecto de interferencia por ARN al permitir que la hebra antisentido se incorpore en un complejo RISC.

En la presente invención, es idóneo un siRNA en el cual el número de monocadenas de dA fijadas al ARN bicatenario es 1, y la monocadena de dA está fijada al extremo en 5' de la hebra sentido. Así pues, en el caso en el que la monocadena de dA esté fijada solo al extremo en 5' de la hebra sentido, se puede mostrar notablemente el efecto de interferencia por ARN basado en el ARN bicatenario.

De igual forma, en el caso del siRNA de tipo 21 restos, la monocadena de polidesoxiadenina puede estar fijada a cualquiera de hebra sentido/hebra antisentido y de extremo en 5'/extremo en 3', y en el caso en el que la

monocadena de polidesoxiadenina esté fijada, en particular, al extremo en 5' de la hebra sentido, se puede mostrar un efecto de interferencia por ARN superior.

El número de desoxiadeninas que constituyen la monocadena de polidesoxiadenina no está particularmente limitado, siempre y cuando se pueda formar un complejo con esquizofilano, que se describirá a continuación, y es, por ejemplo, de 10 a 100, preferiblemente de 20 a 100, más preferiblemente de 20 a 80, e incluso más preferiblemente de 30 a 50.

En el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, preferiblemente, al menos parte de los enlaces fosfodiéster de la porción responsable de la formación de un complejo entre el siRNA y el esquizofilano (a saber, porción de la cola de polidesoxiadenina (dA)) está como fosforotioatos (modificada con S). En la presente memoria, la magnitud de la modificación con S de la porción de la cola de dA (polidesoxiadenina) se refiere a la proporción (%) de enlaces de fosfodiéster modificados con S con respecto a los enlaces fosfodiéster totales de la cola de dA. De igual forma, el enlace fosfodiéster modificado con S muestra una estructura de fijación en la que un átomo de oxígeno del resto de fosfato de la porción del enlace fosfodiéster está remplazado por un átomo de azufre.

La modificación con S de la polidesoxiadenina se puede realizar de acuerdo con un método conocido. La distribución de la modificación con S en la porción de la cola de dA no está particularmente limitada y la modificación con S deseada se podría llevar a cabo en cualquier localización. La porción de la cola de dA modificada con S forma un complejo favorable con el esquizofilano, y el complejo ácido nucleico-polisacárido obtenido de esta manera tiene un nivel alto de resistencia a las enzimas degradantes. La magnitud de la modificación con S de la porción de la cola de dA normalmente es del 50% o mayor, preferiblemente del 80%, y más preferiblemente del 100%.

La monocadena de polidesoxiadenina podría estar directamente fijada al ribonucleótido del extremo del ARN de la hebra sentido y/o del ARN de la hebra antisentido del ARN bicatenario, o puede estar unido mediante un conector (espaciador).

El complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención contiene el esquizofilano como una porción que es responsable de una función deseada que no es el efecto de interferencia por ARN. El esquizofilano es un polisacárido con un esqueleto de ß-1,3-glucano y se introduce en una célula a través de una señal que se induce cuando se fija a la dectina-1, que es un receptor presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno.

El esquizofilano (a veces abreviado como SPG), que es un componente del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, se puede producir de acuerdo con un método corriente descrito en un documento (A.C.S. 38(1), 253 (1997) o *Carbohydrate Research*, 89, 121-135 (1981)). El esquizofilano obtenido de tal manera se podría someter a tratamiento con ultrasonidos para dar el esquizofilano que tiene una masa molecular deseada.

En el caso en el que una molécula funcional tenga que estar fijada al SPG, la proporción de la molécula funcional a fijar es, por ejemplo, de 1 a 200, preferiblemente de 1 a 100 y particularmente preferido de 1 a 50, moléculas funcionales con respecto a las 100 cadenas laterales del SPG. La proporción de molécula funcional fijada se puede ajustar mediante el control de la cantidad de oxidante que se añade, tal como peryodato de sodio, con respecto al resto de glucosa ramificado en el método arriba mencionado.

El sitio de fijación donde se fija la molécula funcional al SPG y el sitio de fijación donde se fija el conector para la molécula funcional no están particularmente limitados, pero es preferible que la porción de 1,2-diol de la glucosa con un enlace 1,6-glucopiranósido ramificado del esqueleto de ß-1,3-glucano del SPG esté sustituida para la fijación.

La masa molecular del esquizofilano utilizado en el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención no está particularmente limitada y se ajusta idóneamente de acuerdo con, por ejemplo, la longitud de cadena de la cola de dA. Específicamente, la masa molecular del esquizofilano suele ser, por ejemplo, de 25.000 a 500.000, y preferiblemente de 25.000 a 250.000.

El complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención se puede preparar de acuerdo con un método conocido. Un ejemplo específico podría ser un método de producción que tiene las etapas siguientes (1) a (3): (1) el ARN bicatenario fijado al polinucleótido descrito más arriba al cual está fijada una cola de monocadena de dA, directamente o a través de un conector, se prepara de acuerdo con un método conocido, (2) por separado, se da a conocer el SPG, o se prepara el SPG (SPG modificado) al cual está fijado una molécula funcional, directamente o a través de un conector, y (3) a continuación se forma un complejo mediante el uso de la cola de monocadena de dA fijada al ARN bicatenario que se fija al ADN y el SPG o el SPG modificado.

En la etapa (3) del método, la proporción de mezcla del ARN bicatenario fijado al polinucleótido entre el SPG o el SPG modificado se puede seleccionar idóneamente de acuerdo con la longitud de la cadena de la cola de dA, o la longitud de la cadena del SPG o del SPG modificado. En el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, una molécula de glucosa del esqueleto del SPG corresponde a una molécula de adenina de la cola de dA, y una cadena de cola de dA y dos cadenas de SPG forman una conformación de triple hélice. Es decir, en el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, la cola de dA está incorporada en una o varias localizaciones de la conformación de doble hélice formada por dos cadenas de SPG, formando así una conformación de triple hélice. Por ejemplo, con un siRNA que lleva añadido una cola de dA de 40 restos y SPG con

una masa molecular de 150.000, forman una conformación de triple hélice dos moléculas de SPG con una masa molecular de 150.000 y 17 moléculas de un siRNA al cual está añadida una dA de 40 restos. Una razón molar preferible del siRNA que lleva añadido la cola de dA por SPG es de 20:1 a 1:5, y preferiblemente, se mezclan a 10:1 a 1:1, y forman un complejo la región de polidesoxiadenina monocatenaria del ARN bicatenario fijado al polinucleótido y el SPG o el SPG modificado. Al someter el siRNA y el SPG o el SPG modificado a las condiciones de formación del complejo en tal razón molar permite que estos materiales interaccionen con eficacia entre sí, haciendo así posible la mejora de la eficacia de producción del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención.

En concreto, la formación de la conformación de la triple hélice del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención se puede llevar a cabo de acuerdo con el método que viene a continuación. El SPG adopta una conformación de triple hélice en un entorno natural o en el agua. Este SPG se disuelve en un solvente polar, tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO) o una solución alcalina acuosa, tal como una solución acuosa de hidróxido de sodio, para ser modificada en hebras monocatenarias, a continuación, se añade un siRNA que lleva añadida la cola de dA, el solvente se reemplaza por agua o se neutraliza la solución alcalina acuosa (proceso de regeneración) y, gracias a esto, se forma una conformación helicoidal triple del complejo (estructura de asociación) compuesta por una porción de la cadena de un polinucleótido unido con un ARN bicatenario y dos cadenas de SPG. Parece que la formación de tal complejo de un polinucleótido y un polisacárido se consigue principalmente a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas.

El complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, una vez introducido en una célula, puede inhibir la expresión de un gen deseado en la célula y, así, se puede utilizar como una composición farmacéutica con la intención de inhibir la expresión del gen deseado. La composición farmacéutica se puede preparar mediante la combinación idónea de una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención como ingrediente activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tal vehículo incluyen vehículos acuosos, tal como agua purificada, soluciones acuosas que contienen azúcar, tamponantes, solución salina fisiológica, y agua sin nucleasas; excipientes; y similares.

El complejo ácido nucleico-polisacárido de la invención se administra por vía intravenosa.

Ya que el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención es captado específicamente por una célula que expresa la dectina-1, hacer que el gen diana del siRNA sea un gen que influye en la función *in vivo* de la cual es responsable la célula que expresa la dectina-1 hace posible la utilización del siRNA también como un ingrediente activo de un modulador de la función de la célula que expresa la dectina-1. Tal y como se mencionó más arriba, la célula que expresa la dectina-1 es una célula que está implicada en funciones inmunitarias, tal como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, y se espera que el modulador funcional sirva como supuesto modulador de la función inmunitaria. Además, la presente invención también da a conocer un inmunomodulador que contiene el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención como uno de sus ingredientes activos. Los diferentes vehículos que pueden estar contenidos en estos agentes farmacéuticos, las vías de administración de los agentes farmacéuticos, y similares, son tal y como está descrito más arriba.

En particular, en el caso en el que el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención se utiliza para la inmunomodulación (en particular, inmunodepresión), un gen que codifica el factor coestimulador arriba mencionado (también denominado molécula coestimuladora) se considera que es un gen deseado. Un factor coestimulador junto con una molécula estimuladora auxiliar correspondiente (ligando de integrina) constituye una vía coestimuladora y funciona para llevar a cabo la transducción de señales para la defensa biológica, y también para fortalecer la adhesión intracelular entre una célula presentadora de antígeno y un linfocito T. Un ejemplo específico de factor coestimulador idóneo en la presente invención es el CD40. El CD40 es un antígeno con una masa molecular de 50 kDa que está presente en la superficie de la membrana celular y que se expresa en una célula que expresa la dectina-1. Se sabe que CD40 tiene una función importante en la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y de las células dendríticas. Se identificó el CD40 como un antígeno expresado en la superficie de los linfocitos B de humano y se cree que pertenece a la familia del receptor del TNF debido a la homología de su secuencia de aminoácidos.

En las aplicaciones del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, se puede comprobar la capacidad para inducir la inmunodepresión, por ejemplo, mediante una prueba de reacción linfocítica mixta (RLM) o una prueba en la que la inhibición de la proliferación de los linfocitos T se determina por la medición de la captación de timidina o de bromodesoxiuridina (BrdU).

Idóneamente, la selección de un gen deseado hace posible la utilización del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención en el tratamiento o la profilaxis de la resistencia o el rechazo a un órgano o tejido trasplantado (tal como riñón, corazón, pulmón, médula ósea, piel y córnea). El experto en la técnica puede determinar, para inducir la inmunodepresión, una cantidad eficaz que no sea tóxica del complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención mediante experimentación convencional. Aunque la dosis eficaz no está particularmente limitada, la dosis eficaz en el caso de utilizar un complejo siCD40/SPG se suele poder seleccionar en el margen de, por ejemplo, aproximadamente 0,001 a 10 mg por kilogramo de masa corporal al día.

Además, la presente invención da a conocer un método para introducir el complejo ácido nucleico-polisacárido descrito más arriba en una célula deseada, que incluye la etapa de poner en contacto el complejo ácido nucleico-polisacárido con la célula deseada. La cantidad de complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención introducida en una célula y el método de introducción podrían ser los mismos que los usados con los siRNA convencionales. Obsérvese que el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, incluso cuando se utiliza él solo, muestra una fuerte capacidad para migrar en una célula, y así pues es posible introducir el complejo ácido nucleico-polisacárido en una célula sin un reactivo convencional de transfección génica que se ha utilizado para introducir un siRNA en una célula, o con un reactivo convencional de transfección génica en poca cantidad. Obsérvese que la inhibición de la expresión del gen deseado debida al complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención se puede llevar a cabo *in vivo* así como *in vitro* o *ex vivo.*

De igual forma, la presente invención da a conocer el uso del complejo ácido nucleico-polisacárido para inhibir la expresión de un gen deseado en una célula y el uso del complejo ácido nucleico-polisacárido para fabricar un inhibidor de expresión del gen deseado. Además, la presente invención da a conocer un método para inhibir la expresión de un gen deseado que incluye la etapa de poner en contacto el complejo ácido nucleico-polisacárido con una célula que contiene un gen deseado. Con respecto a estos usos y el método, el complejo ácido nucleico-polisacárido y la manera de utilizar el complejo son tal y como está descrito más arriba.

2. Modulador de la función inmunitaria

Además, la presente invención da a conocer un modulador de la función inmunitaria que contiene un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y un polinucleótido, en el cual está añadida la polidesoxiadenina a un siRNA que se dirige contra un gen que afecta a la función *in vivo* de la cual es responsable una célula que expresa la dectina-1.

Con respecto al modulador de la función inmunitaria, el gen diana del siRNA es un gen que codifica un factor coestimulador y, particularmente preferido, un gen que codifica el CD40. El uso de los siRNA que actúan selectivamente sobre estos genes hace posible inducir *in vivo* la inmunodepresión y modular una función inmunitaria.

En el modulador de la función inmunitaria, al menos parte de los enlaces fosfodiéster de la polidesoxiadenina añadida al siRNA están como fosforotioato. La magnitud de modificaciones con S de la polidesoxiadenina es como está descrito en el apartado titulado «1. Complejo ácido nucleico-polisacárido que contiene esquizofilano y siRNA que lleva añadido polidesoxiadenina que podría tener fosforotioatos, y las aplicaciones del mismo».

De igual forma, en el complejo ácido nucleico-polisacárido utilizado en el modulador de la función inmunitaria, la estructura del siRNA, el número de desoxiadeninas que constituyen la polidesoxiadenina, la manera en la que se fija el siRNA a la polidesoxiadenina, la estructura del esquizofilano, y similares, son tal y como está descrito en el apartado titulado «1. Complejo ácido nucleico-polisacárido que contiene esquizofilano y siRNA que lleva añadido polidesoxiadenina que podría tener fosforotioatos, y las aplicaciones del mismo».

El modulador de la función inmunitaria se prepara como una composición farmacéutica para la inmunomodulación mediante la combinación idónea del complejo ácido nucleico-polisacárido con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos que podrían estar contenidos en el modulador de la función inmunitaria también son como está descrito en el apartado titulado «1. Complejo ácido nucleico-polisacárido que contiene esquizofilano y siRNA que lleva añadido polidesoxiadenina que podría tener fosforotioatos, y las aplicaciones del mismo».

El modulador de la función inmunitaria, cuando se administra en un animal (incluido un humano) que necesita tal modulación de una función inmunitaria, pone en contacto el complejo ácido nucleico-polisacárido con una célula que expresa la dectina-1 en el animal, haciendo así posible la inhibición de la expresión de un gen deseado en la célula y modular la función inmunitaria del animal. Aquí, un ejemplo específico de la modulación de una función inmunitaria podría ser la inmunodepresión. En el modulador de la función inmunitaria, el gen deseado es, preferiblemente, por ejemplo, CD40, B7.1 o B7.2, es decir, un factor coestimulador. Los ejemplos específicos de animales que necesitan tal inmunodepresión incluyen animales que necesitan tal tratamiento o profilaxis de resistencia o rechazo a un órgano o tejido trasplantado (tal como riñón, corazón, pulmón, médula ósea, piel y córnea). Para conseguir tal inmunodepresión, es preferible administrar el modulador de la función inmunitaria y un antígeno que requiere inmunodepresión. Por ejemplo, para los animales que necesitan el tratamiento o la profilaxis de la resistencia o rechazo de un órgano o tejido trasplantado (tal como riñón, corazón, pulmón, médula ósea, piel y córnea), la administración a los donantes y receptores del trasplante de órgano y tejido se realiza antes o después del trasplante, o antes y después del trasplante. Es deseable administrar el modulador de la función inmunitaria junto con un antígeno causativo para el tratamiento de la alergia y de la enfermedad autoinmunitaria.

Entre los moduladores de la función inmunitaria, los que actúan selectivamente sobre un factor coestimulador pueden inhibir la expresión del factor coestimulador de una manera específica para las células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, lo que permite inducir la inmunodepresión específica del antígeno, de tal modo que la inmunodepresión eficaz (en particular, la supresión del rechazo que se produce en un trasplante de órgano) se consigue con menos efectos secundarios, ya que tales moduladores de la función inmunitaria no afectan a las células, salvo a las células presentadoras de antígeno que expresan un factor coestimulador.

El método de administración, dosis y similares del modulador de la función inmunitaria son tal y como está descrito en el apartado titulado «1. Complejo ácido nucleico-polisacárido que contiene esquizofilano y siRNA que lleva añadido polidesoxiadenina que podría tener fosforotioatos, y las aplicaciones del mismo».

Además, la presente invención también da a conocer el uso de un complejo ácido nucleico-polisacárido para la fabricación de un modulador de la función inmunitaria. Adicionalmente, la presente invención da a conocer un método para modular una función inmunitaria que incluye la etapa de poner en contacto el complejo ácido nucleico-polisacárido con un animal que necesita tal modulación de una función inmunitaria. La presente invención también da a conocer el uso de un complejo ácido nucleico-polisacárido para la fabricación de un agente farmacéutico para la supresión del rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante. Aún más, la presente invención da a conocer un método para suprimir el rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante que incluye la etapa de administrar el complejo ácido nucleico-polisacárido a un animal que necesita el tratamiento o la profilaxis de la resistencia o el rechazo a un órgano o tejido trasplantado. Con respecto a este uso y el método, el complejo ácido nucleico-polisacárido y la manera de utilizar el complejo son tal y como está descrito más arriba.

Ejemplos

La presente invención se describirá con más detalle a continuación por medio de los ejemplos, pero la presente invención no estará limitada a los mismos. Obsérvese que el esquizofilano se podría denominar «SPG» en los ejemplos. De igual forma, el siRNA dirigido contra la luciferasa se podría denominar «siLuc», y el siRNA dirigido contra el CD40 se podría denominar «siCD40».

Ejemplo 1: Formación del complejo ácido nucleico-polisacárido de SPG y siRNA

Los complejos ácido nucleico-polisacárido utilizados en los ejemplos que vienen a continuación se formaron como se describe a continuación. El SPG con una masa molecular de aproximadamente 150.000 se preparó para tener una concentración final de 15 mg/ml en una solución de hidróxido de sodio a 0,25 N, luego se agitó durante 1 hora y se dejó reposar a 4 °C durante 1 día para la modificación. Una solución de un siRNA al cual se le había añadido una poli(dA) modificada con S disuelta en un primer fosfato de sodio a 330 mM se añadió a esta solución de SPG modificado, y la mezcla se neutralizó y se dejó reposar a 4 °C durante no menos de 24 horas. Entonces se preparó la mezcla para tener 0,27 mol de SPG por mol de siRNA. Obsérvese que, en el siRNA que lleva añadido la poli(dA) modificada con S, se le conectaron 40 desoxiadeninas con fosforotioato en el extremo en 5' de la hebra sentido del siRNA mediante enlaces fosfoéster. En los ejemplos siguientes, la poli(dA) modificada con S se podría denominar dA40(s). El grado de modificación con S de todas las polidesoxiadeninas modificadas con S que se utilizaron en los ejemplos siguientes fue del 100%.

Ejemplo 2: **Estabilidad del complejo ácido nucleico-polisacárido de siRNA que lleva añadido poli(dA) modificada con S y SPG en el medio de cultivo celular**

La preparación se llevó a cabo para cumplir las condiciones mostradas en la tabla 1 mediante la adición de una muestra a un tampón de fosfato (PBS) o un medio de cultivo celular (SBF al 10% + RPMI) (SBF: Biological Industries, n.º de catálogo 04-001-1A, RPMI: Wako Pure Chemical Industries, Ltd., n.º de catálogo 189-02025). La muestra se incubó a 37 °C durante 4 horas o 24 horas, a continuación, se sometió a electroforesis en las condiciones de 100 V y 60 min en gel de poliacrilamida al 12,5% (Tris-borato-EDTA (TBE)), y se tiñó con SYBR Gold (Lifetechnologies, Japón).

En la tabla 1, en dA40(s)-siLuc(21 nt), se le añadió la polidesoxiadenina de 40 restos modificada con fosforotioatos al extremo 5' de la cadena sentido del siRNA de 21 restos (SEQ ID n.º. 1) dirigido contra la luciferasa. En dA40(s)-siLuc(27 nt), se le añadió la polidesoxiadenina de 40 restos modificada con fosforotioato al extremo 5' de la cadena sentido del siRNA de 27 restos (SEQ ID n.º. 3) dirigido contra la luciferasa.

Tabla 1

Carril	Muestra	Incubación
1	dA40(s)-siLuc(27 nt)	Sin incubación
2	dA40(s)-siLuc(27 nt)	SBF al 10% + RPMI: 37 °C, 24 horas
3	complejo dA40(s)-siLuc(27 nt)/SPG	SBF al 10% + RPMI: 37 °C, 24 horas
4	dA40(s)-siLuc(21 nt)	Sin incubación
5	dA40(s)-siLuc(21 nt)	SBF al 10% + RPMI: 37 °C, 24 horas

Carril	Muestra	Incubación
6	complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG	SBF al 10% + RPMI: 37 °C, 24 horas
7	complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG	SBF al 10% + RPMI: 37 °C, 4 horas
8	dA40	Sin incubación
9	SBF al 10% + RPMI	Sin incubación

Como resultado, con respecto a los siRNA a los cuales se les había añadido la poli(dA) de 40 restos con fosforotioatos, las muestras que no estaban en forma de complejo de un siRNA y SPG en el medio de cultivo celular que contiene una enzima degradante (carriles 2 y 5) y los controles de los carriles 1 y 4 tenían bandas imprecisas, lo que indica degradación, y las muestras que estaban en forma de complejo de un siRNA y SPG (carriles 3, 6 y 7) mostraban bandas claramente visibles, lo que indica que los complejos ácido nucleico-polisacárido eran estables. Obsérvese que las muestras con siRNA a los cuales se les había añadido la poli(dA) con fosforotioatos eran más estables en un medio de cultivo celular que contenía enzimas degradantes que las que iban con siRNA a los cuales no se había añadido la poli(dA) con fosforotioatos.

Ejemplo 3: Sensibilidad a Dicer del complejo ácido nucleico-polisacárido

(3-1) Sensibilidad a Dicer del complejo ácido nucleico-polisacárido con una cola de dA sin modificar con S

En este ejemplo, se utilizó un kit con la enzima Dicer recombinante de humano (fabricado por Genlantis Inc.: n.º de catálogo T510002). De igual forma, se prepararon las premezclas que tienen los siguientes componentes (A a E).

A. Muestra de ácido nucleico: 2,5 µl (25 ng)

B. ATP a 10 mM: 1 µl

C. $MgCl_2$ a 50 mM: 0,5 µl

D. Tampón de reacción de Dicer: 4 µl

E. Enzima Dicer recombinante (1 unidad): 2 µl

Las muestras B a D o B a E se mezclaron en un tubo de PCR y, a continuación, se le añadió la muestra A de ácido nucleico. A continuación, se le añadió el agua destilada libre de nucleasas de tal manera que el volumen final fuera de 10 µl. A continuación, se llevó a cabo la incubación a 37 °C durante 15 horas. Después de la incubación, se le añadió una solución de parada para parar la reacción. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 80 min en un gel de poliacrilamida al 15% (Tris-borato-EDTA (TBE)), y se tiñó el gel con SYBR® Gold (Lifetechnologies, Japón).

En la tabla 2, siCD40(21 nt) representa un siRNA de 21 restos (SEQ ID n.^{os} 5 y 6) dirigido contra el CD40. En dA40-siCD40(21 nt), se añadió polidesoxiadenina de 40 restos al extremo en 5' de la hebra sentido (SEQ ID n.º 5) de un siRNA de 21 restos (SEQ ID n.^{os} 5 y 6) dirigido contra el CD40. siLuc21 representa un siRNA de 21 restos dirigido contra la luciferasa mostrada en las SEQ ID n.^{os} 1 y 2. En dA40-siLuc(21 nt), se añadió la polidesoxiadenina de 40 restos al extremo en 5' de la hebra sentido (SEQ ID n.º 1) de un siRNA de 21 restos (SEQ ID n.^{os} 1 y 2) dirigido contra la luciferasa.

Tabla 2

Carril	Muestra
1	Marcador
2	siCD40(21 nt)
3	dA40-siCD40(21 nt)
4	dA40-siCD40(21 nt): se añadió Dicer

Carril	Muestra
5	siLuc(21 nt)
6	dA40-siLuc(21 nt)
7	dA40-siLuc(21 nt): se añadió Dicer
8	siLuc(27 nt)
9	dA40-siLuc(27 nt)
10	dA40-siLuc(27 nt): se añadió Dicer

Los resultados de la electroforesis descrita más arriba muestran que la banda de electroforesis del carril 2 era tan claramente visible como la del carril 3, y la banda del carril 6 era tan claramente visible como la del carril 7, y, así pues, el poli(dA)-siRNA(21 nt) no es escindible por Dicer, pero, por otra parte, la banda del carril 10 era más difusa que la del carril 9, y el poli(dA)-siRNA(27 nt) es escindible por Dicer.

(3-2) Sensibilidad a Dicer del complejo ácido nucleico-polisacárido con cola de dA modificada con S

De la misma manera que en (3-1) más arriba, se evaluó la sensibilidad a Dicer de un complejo ácido nucleico-polisacárido con una cola de dA modificada con S.

Tabla 3

Carril	Muestra
1	Marcador
2	siLuc(21 nt)
3	siLuc(27 nt)
4	dA40(s)-siCD40(21 nt)
5	dA40(s)-siCD40(21 nt): Incubación con agua caliente a 37 °C.
6	dA40(s)-siCD40(21 nt): se añadió Dicer
7	Marcador
8	siLuc(21 nt)
9	siLuc(27 nt)
10	dA40(s)-siCD40(27 nt)
11	dA40-siCD40(27 nt): Incubación con agua caliente a 37 °C.
12	dA40-siCD40(27 nt): se añadió Dicer

En la tabla 3, siLuc(21 nt) representa un siRNA de 21 restos (SEQ ID n.^{os} 1 y 2) dirigido contra la luciferasa. El siLuc(27 nt) representa un siRNA de 27 restos (SEQ ID n.^{os}. 3 y 4) dirigido contra la luciferasa. En dA40(s)-siCD40(21 nt), se añadió la polidesoxiadenina de 40 restos con fosforotioatos al extremo 5' de la hebra sentido (SEQ

ID n.º 5) de un siRNA de 21 restos (SEQ ID n.os 5 y 6) dirigido contra el CD40. En dA40(s)-siCD40(27 nt), se añadió la polidesoxiadenina de 40 restos con fosforotioatos al extremo en 5' de la hebra sentido (SEQ ID n.º 7) de un siRNA de 27 restos (SEQ ID n.os 7 y 8) dirigido contra el CD40.

Los resultados de la electroforesis mostraron que la banda del carril 6 era tan claramente visible como las de los carriles 4 y 5, y, así pues, el siRNA de tipo 21 nt, incluso cuando se ha añadido a este la poli dA modificada con S, no es escindible por Dicer, pero por otra parte, la banda del carril 12 era más difusa que las de los carriles de control 10 y 11, y así, el siRNA de tipo 27 nt es escindible por Dicer.

Ejemplo 4: Efecto de interferencia por ARN del siRNA unido a poli(dA)

Se introdujo un vector de expresión de la luciferasa dual psiCHECK™-2 (Promega, n.º de catálogo C8021) en las células HEK 293 utilizando Lipofectamine™ LTX (Lifetechnologies, Japón, n.º de catálogo 15338-500). En este momento, se ajustó el número de células para ser 50.000 por pocillo. El dA40-siLuc(21 nt) o el dA40-siLuc(27 nt) se introdujo en las células con TransIT™-TKO (Takara Bio, Inc., n.º de catálogo V2154), y las células se incubaron a 37 °C durante 20 horas en una incubadora de CO_2. A continuación, se realizó el ensayo de la luciferasa dual (fabricado por Promega, sistema de ensayo Dual-Glo de la luciferasa, n.º de catálogo E2920) para medir el efecto de interferencia por ARN. Como control, se realizó el mismo procedimiento sin utilizar una muestra de ácido nucleico. Con respecto al efecto de interferencia por ARN, se compararon dos expresiones de la luciferasa en el control, y el efecto de interferencia por ARN en ese momento se consideró que era del 0%, y la inhibición de la expresión en cada muestra se expresó en forma de porcentaje.

Los resultados se muestran en la figura 1. Se demostró que el dA40-siLuc(21 nt) de 21 restos unido a la poli(dA), incluso sin ser escindido por Dicer, produce la misma actividad de efecto de interferencia por ARN que el dA40-siLuc(27 nt) de 27 restos.

Ejemplo 5: Efecto de inferencia por ARN del complejo siRNA/SPG unido a la poli(dA) con S

Se evaluó el efecto de interferencia por ARN de un complejo de SPG y un siRNA quimérico con poli(dA) con fosforotioatos mediante el ensayo de la luciferasa dual (fabricado por Promega, sistema de ensayo Dual-Glo de la luciferasa, n.º de catálogo E2920). Se utilizaron las células RAW264.7 (células dRAW), que expresan fuertemente la dectina-1 (obtenidas del profesor asociado Yoshiyuki Adachi (inmunología) del Departamento de Farmacología, Universidad de Tokyo de Farmacia y Ciencias Naturales). Las muestras utilizadas se muestran a continuación en la tabla 4. En la muestra 4 de la tabla 3, se introdujo el dA40(s)-siLuc(21 nt) con el uso de un TransIT™-TKO (Takara Bio, Inc., n.º de catálogo V2154).

Los resultados se muestran también a continuación en la tabla 4.

Tabla 4

	Muestra	Concentración de TransIT-TKO (µl/ml)	Concentración de siRNA (nM)	Efecto de interferencia por ARN (%)
1	Control (Cotransfección de psiCHECK™-2)	-	10	0
2	siLuc(21 nt)	-	10	8,8
3	dA40(s)-siLuc(21 nt)	-	10	-4
4	dA40(s)-siLuc(21 nt) (con TransIT-TKO)	0,1	10	1,8
5	complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG	-	10	41

De acuerdo con la tabla 4, se demostró que el complejo poli(dA)(s)-siRNA/SPG produce un efecto de interferencia por ARN.

Ejemplo 6: Dependencia de la dosis para el efecto de interferencia por ARN debido al complejo poli(dA)(s)-siRNA

En este ejemplo, se comprobó la dependencia de la dosis que tiene la actividad del siRNA. Se utilizaron las células dRAW, que eran proliferativas en un serocultivo al 10%. Las muestras utilizadas en este ejemplo se muestran en la tabla 5 que viene a continuación.

Este ejemplo se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento que viene a continuación. Se recuperaron las células

dRAW, se inocularon en una placa de 48 pocillos para quedar a 20.000 células/pocillo/200 µl, se incubaron en una incubadora de CO_2 a 37 °C durante 20 horas. A la placa de 48 pocillos se le añadió un complejo psiCHECK™-2/LTX en una cantidad de 20 µl/pocillo y un medio de cultivo en una cantidad de 180 µl/pocillo. A continuación, se llevó a cabo un ensayo de la luciferasa dual (fabricado por Promega, sistema de ensayo Dual-Glo de la luciferasa, n.º de catálogo: E2920). Los resultados se muestran a continuación en la tabla 5.

Tabla 5

	Muestra	Concentración de siRNA (nM)	Efecto de interferencia por ARN (%)
1	Control (Cotransfección)	0	0
2	dA40(s)-siLuc(21 nt) desnudo	100	14
3	complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG	1	12
4	complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG	10	21
5	complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG	100	36

En la tabla 5 se observa la demostración de que el complejo poli(dA)(s)-siRNA produce un efecto de interferencia por ARN de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7: Capacidad de introducción en una célula que tiene el complejo poli(dA)(s)-siRNA

(7-A) Capacidad de introducción en las células dRAW

Las células dRAW se inocularon para quedar a 1.000.000 células/placa (5 ml) y se incubaron en una incubadora de CO_2 a 37 °C durante 20 horas. A continuación, se les añadieron dA40(s)-siLuc(21 nt) desnudo marcado con Alexa™ 647 y el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa™ 647 al medio de cultivo, cada uno a una concentración de 100 nM, y se pusieron en contacto con las células dRAW. Después de añadir cada siRNA, las células se recuperaron 1, 2, 4 y 8 horas después. Las células recuperadas se fijaron con formaldehído equilibrado al 10% (100 µl/placa), y el número de células marcadas con Alexa™ 647 se midió mediante citometría de flujo (FACS).

De acuerdo con los resultados, el número de células marcadas con Alexa™ 647 utilizando el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG era más de dos veces mayor que el número de células marcadas obtenidas con el dA40(s)-siLuc(21 nt) desnudo, y parece que la captación celular del complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG es de más de dos veces mayor.

(7-B) Capacidad de introducción en CD11c(+)

Se obtuvieron esplenocitos de ratones (C57BL/6, macho, 7 semanas de edad; 4 ratones) de acuerdo con un método estándar. Algunos de los esplenocitos obtenidos se conservaron en refrigeración para ser usados como control. Los restantes esplenocitos se separaron en un grupo de células CD11c(-) y un grupo de células CD11c(+) mediante una columna MACS MS. La separación de las células por la columna se realizó dos veces. El grupo de células CD11c(+) se preparó para tener 7×10^5 células y se cultivaron en una placa de 6 pocillos (volumen de 2 ml) durante 48 horas (37 °C, CO_2 al 5%) para cumplir las condiciones mostradas en la tabla 6 que viene a continuación. Después del cultivo, se llevaron a cabo los análisis por FACS con los anticuerpos para FACS mostrados entre paréntesis en la tabla 6. En la tabla, Dectina-1-FITC representa un anticuerpo contra la dectina-1 modificado con FITC, CD11c-FITC representa un anticuerpo anti-CD40 modificado con FITC, y el control de isotipo con PE representa un anticuerpo de control de isotipo modificado con PE.

Tabla 6

	Muestra
1	Células CD11c(-) (Dectina-1-FITC)
2	Células CD11c(+) (control de isotipo con PE)
3	Células CD11c(+) (CD11c-FITC)

	Muestra
4	Células CD11c(+) (Dectina-1-FITC)
5	Células CD11c(+) + SPG (Dectina-1-FITC)
6	Células CD11c(+) + dA40(s)-siCD40(27 nt) desnudo a 100 nM (Dectina-1-FITC)
7	Células CD11c(+) + complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG a 100 nM (Dectina -1-FITC)

Se confirmó a partir de los resultados que la muestra 5 tiene una proporción más pequeña de células positivas para la Dectina-1 que la muestra 4, la muestra 7 tiene una proporción más pequeña de células positivas para la dectina-1 que las muestras 4 y 6, y cuando las células que expresan la dectina-1 captan el complejo siRNA/SPG, disminuye el nivel de expresión de la dectina-1 de las células.

(7-C) Incorporación en el CCR (complejo de carga de RISC)

Se obtuvieron esplenocitos de ratones (C57BL/6, macho, 7 semanas de edad; 4 ratones) de acuerdo con un método estándar. Algunos de los esplenocitos obtenidos se conservaron en refrigeración para ser usados como control. Los restantes esplenocitos se separaron en un grupo de células CD11c(-) y un grupo de células CD11c(+) mediante una columna MACS MS. La separación de las células en la columna se realizó dos veces. Se preparó un grupo de células CD11c(+) para tener 2×10^4 células y se cultivaron en una cámara para portaobjetos (4 pocillos, 1 ml/volumen de pocillo) durante 24 horas (37 °C, CO_2 al 5%). A continuación, a las células CD11c(+) se les añadió el siLuc en el cual el extremo en 5' de la hebra antisentido se había marcado con Alexa™ 647, y un complejo dA40(s)-siLuc/SPG en el cual el extremo en 5' se había marcado con Alexa™ 647, para alcanzar los 100 nM, y las células se cultivaron durante 1 hora (37 °C, CO_2 al 5%).

Una hora después, el sobrenadante del cultivo se retiró por succión. Se le añadieron 500 ml de una solución de paraformaldehído al 4%/PBS a cada pocillo y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de paraformaldehído/PBS por succión, se le añadió a cada pocillo 1 ml de PBS, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se retiró el PBS por succión. Este procedimiento se repitió una vez más (más adelante, el procedimiento para la incubación de 5 minutos a temperatura ambiente con PBS se denominará procedimiento de lavado). Se le añadieron 500 ml de una solución de Triton X-100 al 0,1%/PBS a cada pocillo, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación se retiró la solución de Triton X-100 al 0,1%/PBS por succión. El procedimiento de lavado se llevó a cabo dos veces. Se le añadió a cada pocillo 500 ml de una solución de suero de cabra normal al 10% (SCN)/PBS y las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de SCN al 10%/PBS por succión, se preparó un anticuerpo anti-TRBP2 de ratón para alcanzar 130 ng/ml con Triton X-100 al 0,1%, SCN al 1,5%, y SAB/PBS, después se le añadieron 500 ml del anticuerpo a cada pocillo, y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de anticuerpo se retiró por succión y el procedimiento de lavado se llevó a cabo 3 veces. Un anticuerpo anti-IgG de ratón con Alexa™ 488 (Lifetechnologies, Japón) se diluyó 750 veces con Triton X-100, SCN al 1,5% y SAB/PBS, y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución del anticuerpo se retiró por succión y el procedimiento de lavado se llevó a cabo 3 veces. Después de retirar el PBS por succión, se sacó de la cámara y se montó una muestra con un medio de montaje que contenía un agente que impide que se pierda el color. Se tomó una imagen de esta muestra con un microscopio confocal con láser y se analizó.

Se confirmó a partir de los resultados que el siRNA del complejo dA40(s)-siLuc/SPG que había sido captado por las células, y TRBP2, que es la proteína central del CCR, se localizaban en la misma localización, y las imágenes coincidían en la misma profundidad focal. Está claro a partir de los resultados que el siRNA captado por las células y TRBP2 están localizados tan cerca que pueden interaccionar uno con el otro, o dicho de otra forma, el siRNA se incorpora en el CCR. Por otra parte, en el caso de utilizar solamente siLuc marcado con Alexa 647, no se observó ninguna incorporación de siLuc.

(7-D) Inhibición de la expresión del ARNm de CD40 *in vitro*

(i) PCR en tiempo real

Las células dRAW cultivadas en pases (confluencia del 80%) se suspendieron en un medio de cultivo (SBF al 10% + RPMI (Lifetechnologies, Japón, n.º de catálogo 12718011S)) y se prepararon para tener 1×10^5 células/ml. La suspensión celular se añadió a una placa de 96 pocillos para tener 10.000 células por pocillo (100 µl/pocillo) y se cultivaron durante una noche con las condiciones de 37 °C y CO_2 al 5%. Después del cultivo, se retiró el sobrenadante del cultivo con un aspirador y se añadieron 100 µl del medio de cultivo a cada pocillo. Este

procedimiento se repitió dos veces. Cada una de las muestras (tabla 7) se ajustó para tener una concentración de 100 nM con un medio de cultivo con antelación, se añadió a una cantidad de 100 µl por pocillo, y se cultivaron durante 20 horas en las condiciones de 37 °C y CO_2 al 5%. Después del cultivo, se le añadieron 100 µl de un medio de cultivo a cada pocillo y el medio de cultivo se retiró a continuación con un aspirador. Se le añadieron 60 ng/ml de interferón γ (IFN-γ, PeproTech, n.º de catálogo 315-05), preparado con un medio de cultivo con antelación, se añadió en una cantidad de 100 µl por pocillo y se cultivó durante 4 horas en las condiciones de 37 °C y CO_2 al 5%. Después del cultivo, los ARN totales se prepararon con un kit CellAmp Direct RNA Prep (Takara Bio, Inc., n.º de catálogo 37329) a partir de las células de cada pocillo. Con los ARN totales preparados como plantilla, se sintetizaron los ADNc con un kit de reactivos Primer Script RT (Takara Bio, Inc., n.º de catálogo RR037A). Los ADNc sintetizados se sometieron a qPCR en tiempo real con SYBR Prime Ex Taq II (Takara Bio, Inc., n.º de catálogo RR081A) para medir los niveles de expresión del ARNm de CD40. Al mismo tiempo, se midió el nivel de expresión del ARNm de la actina β y esto se utilizó para corregir los valores medidos del ARNm de CD40. Los valores corregidos se consideraban como los niveles de expresión del ARNm de CD40 en las condiciones correspondientes. La secuencia de los cebadores utilizados para la qPCR es como se muestra en la tabla 8.

Tabla 7

	Muestra
1	Sin muestra
2	complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG
3	SPG solo
4	dA40(s)-siCD40(21 nt) desnudo

Tabla 8

Cebadores de CD40 de ratón	Cebador directo	CAAGGATTGCGAGGCATGTG	SEQ ID n.º 9
	Cebador inverso	TGACAGACGGTATCAGTGGTCTCAG	SEQ ID n.º 10
Cebadores de la ß-actina	Cebador directo	TGGCACCCAGCACAATGAA	SEQ ID n.º 11
	Cebador inverso	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	SEQ ID n.º 12

Se confirmó a partir de los resultados que el nivel de expresión de CD40 alcanzado con la adición únicamente de SPG o de siCD40 desnudo a las células que expresan la dectina-1 no era menor que el alcanzado por el control (sin muestra), o no se indujo ninguna actividad de iARN, pero la adición de un complejo siCD40/SPG a las células que expresan la dectina-1 inhibió la expresión del ARNm de CD40 sin debilitar la actividad de iARN original del siRNA.

(ii) FACS

Se separaron las células CD11(+) de bazo de ratón y la proporción de células positivas para CD40 en las células CD11(+) se analizaron por FACS. Además, se utilizó el mismo entorno que en el cultivo de células, o dicho de otro modo, las células se añadieron a un medio de cultivo con SBF al 10% + RPMI y se cultivaron durante las especificadas 4 horas a 48 horas después de calentarlas a 37 °C en una incubación de CO_2. En este momento, las células CD11(+) se trataron con SPG, dA40(s)-siCD40(27 nt) desnudo y un complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG, y la posterior expresión de CD40 se analizó por FACS. El método para tratar los esplenocitos es como está descrito en (7-B) más arriba. Los anticuerpos utilizados en el FACS se muestran entre paréntesis en la tabla 9 que viene a continuación. En la tabla, el control de isotipo con PE representa un anticuerpo de control de isotipo modificado con PE, y CD40-PE representa un anticuerpo anti-CD40 modificado con PE.

Tabla 9

	Muestra
1	Células CD11c(+) (control de isotipo con PE)
2	Células CD11c(+) (CD40-PE)
3	Células CD11c(+) + dA40(s)-siCD40(27 nt) desnudo a 100 nM (CD40-PE)
4	Células CD11c(+) + complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG a 100 nM (CD40-PE)

Los resultados mostraron que las células positivas para la expresión de CD disminuyen con la muestra 4, y el complejo siCD40/SPG inhibe la expresión de CD40 en la superficie de las células primarias. Por otra parte, con siCD40 sin estar en forma de un complejo con SPG, no se observó ninguna reducción en el número de células positivas para CD40 y no era posible inhibir suficientemente la expresión de CD40.

Parece que, en este ejemplo, se formó un complejo de un siRNA y SPG, y así, el siRNA se estabilizó en el suero y la sangre, gracias a lo cual el siRNA se introdujo con más eficacia en las células que el siRNA desnudo y para administrarse en el citoplasma, y como resultado, se inhibió la expresión del ARNm y se inhibió la expresión de la molécula deseada de la superficie de la membrana celular.

Ejemplo 8

Un factor coestimulador CD40, que es un conocido factor de respuesta temprana de una reacción inmunitaria, se estableció como una molécula deseada, y las células de un ratón que responde al tratamiento se trataron con un siRNA dirigido contra esta molécula. El efecto farmacológico se evaluó realizando una reacción linfocítica mixta (RLM) entre un grupo de células del estimulador y un grupo de células del respondedor tratadas o sin tratar con siRNA, y midiendo la tasa de proliferación celular de los correspondientes grupos mediante un kit de quimioluminiscencia con BrdU.

Al realizar la RLM, el uso de los esplenocitos CD11c(-) que responden hace que las células presentadoras de antígeno (CPA) sean deficientes, y así se suprime la reacción linfocítica normal y se inhibe la proliferación celular. Se añadieron a ellos los esplenocitos CD11c(+) tratados con un complejo siCD40/SPG y se observó la magnitud de la recuperación de la proliferación celular. Se confirmó, a partir de una comparación de RLM alógena y RLM singénica a la cual se añadió o no se añadió un complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG, que se consiguió la inducción notable de la inmunodepresión mediante la adición del complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG (se redujo la magnitud de la recuperación de la proliferación celular: figuras 2 y 3).

En este ejemplo, se utilizó un ratón C57BL/6 como ratón que responde al tratamiento, y Balb/c se utilizó como ratón estimulador. Durante la RLM, los esplenocitos del estimulador se utilizaron después de que la proliferación celular de los esplenocitos del estimulador se detuviera con la mitomicina C (MMC) que se añadió cuando se recogieron los esplenocitos del estimulador.

El precultivo en la RLM *in vitro* se refiere a un método en el cual se añade un complejo siCD40/SPG a las células que dan positivo para CD11c separadas de los esplenocitos del ratón que responde al tratamiento, a continuación, las células se devolvieron a un grupo de células negativas para CD11 y luego se mezclaron con los esplenocitos del estimulador tratados con la mitomicina C (MMC), y se observó una reacción de RLM. Es decir, se fijó (o introdujo) un complejo dA40(s)-siRNA/SPG en las células deseadas con antelación, y se evaluó la inducción de la inmunodepresión en la reacción de RLM.

(8-A): Efecto inmunodepresor debido al complejo ácido nucleico-polisacárido en la RLM de precultivo con las células que dan positivo para CD11c

En esta prueba se comprobó si el complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG muestra o no una acción inmunodepresora.

Preparación de las células

Los esplenocitos se recogieron de ratones (Balb/c (machos de 9 semanas de edad, 2 ratones) y C57BL/6 (machos de 9 semanas de edad, 2 ratones)). Se añadieron hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se suspendieron en SBF al 10% (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) + RPMI (5 ml), y los esplenocitos del respondedor se trataron con mitomicina C (MMC) (25 µg de MMC añadida a 10^7 células finales).

Purificación de células que dan positivo para CD11c (marcación magnética)

Las células recogidas de los esplenocitos se ajustaron para tener 10^8 células/muestra y se suspendieron en una solución tamponada (400 µl). Se les añadieron 100 µl de microperlas con CD11c, y las células se dejaron reposar en refrigeración (2 a 8 °C) durante 15 minutos.

Separación magnética

Se enjuagó una columna con una solución tamponante (tampón MACS: EDTA a 2 mM, SAB al 0,5% en PBS (1×) desgasificado después de la preparación), se vertieron con una pipeta 500 µl de una suspensión de células marcadas magnéticamente y se dejó efluir. Se recogió el líquido que había efluido y se utilizó como células CD11c(-).

Procedimiento de la adición de grupos del complejo

Las células que dan positivo para CD11c que se recogieron se dividieron para quedar a $1,0 \times 10^5$ células/condición. A esto se le añadió el siCD40 desnudo y un complejo siCD40/SPG para tener una concentración final de 100 nM, y las células se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Se utilizaron en la RLM 5×10^5 células (esplenocitos) del respondedor y 5×10^5 células del estimulador (una mezcla de $2,5 \times 10^4$ células que dan positivo para CD11c y $4,75 \times 10^5$ células que dan negativo para CD11c) a 5×. Las condiciones de la RLM se muestran en la tabla 10 que viene a continuación.

Tabla 10

Condiciones de la RLM	
	Muestra
1	RLM alógena en Balbc / C57BL6 CD11c (-/+) de control
2	RLM alógena en Balbc / C57BL6 CD11c (-/+) con dA40(s)-siCD40 desnudo a 10 nM
3	RLM alógena en Balbc / C57BL6 CD11c (-/+) con complejo dA40(s)-siCD40/SPG a 10 nM
* C57BL6 CD11c (-/+): La razón de mezcla de células CD11c(-) y células CD11c(+) era de CD11c(-):CD11c(+) = 95:5. * En la tabla, a menos que se especifique de otra manera, los esplenocitos del estimulador estaban tratados con MMC. * En la tabla, las células de RLM indicadas como (Balbc / C57BL6) designan (cepa de ratón utilizado como respondedor para los linfocitos / cepa de ratón utilizados como respondedor para los linfocitos). * En la tabla, siCD40 tiene la secuencias de bases mostradas en las SEQ ID n.os 7 y 8.	

Los resultados se muestran en la figura 2. En la figura 2 se muestra la inhibición de la recuperación de la proliferación mediante una alorreacción. No se observó ninguna proliferación celular cuando todos los esplenocitos de Balb/c y las células CD11c(-) separadas de las C57BL/6 se sometieron a la RLM. Por otra parte, cuando todos los esplenocitos de Balb/c y las células CD11c (-/+) separadas de C57BL/6 se sometieron a la RLM, se activó una reacción alógena y se recuperó una reacción de proliferación celular. En el caso en el que un complejo se puso en contacto con las células diana CD11c(+) y a continuación las células se mezclaron con las células CD11c(-) y se sometieron a RLM junto con esplenocitos de Balb, se inhibió la recuperación de la proliferación celular. Es decir, se demostró que las células que dan positivo para CD11c inducen la inmunodepresión en la RLM de precultivos.

(8-B): Dependencia de la dosis observada en la acción inmunodepresora debida al complejo ácido nucleico-polisacárido con el uso de células que dan positivo para CD11c

En este experimento, se comprobó si el complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG muestra o no una acción de inmunodepresión de una manera dependiente de la dosis. La preparación de las células se llevó a cabo del mismo modo que en (A) más arriba, con ratones (Balb/c (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones), C57BL/6 (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones)). De igual modo, la purificación y la separación magnética de las células que dan positivo para CD11c se llevó a cabo del mismo modo que en (A) más arriba. Las condiciones de la RLM se muestran a continuación en la tabla 11.

Tabla 11

Condiciones de la RLM	
	Muestra
1	RLM alógena (Balbc / C57BL6)
2	RLM singénica (C57BL6 / C57BL6)
3	RLM singénica (Balbc / Balbc)
4	RLM alógena (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) dA40(s)-siCD40(21 nt) desnudo a 10 nM
5	RLM alógena (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) dA40(s)-siCD40(21 nt) desnudo a 100 nM
6	RLM alógena (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a 10 nM
7	RLM alógena (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a 100 nM
8	RLM alógena (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a 400 nM
* En la tabla, a menos que se especifique de otra manera, las células del estimulador estaban tratadas con MMC. * En la tabla, las células para la RLM están indicadas como (cepa de ratón utilizado como estimulador para los linfocitos / cepa de ratón utilizado como respondedor para los linfocitos).	

Los resultados de la RLM se muestran en la figura 3. La figura 3 muestra que las células que dan positivo para CD11c inducen la inmunodepresión de una manera dependiente de la dosis en la RLM con precultivos.

Ejemplo 9

(9-A) RLM *in vitro*

En este experimento se evaluó el efecto inhibidor del crecimiento de linfocitos que presenta el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG administrado *in vitro.* El método de preparación de las células se describe a continuación.

Se recogieron los esplenocitos de los ratones (estimuladores: Balb/c (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones) y respondedores: C57BL/6 (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones)). Se les añadieron hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (3 ml de hemolizante, 2 min). Se le añadieron 8 ml de RPMI y la mezcla se centrifugó a 300 × *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró con un aspirador y se añadieron 10 ml de RPMI para suspender las células. Se repitieron la centrifugación y los posteriores procedimientos. Se retiró el sobrenadante con un aspirador, luego se suspendieron las células en 5 ml de SBF al 10%/RPMI y se contó el número de células. Los esplenocitos del estimulador se trataron con mitomicina C (MMC) (37 °C, 30 min) (25 µg de MMC se añadieron a las 10^7 células finales). Después del tratamiento con MMC, las células se suspendieron en 10 ml de RPMI y se centrifugaron a 300 × *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró con un aspirador, se añadieron 10 ml de RPMI y se repitieron 4 veces la centrifugación y los posteriores procedimientos. El sobrenadante se retiró con un aspirador, entonces las células se suspendieron en 3 ml de SBF al 10%/RPMI, se contó el número de células y se ajustó la concentración celular para ser 5 × 10^6 células/ml. El complejo (o siMOCK) se añadió a los esplenocitos (5 × 10^6 células para cada condición) del respondedor para tener una concentración final de 10 nM, y las células se cultivaron durante 4 horas a 37 °C. Después del cultivo, se añadieron 10 ml de RPMI al líquido celular para suspender las células, y las células se centrifugaron a 300 × *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró con un aspirador, se añadieron 10 ml de RPMI y se repitieron 2 veces la centrifugación y los posteriores procedimientos. Las células se suspendieron en 1 ml de SBF al 10%/RPMI, se contó el número de células y la concentración celular se ajustó para ser 5 × 10^6 células/ml. Se mezclaron en un pocillo (un volumen final de 200 ml/pocillo) 5 × 10^5 células del estimulador y 5 × 10^5 células del respondedor, y las células se cultivaron a 37 °C en un entorno de CO_2 al 5% durante 72 horas. Después del cultivo, se midió el crecimiento celular mediante un ensayo que utiliza la quimioluminiscencia mediante la captación de BrdU (Cell Proliferation ELISA, BrdU) (Roche Applied Science).

También se llevó a cabo la RLM *in vitro* en la que los esplenocitos del estimulador se trataron con un siRNA. Se llevó

a cabo el procedimiento descrito, excepto que el tratamiento de las células del estimulador con siRNA se realizó después del tratamiento con MMC y que las células del respondedor después del recuento celular se conservaron en refrigeración sin tratarse hasta el comienzo de la RLM. Las condiciones de la RLM se muestran en la tabla 12.

Tabla 12

Condiciones de la RLM (caso en el que la muestra se añade a los esplenocitos del respondedor).	
	Muestra
1	RLM singénica (C57BL6/C57BL6)
2	RLM alógena (Balbc/C57BL6)
3	RLM alógena (Balbc/C57BL6) complejo dA40(s)-siCD40/SPG a 10 nM
4	RLM alógena (Balbc/C57BL6) siMOCK (PBS)
Condiciones de la RLM (caso en el que la muestra se añade a los esplenocitos del estimulador).	
	Muestra
1	RLM singénica (C57BL6/C57BL6)
2	RLM alógena (Balbc/C57BL6)
3	RLM alógena (Balbc/C57BL6) complejo dA40(s)-siCD40/SPG a 10 nM
4	RLM alógena (Balbc/C57BL6) siMOCK (PBS)
5	RLM alógena (Balbc/C57BL6) SPG solo (equivalente al siRNA del complejo a 10 nM)
6	RLM alógena (Balbc/C57BL6) con dA40(s)-siCD40 desnudo a 10 nM

Se confirmó a partir de los resultados que, en la RLM de las células del respondedor tratadas con el complejo dA40(s)-siCD40/SPG, el crecimiento celular era aproximadamente el 60% del crecimiento celular con el siMock de control, y en la RLM de las células del estimulador tratadas con el complejo dA40(s)-siCD40/SPG, el crecimiento celular era aproximadamente el 50% del crecimiento celular con el siMock de control. Es decir, se confirmó que, independientemente de que se haga sobre los esplenocitos del estimulador o de los esplenocitos del respondedor, la adición del complejo dA40(s)-siCD40/SPG inhibe la respuesta de RLM alógena al nivel de la respuesta de la RLM singénica. Está claro a partir de estos hechos que el complejo dA40(s)-siCD40/SPG inhibe significativamente la activación de los linfocitos.

(9-B) RLM *ex vivo*

En este experimento, el comportamiento del siRNA en un organismo vivo se examinó mediante la administración de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a ratones respondedores mediante una inyección en la vena caudal (i.v.), la recogida de los esplenocitos después de un intervalo de 4 horas, y la realización de la RLM con esplenocitos de ratones estimuladores. El método de preparación de las células se describe a continuación.

Se recogieron los esplenocitos de los ratones (estimuladores: Balb/c (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones) y respondedores: C57BL/6 (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones)). Un complejo siRNA/SPG se inyectó por vía intravenosa en los ratones respondedores 4 horas antes de recoger los esplenocitos. Se añadieron hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se suspendieron en 5 ml de SBF al 10% (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) + RPMI (4×10^5 células/pocillo), y los esplenocitos del estimulador se trataron con mitomicina C (MMC) (25 µg de MMC añadida a 10^7 células finales). Las condiciones de la RLM se muestran a continuación en la tabla 14.

Tabla 13

Condiciones de la RLM	
	Muestra
1	Medio
2	RLM alógena Balbc (MMC)/ B6 (PBS)
3	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. de SPG)
4	RLM alógena Balbc (MMC) B6 (20 µg i.v. de dA40(s)-siCD40(21 nt) desnudo)
5	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG)
6	RLM singénica B6 (PBS i.v.) / B6 (PBS i.v.)

Los resultados se muestran en la figura 4. En la figura 4, el valor (actividad de los esplenocitos) obtenido por la sustracción del valor numérico de la reacción singénica restado del valor numérico de la reacción alógena de un control (valor obtenido por sustracción del número de células de la muestra 2 restado del número de células de la muestra 6) se representa gráficamente como el 100%, y se muestra la magnitud de la inhibición ejercida por la administración del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG sobre la reacción proliferativa de los linfocitos de resultas de la reacción alógena. Está claro de los resultados que el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibe significativamente la activación de los linfocitos por la administración en un organismo vivo.

Ejemplo 10: Captación celular específica por las células que expresan de la dectina-1

En este experimento, se evaluó la captación específica de un complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa™ 647 en las células que expresan la dectina-1. El método de análisis se describe a continuación.

Una cámara de 4 pocillos se revistió con colágeno de tipo I-P. A continuación, se le añadieron 500 µl de células HEK 293T y células dHEK a una concentración de 1×10^5 células/ml, y se cultivaron durante una noche (37 °C, CO_2 al 5%). A continuación, el medio de cultivo fue reemplazado para añadir un medio de cultivo que contenía un complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa™ 647 a 10 nM o 100 nM, y las células se incubaron durante 2 a 8 horas a 37 °C en CO_2 al 5%. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído equilibrado al 10%. Las células fijadas se observaron con un microscopio confocal con láser (Carl Zeiss LSM710 NLO System) y se midió por citometría de flujo la intensidad de la fluorescencia del Alexa™ 647 mostrada por las células. Además, el nivel de la dectina-1 expresada en la superficie de las células fijadas se midió mediante citometría de flujo con un anticuerpo marcado con FITC.

Obsérvese que las células HEK 293T utilizados en este experimento son células epiteliales de riñón embrionario de humano que no expresan la dectina-1, y las células dHEK son las células HEK 293T que se han transformado para que expresen la dectina-1.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5 y 6. La figura 5 muestra imágenes de células tratadas con el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa™ 647, la figura 6A muestra los resultados de medir la intensidad de la fluorescencia de Alexa™ 647 emitida por las células tratadas con dA40(s)-siLuc(21 nt) marcado con Alexa™ 647, y la figura 6B muestra los resultados de medir la intensidad de la fluorescencia de FITC emitida por las células tratadas con el dA40(s)-siLuc(21 nt) marcado con Alexa™ 647. Está claro a partir de los resultados que la captación del complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa™ 647 se confirma solo en las células dHEK que expresan la dectina-1, y que el complejo ácido nucleico-polisacárido de la presente invención es captado por endocitosis en las células que expresan la dectina-1. De igual forma, está claro que el nivel de dectina-1 en las células dHEK disminuye a medida que se capta el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG, y así la dectina-1 la captan las células junto con el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG.

Ejemplo 11

(11-A)

En este experimento se examinó el comportamiento de siRNA en un organismo vivo mediante la administración de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a ratones respondedores por una inyección en la vena caudal (i.v.), la

recogida de los esplenocitos después de un intervalo de 4 horas, y la realización de la RLM con esplenocitos de ratones estimuladores. El método de preparación de las células se describe a continuación.

Se recogieron los esplenocitos de los ratones (estimuladores: Balb/c (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones) y respondedores: C57BL/6 (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones)). Un complejo siRNA/SPG se inyectó por vía intravenosa en los ratones respondedores 4 horas antes de recoger los esplenocitos. Se añadieron hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se suspendieron en 5 ml de SBF al 10% (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) + RPMI (4 x 10^5 células/pocillo), y los esplenocitos del estimulador se trataron con mitomicina C (MMC) (25 µg de MMC añadidos a 10^7 células finales). Las condiciones de la RLM se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14

Condiciones de la RLM	
	Muestra
1	Medio
2	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (PBS)
3	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. del complejo dA40(s)/SPG)
4	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG)
5	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. del complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG)
6	RLM singénica B6 (PBS i.v.) / B6 (PBS i.v.)

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. En la figura 7, el valor (actividad de los esplenocitos) obtenido por la sustracción del valor numérico de la reacción singénica restado del valor numérico de la reacción alógena de un control (valor obtenido por sustracción del número de células de la muestra 2 restado del número de células de la muestra 6) se representa gráficamente como el 100%, y se muestra la magnitud de la inhibición ejercida por la administración del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG sobre la reacción proliferativa de los linfocitos de resultas de la reacción alógena. Está claro a partir de los resultados que el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibe significativamente la activación de los linfocitos cuando se administra *in vivo*.

(11-B)

En este experimento se examinó el comportamiento del siRNA en un organismo vivo mediante la administración de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG tanto a ratones respondedores como a ratones estimuladores por una inyección en la vena caudal (i.v.), la recogida de los esplenocitos después de un intervalo de 12 horas, y la realización de la RLM con esplenocitos de ratones estimuladores. El método de preparación de las células se describe a continuación.

Se recogieron los esplenocitos de los ratones (estimuladores: Balb/c (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones) y respondedores: C57BL/6 (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones)). Un complejo siRNA/SPG se inyectó por vía intravenosa en los ratones estimuladores y en los ratones respondedores 12 horas antes de recoger los esplenocitos. Se añadieron hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se suspendieron en 5 ml de SBF al 10% (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) + RPMI (4 x 10^5 células/pocillo), y los esplenocitos del estimulador se trataron con mitomicina C (MMC) (25 µg de MMC añadidos a 10^7 células finales). Las condiciones de la RLM se muestran en la tabla 15.

Tabla 15

Condiciones de la RLM	
	Muestra
1	Medio

Condiciones de la RLM	
	Muestra
2	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (PBS)
3	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. del complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG)
4	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. de dA40(s)-siCD40(21 nt) y SPG presentes en soluciones diferentes)
5	RLM alógena Balbc (MMC) / B6 (20 µg i.v. del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG)
6	RLM singénica B6 (PBS i.v.) / B6 (PBS i.v.)

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8. En la figura 8, el valor (actividad de los esplenocitos) obtenido por la sustracción del valor numérico de la reacción singénica restado del valor numérico de la reacción alógena de un control (valor obtenido por sustracción del número de células de la muestra 2 restado del número de células de la muestra 6) se representa gráficamente como el 100%, y se muestra la magnitud de la inhibición ejercida por la administración del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG sobre la reacción proliferativa de los linfocitos de resultas de la reacción alógena. Se confirmó también a partir de los resultados que, al igual que con los resultados de (9-A) de más arriba, el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibe significativamente la activación de los linfocitos por la administración *in vivo.*

Ejemplo 12

Los esplenocitos se recogieron de ratones Balb/c. Las células se inocularon en una placa de 24 pocillos a una cantidad de 5×10^6 células/pocillo y se les añadió un medio de cultivo de RPMI que contiene SBF al 10% para alcanzar 1 ml/pocillo. Un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG (300 ng/pocillo en términos de siRNA) que utilizó el SPG con la modificación de la cadena lateral por biotinilación, o se añadió una muestra de control que contenía PBS como siMock a la placa, y se cultivó en una incubadora de CO_2 (37 °C) durante una noche. El medio de cultivo se retiró por succión, a continuación, se resuspendieron las células en Tris-HCl a 10 mM (pH 7,5) que contenía NaCl a 100 mM y EDTA a 1 mM, y se rompieron durante 15 s con un sonicador, se le añadieron 50 ml de partículas magnéticas marcadas con estreptavidina (Roche Applied Science, n.º de catálogo 11641778001) y se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras se agitaba. Se centrifugó para recoger un precipitado, el precipitado resultante se resuspendió en 100 µl de un tampón con dodecilsulfato de sodio (SDS), se sometió a electroforesis en poliacrilamida con SDS y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, la detección de TRBP2 se llevó a cabo con un anticuerpo de ratón anti-TRBP2 y un anticuerpo contra la IgG de ratón unido a peroxidasa.

Como resultado, se encontró que dA40(s)-siCD40(21 nt) que está en forma de complejo con SPG es una forma de complejo con TRBP2.

Ejemplo 13

Se estudió el efecto de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG en aloinjertos cardíacos mediante el uso de ratones modelo de trasplante cardíaco heterotópico.

Más específicamente, se administró un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a través de la vena de la cola a ratones donantes (C57/BL10, macho) y ratones receptores (CBA, macho) a una dosis de 2 µg/cabeza. Las pautas de la dosificación se describen a continuación. Una única dosis de 2 µg/cabeza se administró al ratón donante 3 días antes (el día –3) y 1 día antes (el día –1) de la extirpación cardíaca, y una dosis única de 2 mg/cabeza se administró al ratón receptor 3 días antes (el día –3) y 1 día antes (el día –1) del trasplante del mismo modo. El día 0 se extirpó el corazón del ratón donante y el corazón se trasplantó quirúrgicamente de modo heterotópico en el ratón receptor. Después del trasplante, cada dosis única de 2 µg/cabeza de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG se administró adicionalmente a través de la vena de la cola al ratón receptor 1 día (día 1), 3 días (día 3), 5 días (día 5) y 7 días (día 7) después del trasplante de corazón. Después de finalizar la administración, se observó con el tiempo el latido del corazón del corazón trasplantado del ratón receptor. Además, como comparación, se realizaron de la misma manera que está descrito más arriba un ensayo donde se administró un complejo dA40(s)-siGAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)(21 nt)/SPG en vez del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG en la misma cantidad, y un ensayo donde no se administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. En la figura 9, «complejo siCD40/SPG» indica un complejo

dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG, y «complejo siGAPDH/SPG» indica un complejo dA40(s)-siGAPDH(21 nt)/SPG. Tal y como se puede observar de la figura 9, cuando se administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG, el latido del corazón trasplantado fue normal durante un largo periodo de tiempo en todos los ratones receptores después del trasplante, y la supervivencia de todos los ratones receptores se confirmó incluso 90 días después del trasplante. Por otra parte, cuando se administró el complejo dA40(s)-siGAPDH(21 nt)/SPG o no se administró nada, la tasa de supervivencia de los ratones receptores fue del 0% el día 10 después del trasplante.

Además, cuando se administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG solo a ratones donantes (C57/BL10, macho) a una dosis de 2 µg/cabeza, o se administró sólo a ratones receptores (CBA, macho) a una dosis de 2 µg/cabeza, se observó el latido del corazón trasplantado. Como resultado, el latido del corazón trasplantado se observó durante un largo periodo de tiempo incluso en el caso donde recibieron la administración solo los ratones donantes o solo los ratones receptores.

A partir de estos resultados, se cree que el dA40(s)-siCD40(21 nt) se introdujo con eficacia en las células presentadoras de antígeno para suprimir la expresión de CD40 de tal modo que se suprimió la activación de los linfocitos T específicos de antígeno.

Obsérvese que la secuencia de nucleótidos de siLuc y siCD40 utilizadas en los ejemplos 1 a 13 son como las que se muestran en la tabla 16 que viene a continuación.

Tabla 16

secuencia (5' → 3') de siLuc (21 nt)	Sentido	GGC CUU UCA CUA CUC CUA CGA	SEQ ID n.º 1
	Antisentido	GUA GGA GUA GUG AAA GGC CAG	SEQ ID n.º 2
secuencia (5' → 3') de siLuc (27 nt)	Sentido	CUG GCC UUU CAC UAC UCC UAC GAG CAC	SEQ ID n.º 3
	Antisentido	GUG CUC GUA GGA GUA GUG AAA GGC CAG	SEQ ID n.º 4
secuencia (5' → 3') de siCD40 (21 nt)	Sentido	GGA GGG CAC CGC AGA AUC AUU	SEQ ID n.º 5
	Antisentido	UGA UUC UGC GGU GCC CUC CUU	SEQ ID n.º 6
secuencia (5' → 3') de siCD40 (27 nt)	Sentido	AAG GAG GGC ACC GCA GAA UCA GAC ACU	SEQ ID n.º 7
	Antisentido	AGU GUC UGA UUC UGC GGU GCC CUC CUU	SEQ ID n.º 8

Listado de secuencias

<110> NapaJen Pharma, Inc.

<120> Complejo ácido nucleico/polisacárido

<130> PCT0013P

<150> PCT/JP2011/68265
<151> 2011-08-10

<150> JP2011-43310
<151> 2011-02-28

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena sentido de siLuc(21nt)

<400> 1
ggccuuucac uacuccuacg a 21

<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de siLuc(21nt)

<400> 2
guaggaguag ugaaaggcca g 21

<210> 3
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena sentido de siLuc(27nt)

<400> 3
cuggccuuuc acuacuccua cgagcac 27

<210> 4
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de siLuc (27nt)

<400> 4
gugcucguag gaguagugaa aggccag 27

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena sentido de siCD40(21nt)

<400> 5
ggagggcacc gcagaaucau u 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de siCD40(21nt)

<400> 6
ugauucugcg gugcccuccu u 21

<210> 7
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena sentido de siCD40(27nt)

<400> 7
aaggagggca ccgcagaauc agacacu 27

<210> 8
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena antisentido de siCD40(27nt)

<400> 8
agugucugau ucugcggugc ccuccuu 27

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para CD40 de ratón

<400> 9
caaggattgc gaggcatgtg 20

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para CD40 de ratón

<400> 10
tgacagacgg tatcagtggt ctcag 25

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador directo para beta-actina de ratón

<400> 11
tggcacccag cacaatgaa 19

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador inverso para beta-actina de ratón

<400> 12

REIVINDICACIONES

1. Una preparación farmacéutica para uso para la supresión del rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante, en donde la preparación farmacéutica comprende

un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y

un polinucleótido que contiene un siRNA al cual se le añade polidesoxiadenina, en donde dicho siRNA es contra un factor coestimulador, y

la preparación farmacéutica es para uso en la administración intravenosa.

2. La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el siRNA es de 21 restos, y el polinucleótido contiene polidesoxiadenina que tiene enlaces fosfodiéster que están al menos parcialmente modificados como fosforotioatos y que está añadida a una hebra sentido del siRNA.

3. La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde al menos el 50% de los enlaces fosfodiéster de la polidesoxiadenina están como fosforotioatos.

4. La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el factor coestimulador es el que se expresa en una célula que expresa la dectina-1.

5. La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el factor coestimulador es cualquiera de CD40, B7.1 y B7.2.

6. La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el factor coestimulador es CD40.

7. La preparación farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento de trasplante es trasplante de riñón, trasplante de corazón, trasplante de pulmón, trasplante de médula ósea, trasplante de piel o trasplante de córnea.

8. Un complejo ácido nucleico-polisacárido de esquizofilano y un polinucleótido que contiene un siRNA al cual se le ha añadido polidesoxiadenina, en donde dicho siRNA es contra un factor coestimulador,

para ser usado para la supresión del rechazo que se produce en el tratamiento de trasplante en un animal que necesita el tratamiento o la profilaxis de la resistencia o rechazo a un órgano o tejido trasplantado,

en donde el complejo es para ser usado en la administración intravenosa.

Fig.1

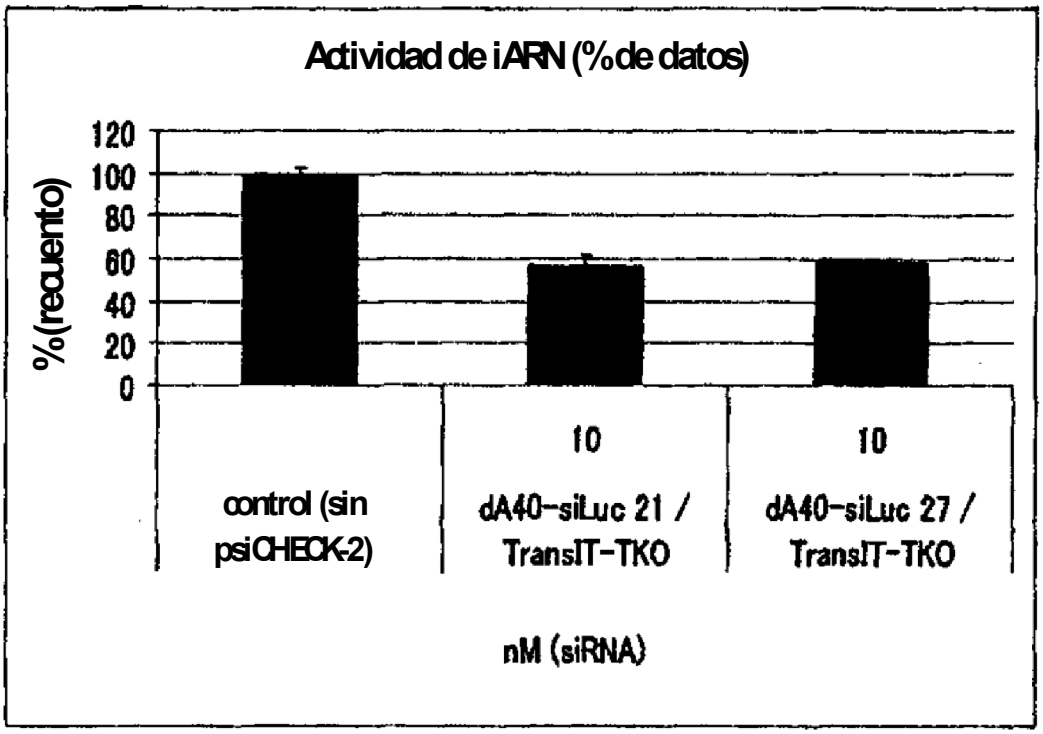

Actividad de iARN (%de datos)
%(recuento)
120
100
80
60
40
20
0
10
10
control (sin psiCHECK-2)
dA40-siLuc 21 / TransIT-TKO
dA40-siLuc 27 / TransIT-TKO
nM (siRNA)

Fig.2

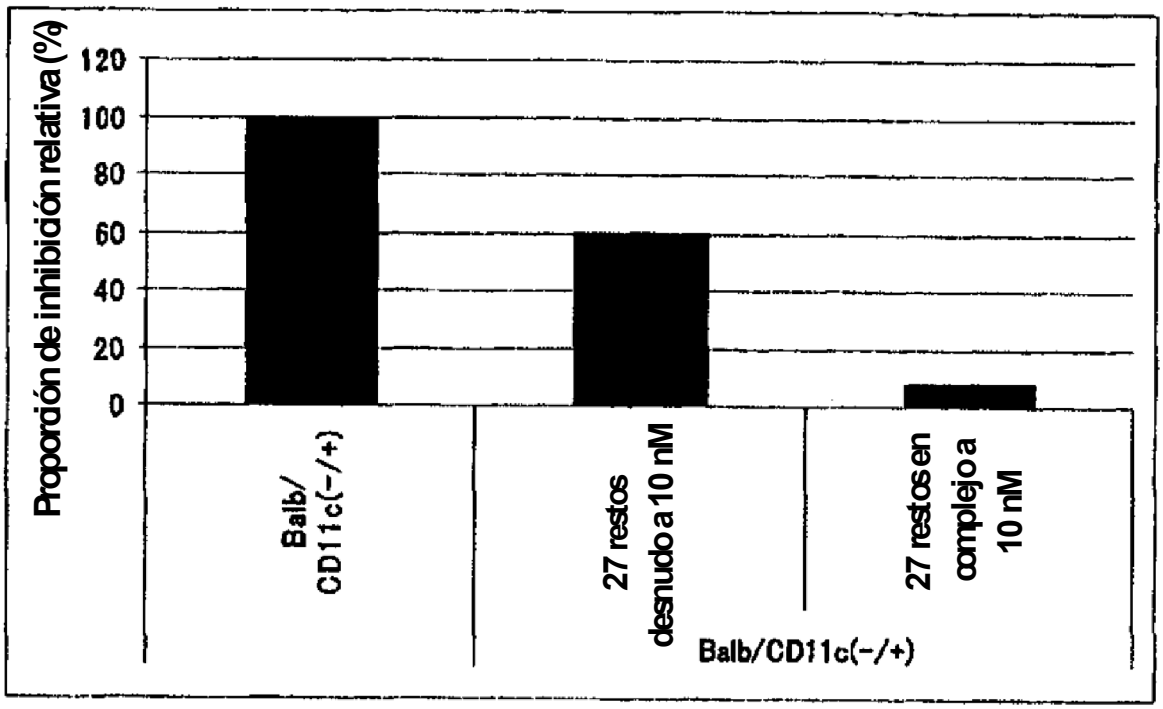

Proporción de inhibición relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
Balb/ CD11c(-/+)
27 restos desnudo a 10 nM
27 restos en complejo a 10 nM
Balb/CD11c(-/+)

Fig.3

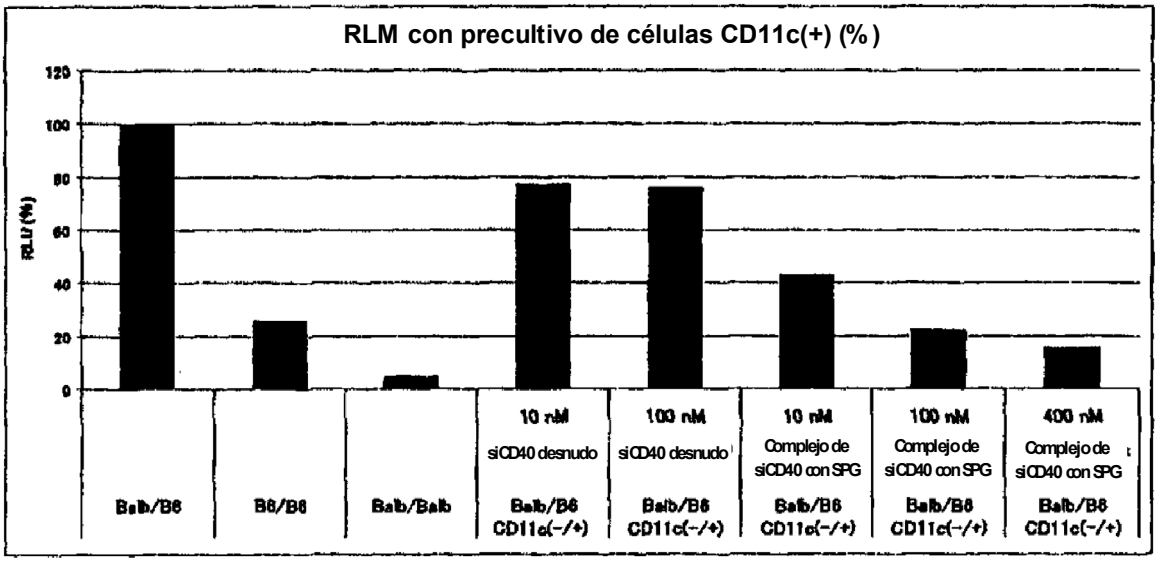

RLM con precultivo de células CD11c(+) (%)
RLU (%)
120
100
80
60
40
20
0
Balb/B6
B6/B6
Balb/Balb
10 nM siCD40 desnudo
100 nM siCD40 desnudo
10 nM Complejo de siCD40 con SPG
100 nM Complejo de siCD40 con SPG
400 nM Complejo de siCD40 con SPG
Balb/B6 CD11c(-/+)

Fig.4

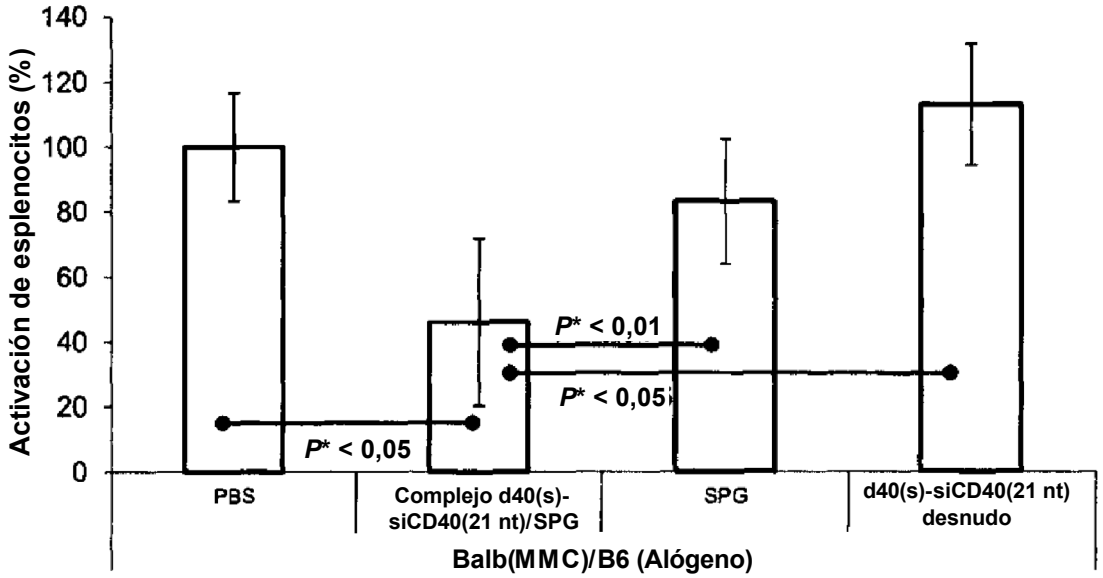

Activación de esplenocitos (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
P* < 0,01
P* < 0,05
P* < 0,05
PBS
Complejo d40(s)-siCD40(21 nt)/SPG
SPG
d40(s)-siCD40(21 nt) desnudo
Balb(MMC)/B6 (Alógeno)

Fig.5

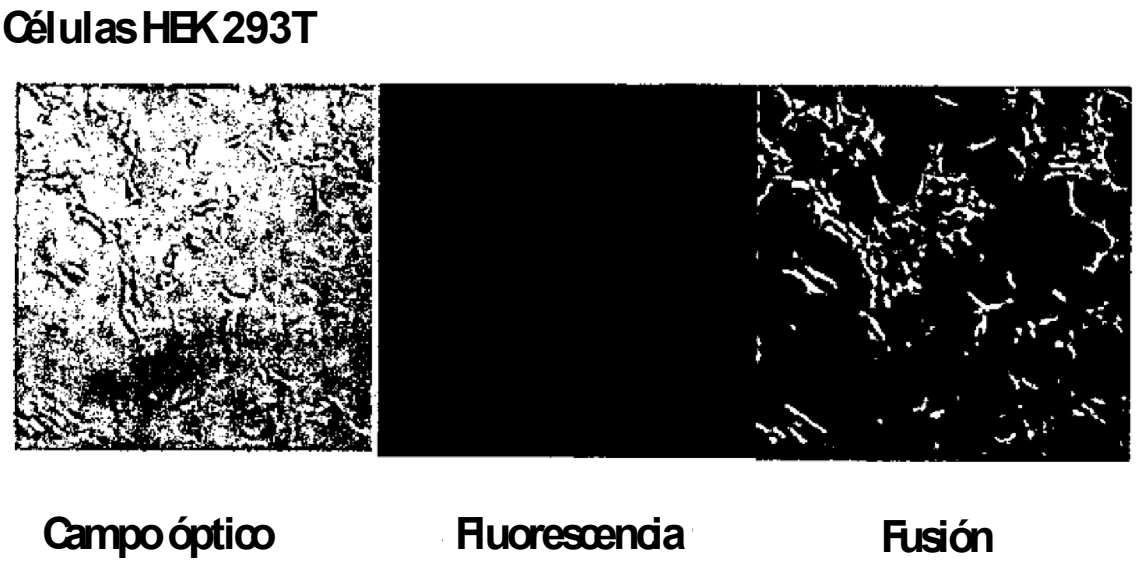
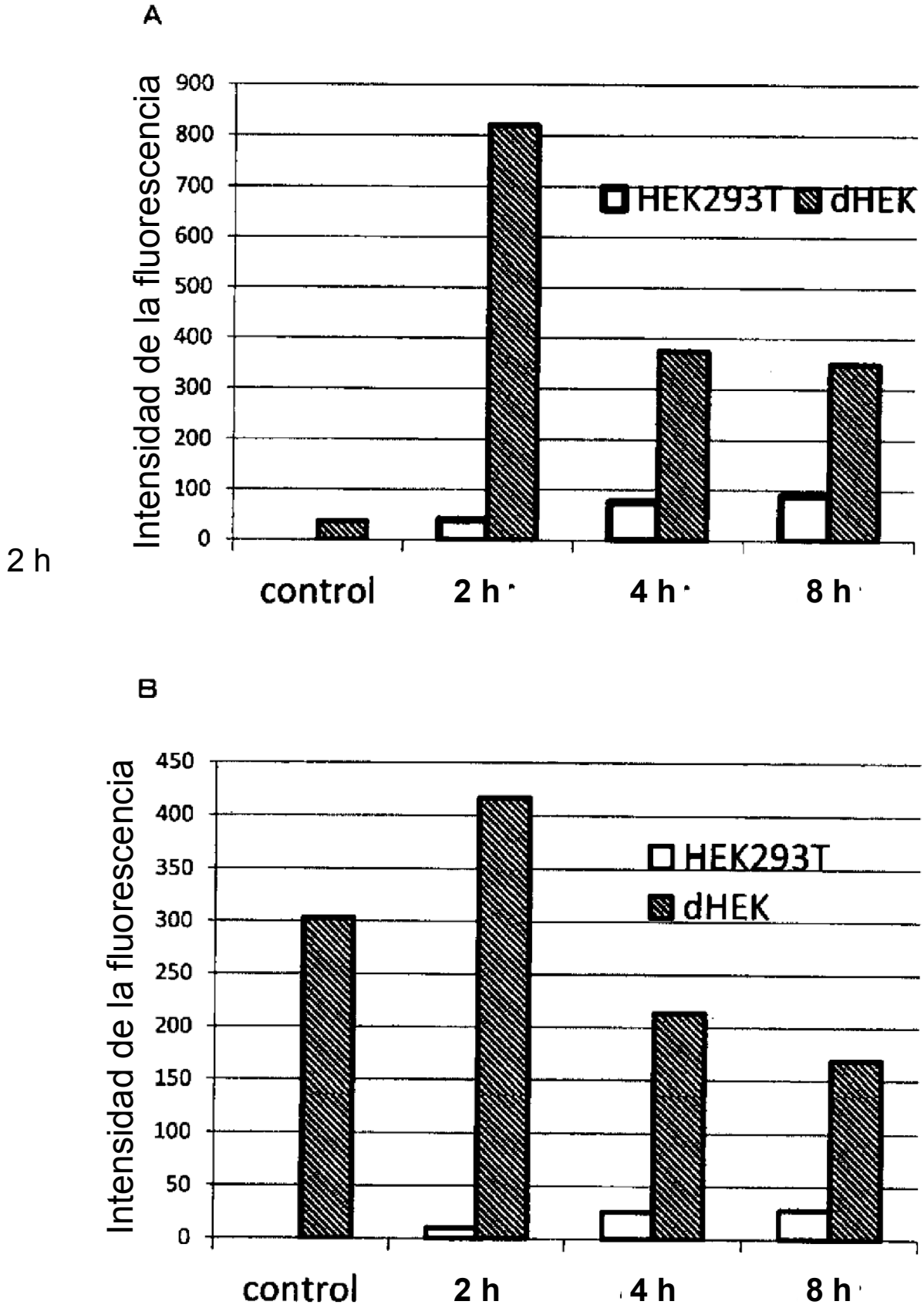

Células HEK 293T
Campo óptico
Fluorescencia
Fusión
Células dHEK
Campo óptico
Fluorescencia
Fusión

Fig.6


A
Intensidad de la fluorescencia
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
HEK293T
dHEK
control
2 h
4 h
8 h
B
Intensidad de la fluorescencia
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
HEK293T
dHEK
control
2 h
4 h
8 h

2 h

Fig.7

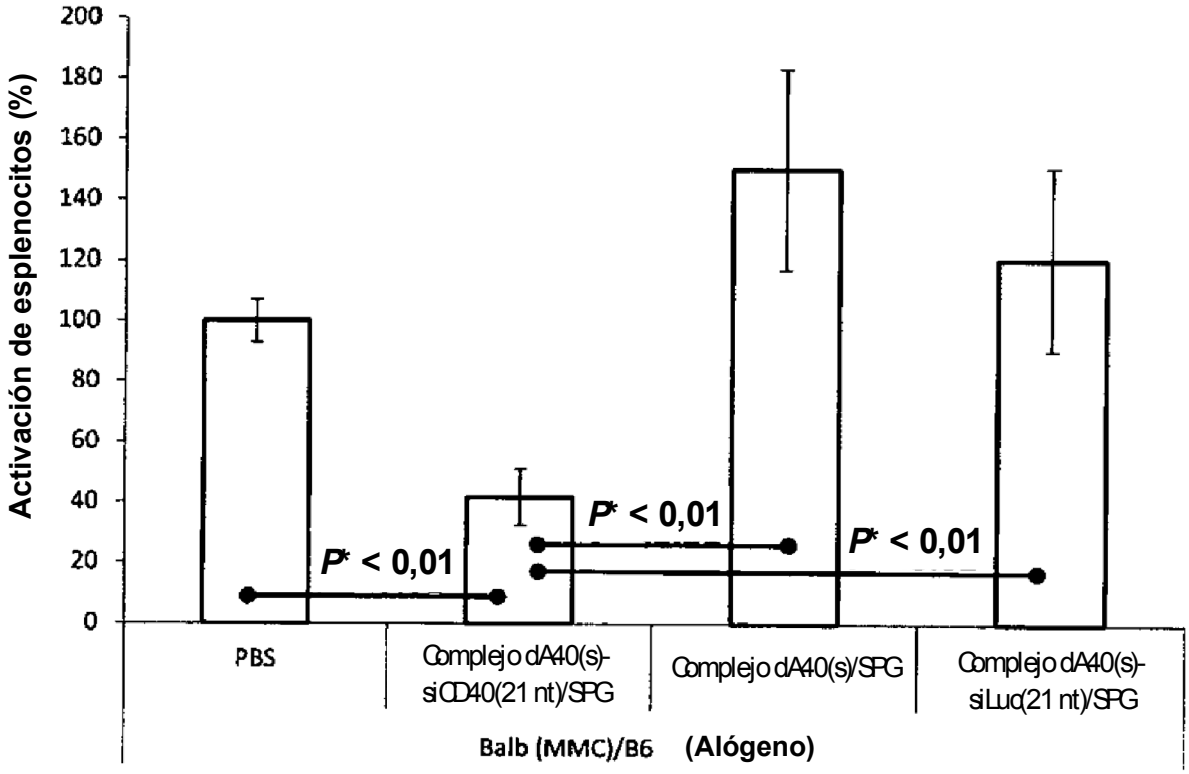

Activación de esplenocitos (%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
P* < 0,01
P* < 0,01
P* < 0,01
PBS
Complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG
Complejo dA40(s)/SPG
Complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG
Balb (MMC)/B6 (Alógeno)

Fig.8

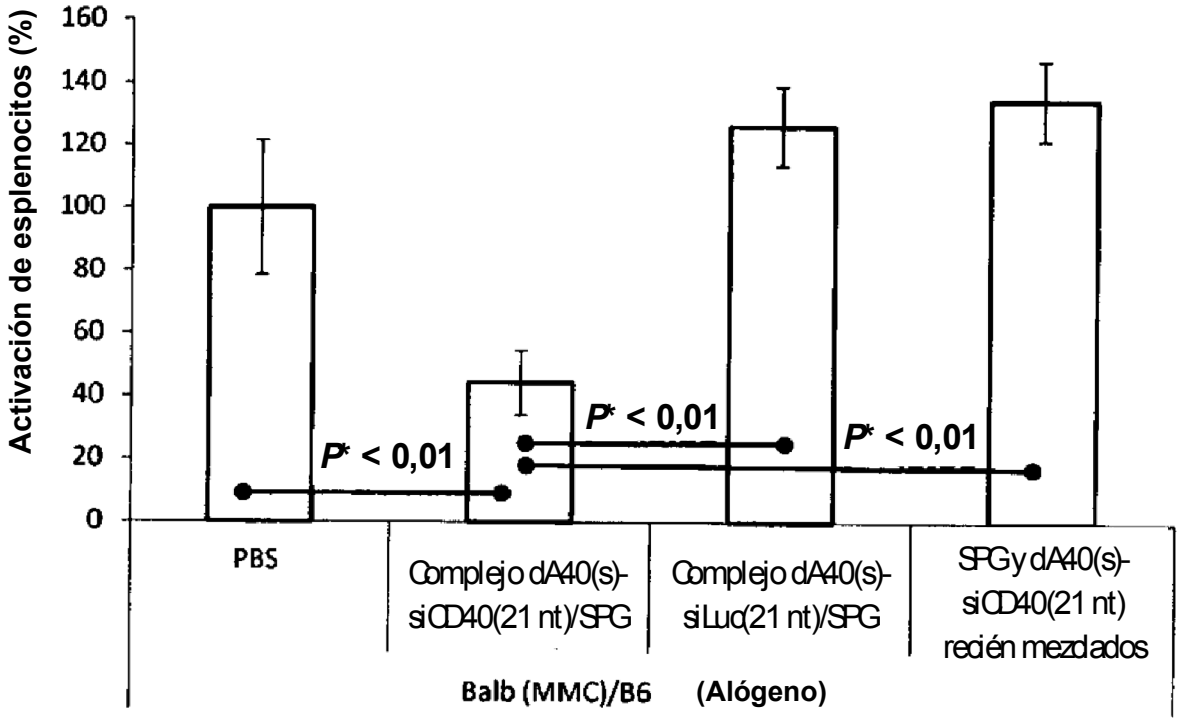
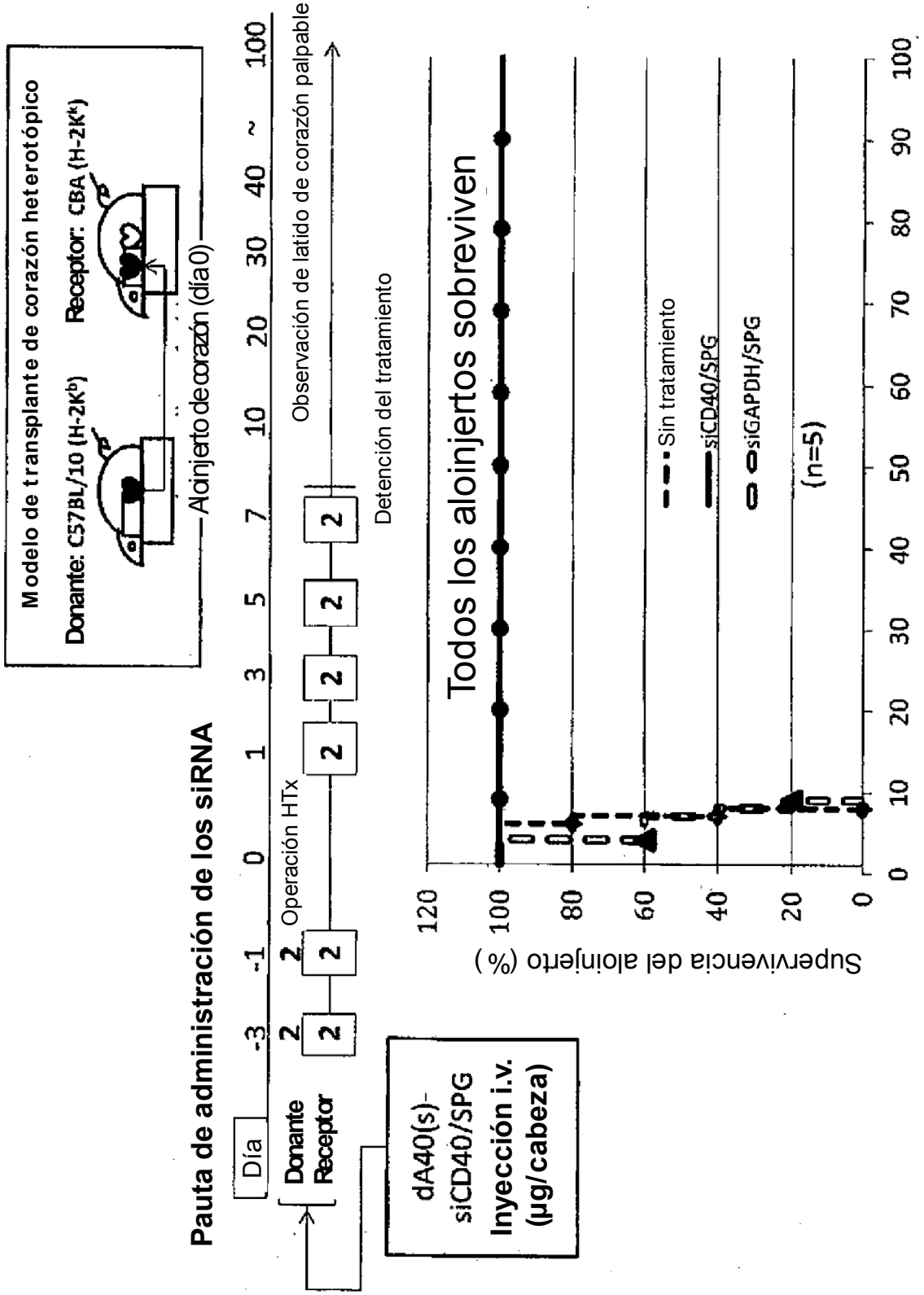

Activación de esplenocitos (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
P* < 0,01
P* < 0,01
P* < 0,01
PBS
Complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG
Complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG
SPG y dA40(s)-siCD40(21 nt) recién mezclados
Balb (MMC)/B6 (Alógeno)

Fig.9


Modelo de transplante de corazón heterotópico
Donante: C57BL/10 (H-2K^b)
Receptor: CBA (H-2K^k)
Aloinjerto de corazón (día 0)
Pauta de administración de los siRNA
Día
Donante
Receptor
Operación HTx
Detención del tratamiento
Observación de latido de corazón palpable
dA40(s)-siCD40/SPG
Inyección i.v. (μg/cabeza)
Todos los aloinjertos sobreviven
Sin tratamiento
siCD40/SPG
siGAPDH/SPG
(n=5)
Supervivencia del aloinjerto (%)
Tiempo (día)