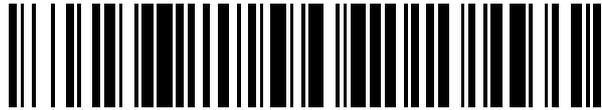


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 969**

51 Int. Cl.:

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: **13.07.2012 PCT/JP2012/067950**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13021784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2012 E 12822876 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2742944**

54 Título: **Inductor de tolerancia inmune**

30 Prioridad:

10.08.2011 WO PCT/JP2011/068265
15.02.2012 WO PCT/JP2012/053583

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2018

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

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 684 969 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inductor de tolerancia inmune.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un agente inductor de tolerancia inmunológica que contiene un complejo de ácido nucleico-polisacárido de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano. La presente invención también se refiere a un método para inducir tolerancia inmune inhibiendo la expresión génica de un factor coestimulador que usa el complejo de ácido nucleico-polisacárido para controlar la función de la célula que expresa Dectina-1 como una célula dendrítica, y a un medicamento para usar en el método. Especialmente, la presente invención se refiere a un medicamento que contiene un complejo de ácido nucleico-polisacárido de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano, que inhibe el rechazo que se da en el trasplante de órganos e induce tolerancia inmune.

Antecedentes de la técnica

15 La interferencia del ARN (ARNi) descubierta en 1998 tiene una eficacia y persistencia marcadamente superior a los métodos antisentido convencionales y es un método revolucionario de inhibición de la expresión génica, y por lo tanto, ha habido una esperanza para sus aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, un ARN de doble cadena (es decir, siRNA) que presenta una actividad ARNi se descompone frecuentemente durante el proceso desde la administración hasta la captación en una célula diana o se descompone en una célula, y ha sido difícil formar un complejo RISC, es decir, su sustancia activa, en una célula. Por consiguiente, aunque es un método de inhibición de la expresión génica superior, no se puede obtener un efecto suficiente, y por lo tanto aún no está disponible un producto farmacéutico que usa un siRNA.

20 Los siRNAs no modificados se descomponen por nucleasas que está presente en, por ejemplo, sangre, y algunos siRNAs no modificados demuestran un efecto ARNi en una célula diana. Por consiguiente, se han realizado varias modificaciones químicas para dar resistencia a nucleasas en los siRNAs. Sin embargo, se necesita una dosis alta para una introducción eficaz en una célula. También, se sabe que dado que la administración de un nucleótido de doble cadena en un cuerpo vivo a una dosis alta mejora una reacción inmune natural, aparece un efecto no esperado, es decir, una reacción inmunoestimuladora. Por consiguiente, es necesaria una técnica de distribución que introduzca específicamente un siRNA en una célula diana. Se han desarrollado técnicas para distribución de siRNA, técnicas para englobar un siRNA, como liposomas y nanomicelas macromoleculares. Sin embargo, en términos de tropismo hacia la diana, estas técnicas de distribución aún están en el sentido del direccionamiento pasivo, y con el fin de superar esta deficiencia, se necesita un procedimiento para impartir, por ejemplo, una molécula que se une a la célula diana a un fármaco siRNA.

30 Con tal técnica convencional como antecedente, existe una demanda para el direccionamiento positivo y una técnica de distribución para que un siRNA muestre significativamente una actividad ARNi dentro de la célula diana. Por consiguiente, como un método de distribución de un siRNA a una célula dendrítica, se ha propuesto un complejo de esquizofilano y un siRNA añadido a polidesoxiadenina (véase Literatura de Patente 1).

35 Mientras tanto, se ha establecido la terapia de trasplante, en la que una célula, tejido u órgano donante se trasplanta a un paciente con fallo orgánico, malignidad hematológica o similares, y se ha vuelto una terapia crucial en la práctica clínica. En la terapia de trasplante, sin embargo, aún se demanda una mejora técnica para inhibir la reacción inmune específica de donante en un receptor. Previamente, para prolongar la supervivencia del órgano trasplantado en el trasplante de órganos, se han hecho intentos de bloquear la vía CD40-CD40L o la vía CD28-B7 mediante varios anticuerpos, pero no se ha encontrado técnica que sea capaz de la inducción eficaz de tolerancia específica de donante y de ponerla en uso práctico (Véase Literaturas de No Patentes 2 y 3).

Lista de documentos citados

Literatura de No Patentes

[LNP1] Bull. Chem. Soc. Jpn., 77, 1101-1110 (2004)

45 [LNP2] Exp. Neurol. 2004 Mar; 186(1): 59-69

[LNP3] Transplantation 2003; 75(5): 637-643

Literatura de Patentes

[LPT1] WO 2009/078470

Compendio de la invención

50 Problema técnico

Un objetivo primario de la presente invención es proporcionar un medicamento y un método para inducir eficazmente

tolerancia inmune específica de donante en un receptor en terapia de trasplante.

Solución al problema

Habiendo llevado a cabo una investigación diligente para solucionar los problemas anteriores, los inventores encontraron que, sorprendentemente, se puede distribuir un complejo de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano a una célula que expresa Dectina-1 que reconoce específicamente esquizofilano para regular la función de la célula que expresa Dectina-1, y por lo tanto puede inducir eficazmente un efecto inmunosupresor así como tolerancia inmune. En realidad, los inventores encontraron que en un modelo de trasplante cardiaco que usa un complejo de un siRNA para CD40 y esquizofillano, el complejo exhibe un efecto de tolerancia inmune altamente excelente. Basado en estos hallazgos, los inventores llevaron a cabo investigación adicional y llegaron a la presente invención.

La presente invención proporciona, por ejemplo, un agente que induce tolerancia inmunológica y un método para inducir tolerancia inmune como sigue.

Ítem 1. Un agente que induce tolerancia inmunológica usado para inducir tolerancia inmune específica de donante en un receptor en terapia de trasplante de una célula, tejido u órgano donante, que contiene un complejo de ácido nucleico-polisacárido de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano.

Ítem 2. El agente que induce tolerancia inmunológica de acuerdo con el Ítem 1, en donde la polidesoxiadenina se añade a al menos un extremo de una cadena sentido y una cadena antisentido del siRNA.

Ítem 3. El agente que induce tolerancia inmunológica de acuerdo con el Ítem 2, en donde al menos una porción de los enlaces fosfodiéster de la polidesoxiadenina ha reaccionado con fosforotioato.

Ítem 4. El agente que induce tolerancia inmunológica de acuerdo con cualquiera de los Ítems 1 a 3, en donde la célula, tejido u órgano donante es una célula derivada de médula ósea.

Ítem 5. El agente que induce tolerancia inmunológica de acuerdo con cualquiera de los Ítems 1 a 5, en donde el factor coestimulador es el expresado en la célula que expresa Dectina-1.

Ítem 6. El agente que induce tolerancia inmunológica de acuerdo con cualquiera de los Ítems 1 a 5, en donde el factor coestimulador es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en CD40, B7.1 y B7.2.

Ítem 7. El agente que induce tolerancia inmunológica de acuerdo con cualquiera de los Ítems 1 a 5, en donde el factor coestimulador es CD40.

Ítem 8. El agente que induce tolerancia inmunológica de acuerdo con cualquiera de los Ítems 1 a 7, en donde la terapia de trasplante es trasplante de riñón, trasplante de corazón, trasplante de pulmón, trasplante de médula ósea, trasplante de piel, o trasplante de córnea.

Ítem 9. Un método para inducir tolerancia inmune en terapia de trasplante, que comprende una etapa de administrar un complejo de ácido nucleico-polisacárido de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano a un animal que necesite tolerancia inmune para una célula, órgano o tejido donante.

Ítem 10. El uso de un complejo de ácido nucleico-polisacárido de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano para la fabricación de un agente que induce tolerancia inmunológica usado para inducir tolerancia inmune específica de donante en un receptor en terapia de trasplante de una célula, tejido u órgano donante.

Efecto de la invención

El agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención puede eficazmente inducir tolerancia específica de donante en un receptor que recibe una célula, tejido u órgano donante. Más particularmente, la presente invención puede introducir un siRNA para un factor coestimulador a una célula que expresa Dectina-1 en un receptor tratado o que es tratado mediante terapia de trasplante para inducir una actividad ARNi, y por lo tanto puede regular la función de la célula que expresa Dectina-1 para inducir tolerancia inmune en el receptor.

Además, el uso del agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención permite proporcionar una terapia en la que se puede inducir inmunosupresión mediante dosis bajas de medicamento siRNA. Especialmente, el uso del agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención permite inhibir eficazmente el rechazo en la terapia de trasplante.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 4, o es decir, un siRNA al que está unido la poli(dA) modificada en S puede producir un efecto de interferencia del ARN sin ser escindido mediante Dicer.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 8, es decir, la inhibición de la recuperación de la

proliferación mediante una alo-reacción.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 8, o es decir, células CD11c positivas con un complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG inducen inmunosupresión en MLR en pre-cultivo.

5 La FIG. 4 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 9 (9-B), o es decir, un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibió significativamente la activación de linfocitos en MLR *ex vivo*.

La FIG. 5 muestra imágenes que indican los resultados del Ejemplo 10, es decir, células T HEK 293 y células dHEK tratadas con un complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647.

10 La FIG. 6 muestra los resultados del Ejemplo 10. Es decir, con respecto a células T HEK 293 y células dHEK tratadas con un complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647, un gráfico que muestra los resultados de medir el nivel de captación del complejo (intensidad de fluorescencia de Alexa 647) (FIG. 6A) y un gráfico que muestra el nivel de expresión de Dectina-1 sobre la superficie celular (intensidad de fluorescencia de FITC) (FIG. 6B).

La FIG. 7 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 11 (11-A), o es decir, la administración de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibió significativamente la activación de linfocitos.

15 La FIG. 8 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 11 (11-B), o es decir, la administración de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibió significativamente la activación de linfocitos.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 13, o es decir, en un modelo de ratón de trasplante cardiaco heterotópico administrado con un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG, el latido cardiaco del corazón trasplantado es normal durante un largo periodo de tiempo y la tasa de supervivencia después del trasplante es alta.

20 La FIG. 10 muestra los resultados del Ejemplo 14 que estimaron un efecto de tolerancia inmune de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG mediante transferencia adoptiva en ratones modelo de trasplante cardiaco ectópico.

La FIG. 11 muestra los resultados del Ejemplo 15 que estimaron un efecto de tolerancia inmune de un complejo dA40(s)-siCD40(21nt)/SPG mediante MLR.

Descripción de las realizaciones

25 La presente invención es un agente que induce tolerancia inmunológica usado para la inducción de tolerancia inmune específica de donante en un receptor en terapia de trasplante de una célula, tejido u órgano donante, que contiene un complejo de ácido nucleico-polisacárido para un factor coestimulador y esquizofilano. De aquí en adelante, se describirá en detalle el agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención.

siRNA para el factor coestimulador

30 Una diana de siRNA usada en la presente invención puede ser un factor coestimulador (también conocido como molécula coestimuladora), y es preferible un factor coestimulador que se exprese en célula que expresa Dectina-1. La Dectina-1 es un receptor (receptor de reconocimiento de patrón) que tiene un dominio de reconocimiento de una cadena de azúcar de un tipo de leptina del tipo C presente en la membrana celular. La Dectina-1 tiene extracelularmente una región que reconoce específicamente β -1,3-glucano e intracelularmente tiene un motivo, llamado motivo 1 de activación basado en el inmuno-receptor de tirosinasa (ITAM), que lanza una señal de activación. Una vez que reconoce el β -1,3-glucano, la Dectina-1 facilita la producción de NF- κ B o una citoquina inflamatoria para inducir una respuesta de defensa biológica. En la presente invención, ejemplos de células que expresan Dectina-1 incluyen macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, y similares. Se sabe que el esquizofilano tiene un esqueleto de β -1,3-glucano, y se distribuye dentro de células que expresan Dectina-1 a través de una señal inducida cuando se une a Dectina-1 que está presente en la membrana celular de una célula que expresa Dectina-1. El complejo de ácido nucleico-polisacárido usado en la presente invención se lleva dentro de una célula que expresa Dectina-1 ya que el esquizofilano, que es un componente del complejo, es reconocido por Dectina-1. Un siRNA contenido en el complejo de ácido nucleico-polisacárido usado en la presente invención puede inducir eficazmente tolerancia inmune en un receptor seleccionando un factor coestimulador que se exprese en célula que expresa Dectina-1. Se ha descrito el uso de siRNA para reducir la expresión de factores coestimuladores en p. ej., EP2226384 (para CD40) y Motohiko et al (2010) JJIAO 28(3): 223-8 (para B7.2/CD86).

Ejemplos específicos de un factor coestimulador que se expresa en una célula que expresa Dectina-1 incluyen CD40, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) y similares. Ejemplos de un gen diana de siRNA usado en la presente invención incluye al menos uno de estos genes, y es particularmente adecuado un gen de CD40.

50 Se puede determinar de modo apropiado una secuencia de bases de "siRNA para un factor coestimulador" usada en la presente invención dependiendo de los tipos de un factor coestimulador diana. Un siRNA para un factor coestimulador puede incluir una secuencia que es 100% idéntica a una porción de la secuencia de bases del factor coestimulador diana, o puede incluir una secuencia en la que se reemplazan y/o añaden una o más bases en

relación a la secuencia 100% idéntica siempre que se obtenga el efecto de interferencia de ARN deseado.

En un ejemplo adecuado del siRNA para el factor coestimulador usado en la presente invención, la cadena sentido de ARN y la cadena antisentido de ARN están cada una compuestas de 21 ribonucleótidos, con un extremo colgante compuesto de 2 ribonucleótidos que se forma en el extremo 5' de la cadena sentido de ARN, así como en el extremo 5' de la cadena antisentido de ARN. Es decir, en el caso de tal doble cadena de ARN, los ribonucleótidos del primer al decimonoveno a partir del extremo 3' de la cadena de ARN antisentido son complementarios a los ribonucleótidos del tercer al duodécimoprimer a partir del extremo 5' de la cadena de ARN sentido. En esta memoria, tal siRNA de 21 mer también se denomina siRNA de tipo 21 mer. El siRNA de tipo 21 mer no es escindible por Dicer.

Un siRNA para un factor coestimulador puede ser uno que sea capaz de ser acomplejado con esquizofilano, por ejemplo, uno en el que una molécula capaz de ser acomplejada con esquizofilano (de aquí en adelante, también denominada como "molécula que une SPG") se adicione a al menos un extremo de una cadena sentido o una cadena antisentido que constituye un siRNA para un gen de un factor coestimulador.

La molécula que une SPG se puede unir directamente al ribonucleótido terminal de la cadena de ARN sentido y/o cadena de ARN antisentido del siRNA para un factor coestimulador o se puede unir a través de un enlazador (espaciador).

El número de moléculas que unen SPG que se añaden al siRNA no está particularmente limitado.

Un ejemplo preferido de siRNA al que se añade la molécula que une SPG es uno en el que el número de unión de molécula que une SPG con un siRNA es uno y la molécula que une SPG se une al extremo 5' de la cadena sentido del siRNA. Como se acaba de describir, en el caso donde se une solamente una molécula que une SPG al extremo 5' de la cadena sentido del siRNA, se puede activar significativamente un efecto de interferencia de ARN causado por el siRNA.

También en el caso de siRNA del tipo 21 mer, la molécula que une SPG se puede unir a cualquiera de las cadenas sentido/cadena antisentido y al extremo 5'/extremo 3', y en el caso donde la molécula que une SPG se une, en particular, al extremo 5' de la cadena sentido, se puede demostrar un efecto de interferencia de ARN superior.

No están particularmente limitados los tipos de molécula que une SPG mientras la molécula se acompleje con esquizofilano, y preferiblemente son ácidos nucleicos, más preferiblemente polidesoxiadenina (de aquí en adelante, también denominado como "poli(dA)"). Una cadena de poli(dA) y dos cadenas de esquizofilano pueden formar una conformación de triple hélice estable.

En el caso donde se usa poli(dA) como molécula que une SPG, no está particularmente limitado el número de desoxiadeninas que constituyen el poli(dA) mientras sea posible la formación del complejo con esquizofilano, como se describe más adelante, y puede ser, por ejemplo, 10-100, preferiblemente 20-100, más preferiblemente 20-80, aún más preferiblemente 30-50.

En el caso donde se usa poli(dA) como la molécula que une SPG, al menos una parte del enlace fosfodiéster del poli(dA) reacciona deseablemente con fosforotioato (modificado en S). La proporción de poli(dA) modificada en S es generalmente 50% o más, preferiblemente 80% o más, más preferiblemente 100%. En esta memoria, la proporción de poli(dA) modificado en S representa la proporción (%) de enlaces fosfodiéster modificados en S en relación al total de enlaces fosfodiéster de poli(dA). También, el enlace fosfodiéster modificado en S muestra una estructura de unión en la que un átomo de oxígeno del residuo de fosfato de la porción del enlace fosfodiéster se reemplaza por un átomo de azufre.

La modificación en S en un poli(dA) se puede realizar de acuerdo con un método conocido. La distribución de la modificación en S en el poli(dA) no está particularmente limitada, y se puede realizar la modificación en S sobre cualquier lugar.

El poli(dA) modificado en S forma un complejo favorable con esquizofilano, y el complejo de ácido nucleico-polisacárido obtenido de esta forma tiene un alto nivel de resistencia a enzimas degradativas. En el caso donde el poli(dA) modificado en S se añade a una cadena sentido en un siRNA de tipo 21 mer, un complejo de ácido nucleico-polisacárido del siRNA y esquizofilano es capaz de hacer el efecto activo de interferencia de ARN permitiendo que se incorpore a la cadena antisentido dentro de un RISC.

Esquizofilano

El esquizofilano (de aquí en adelante, también denominado como "SPG") es un polisacárido con un esqueleto de β -1,3-glucano y se distribuye dentro de una célula a través de una señal que se induce cuando se une a Dectina-1, que es un receptor presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno. Se conoce el siRNA extendido con una región de poli(dA) a través del que se forma un complejo con esquizofilano, y su uso para dirigirse a células que expresan dectina-1 de p. ej., US2006/216343.

Se puede producir SPG de acuerdo con un método ordinario descrito en un documento (A.C.S. 38(1), 253 (1997) o

Carbohydrate Research, 89, 121-135 (1981)). El esquizofilano obtenido de esta forma se puede someter a ultrasonificación para proporcionar esquizofilano que tiene un peso molecular deseado.

Un SPG usado en la presente invención puede ser uno al que se unen varias moléculas funcionales juntas. En el caso donde una molécula funcional se va a unir a SPG, la proporción de la molécula funcional a unirse es, por ejemplo, 1 a 200, preferiblemente 1 a 100, y particularmente preferible 1 a 50 moléculas funcionales en relación a 100 cadenas laterales de SPG. Se puede ajustar la proporción de la molécula funcional unida controlando la cantidad de oxidante añadido, como peryodato sódico, en relación al residuo de glucosa ramificado en el método anteriormente mencionado. El sitio de unión donde se une la molécula funcional a SPG y el sitio de unión donde se une el enlazador para la molécula funcional no están particularmente limitados, pero es preferible que la porción 1,2-diol de la glucosa con un enlace 1,6-glucopiranosido ramificado a partir del esqueleto de β -1,3-glucano del SPG se sustituya para la unión.

El peso molecular de SPG usado en la presente invención no está particularmente limitado, y se establece adecuadamente de acuerdo con, por ejemplo, la longitud de cadena de la molécula de unión a SPG como poli(dA). Específicamente, el peso molecular de SPG es normalmente, por ejemplo, 25.000 a 500.000 y preferiblemente 25.000 a 250.000.

Complejo de ácido nucleico-polisacárido de siRNA para el factor coestimulador y esquizofilano

En el agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención, se usa un complejo de ácido nucleico-polisacárido de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano. El complejo de ácido nucleico-polisacárido se puede obtener permitiendo que una molécula que une SPG que se añade a un siRNA para un factor coestimulador se acompleje con esquizofilano.

Ejemplos preferidos del complejo de ácido nucleico-polisacárido incluyen una molécula compleja en la que el poli(dA) que se puede modificar en S se añade a al menos un extremo de una cadena sentido o de una cadena antisentido que constituye un siRNA para un gen de un factor coestimulador, y la única cadena de poli(dA) y las dos cadenas de esquizofilano forman una triple hélice.

El complejo de ácido nucleico-polisacárido se puede preparar de acuerdo con un método conocido. Un ejemplo específico puede ser un método de producción que tiene las siguientes etapas (1) a (3): (1) el siRNA anteriormente descrito al que está unida la molécula que une SPG directamente o a través de un enlazador se prepara de acuerdo a un método conocido, (2) separadamente, se proporciona SPG, o se prepara SPG (SPG modificado) al que se une directamente la molécula funcional o a través de un enlazador, y (3) se forma entonces un complejo que usa la molécula que une SPG unida al siRNA y al SPG o el SPG modificado.

En la etapa (3) del método, se puede seleccionar adecuadamente la proporción de mezcla del siRNA con el SPG o SPG modificado de acuerdo con la longitud de la cadena de la molécula que une SPG o la longitud de la cadena del SPG o del SPG modificado. En el caso donde se usa poli(dA) como la molécula que une SPG, una molécula de glucosa del esqueleto del SPG corresponde a una molécula de adenina del poli(dA), y una cadena de poli(dA) y dos cadenas SPG forman una conformación de triple hélice. Es decir, en el complejo de ácido nucleico-polisacárido de la presente invención, el poli(dA) se incorpora dentro de una o más posiciones de la conformación de doble hélice formada por dos cadenas SPG, formando así una conformación de triple hélice. Por ejemplo, con un siRNA al que se añade un poli(dA) de 40 mer y SPG con un peso molecular de 150.000, dos moléculas de SPG con un peso molecular de 150.000 y 17 moléculas de un siRNA al que se añade poli(dA) de 40 mer forman una conformación de triple hélice. Una proporción molar preferida de siRNA con poli(dA) añadido a SPG es 20 : 1 a 1 : 5, y preferiblemente, se mezclan a 10 : 1 a 1 : 1, y se acomplejan la región de polidesoxiadenina de cadena sencilla de la doble cadena de ARN unida al polinucleótido y el SPG o SPG modificado. Sometiendo el siRNA y el SPG o SPG modificado a condiciones de formación de complejo en tal proporción molar posibilita que estos materiales interaccionen eficazmente uno con otro, haciendo posible de este modo aumentar la eficacia de producción del complejo de ácido nucleico-polisacárido usado en la presente invención.

Específicamente, un complejo de ácido nucleico-polisacárido que forma una conformación de triple hélice que usa un siRNA con poli(dA) añadido y esquizofilano se prepara de acuerdo con el siguiente método. El SPG adopta una conformación de triple hélice en un entorno natural o en agua. Este SPG se disuelve en un disolvente polar como dimetilsulfóxido (DMSO) o una solución alcalina acuosa como una solución acuosa de hidróxido sódico para que se modifique en cadenas sencillas, luego se añade un siRNA con poli(dA) añadido, se reemplaza el disolvente por agua o se neutraliza la solución alcalina acuosa (proceso de regeneración), y se forma por lo tanto una conformación de complejo de triple hélice (estructura de asociación) compuesta de una porción de cadena de poli(dA) unida con un siRNA y dos cadenas de SPG. Parece que tal formación de complejo de un polinucleótido y un polisacárido se logra principalmente a través de enlace de hidrógeno y una interacción hidrofóbica.

Inducción de tolerancia inmune

El agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención se usa para la inducción de tolerancia inmune específica de donante en un receptor tratado o a ser tratado con trasplante de una célula, tejido u órgano donante. El

uso del complejo de ácido nucleico-polisacárido permite inhibir específicamente la expresión de un gen de factor coestimulador en célula que expresa Dectina-1 y, por lo tanto, inducir eficazmente tolerancia inmune específica de donante.

5 El agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención se puede aplicar a animales como seres humanos, monos, ratones, ratas, perros, conejos, gatos, bovinos, y gallinas, preferiblemente seres humanos.

10 El agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención se puede preparar incorporando el complejo de ácido nucleico-polisacárido en una cantidad eficaz para la inducción de tolerancia inmune y combinándolo además apropiadamente con un transportador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tal transportador incluyen transportadores acuosos como agua purificada, soluciones acuosas que contienen azúcar, tampones, suero salino fisiológico, y agua libre de nucleasas; excipientes; y similares.

15 La ruta de administración del agente que induce tolerancia inmunológica se puede seleccionar adecuadamente a partir de métodos usados convencionalmente basados en los síntomas del paciente, estado de la enfermedad, enfermedad, y similares, como oral, parenteral (que incluye administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrarectal, e intravaginal), inhalación, administración sistémica, administración local (que incluye aplicación externa en la piel o en la cavidad bucal; infusión sobre un sitio que no da sustancialmente como resultado la entrada en el flujo sanguíneo, como el ojo, oreja, y nariz).

20 La terapia de trasplante que usa el agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención se lleva a cabo mediante un método que incluye la administración del agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención a un donante que proporciona una célula, tejido u órgano donante a ser trasplantado, un método que incluye el tratamiento de una célula, tejido u órgano a ser trasplantado con el agente que induce tolerancia inmunológica presente, un método que incluye la administración a un receptor a ser tratado por trasplante de una célula, tejido u órgano, o un método que incluye la combinación de dos o tres de estos métodos.

25 En terapia de trasplante que usa el agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención, no está particularmente limitado una célula, tejido u órgano a ser trasplantado, y ejemplos de los mismos incluyen una célula derivada de médula ósea, riñón, corazón, pulmón, médula ósea, piel, córnea y similares.

El agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención puede tratar o prevenir la resistencia o rechazo de una célula, órgano o tejido trasplantado, así como inducir tolerancia inmune y por lo tanto, puede inhibir la aparición de rechazo inmune incluso cuando la administración del presente inmunosupresor es discontinua en un periodo temprano después del trasplante.

30 También, el trasplante de una célula derivada de donante de médula ósea antes del trasplante de hígado de donante vivo o del trasplante de riñón de donante vivo, o la administración del agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención cuando induce tolerancia inmune en un receptor permite promocionar la supervivencia del hígado o riñón trasplantado y eliminar el rechazo. El agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención se usa también en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades proliferativas y sobre-proliferativas, y síntomas cutáneos de enfermedades mediadas inmunológicamente (como artritis reumatoide crónica, eritematoides, eritematoide sistémica, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia gravis, diabetes tipo I, uveítis, síndrome nefrótico, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis eccematosa, dermatitis seborreica, liquen plano, pénfigo, pénfigo ampuloso, epidermolisis ampulosa, urticaria, angioedema, angeítis, eritema, eosinofilia de piel, y alopecia areata); y en el tratamiento de enfermedades obstructivas de vías respiratorias reversibles, gastroenteritis, alergias (como enfermedad inflamatoria biliar, enfermedad celiaca, rectitis, gastroenteritis eosinofílica, mastocitosis, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa), alergias relacionadas con la alimentación (como migraña, rinitis, y eczema), y otros tipos de alergia.

45 En terapia de trasplante, la dosis del agente que induce tolerancia inmunológica de la presente invención puede ser una cantidad que es eficaz o no tóxica para la inducción de tolerancia inmune, y se puede determinar la dosis por aquellos expertos en la técnica a partir de experimentos de rutina. La dosis no está particularmente limitada, y por ejemplo, en el caso donde se usa un complejo de un siRNA para CD40 y SPG como el complejo de ácido nucleico-polisacárido, la dosis eficaz se selecciona generalmente de una intervalo entre aproximadamente 0,001 y 10 mg por peso corporal (kg) por día.

50 La presente invención también proporciona el uso del complejo de ácido nucleico-polisacárido para la preparación de un agente que induce tolerancia inmunológica usado para la inducción de tolerancia inmune específica de donante cuando se trasplanta una célula, tejido u órgano donante a un receptor. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para inducir tolerancia inmune que incluye una etapa de administrar el complejo de ácido nucleico-polisacárido a un animal que necesita tolerancia inmune para una célula, órgano o tejido de donante.

55 Especialmente, la presente invención también proporciona el uso del complejo de ácido nucleico-polisacárido para la preparación de un medicamento para la inhibición del rechazo en terapia de trasplante y la inducción de tolerancia inmune. Además, la presente invención proporcionan método para inhibir el rechazo en terapia de trasplante o un método para inducir tolerancia inmune, que incluye una etapa de administrar el complejo de ácido nucleico-

polisacárido a un animal que necesita tratamiento o prevención de rechazo para un órgano o tejido trasplantado.

La presente solicitud reivindica la propiedad bajo PCT/JP2011/68265 presentada el 10 de agosto de 2011 y PCT/JP2012/53583 presentada el 15 de febrero de 2012.

Ejemplos

- 5 La presente invención se describirá con más detalle a continuación por medio de ejemplos, pero la presente invención no está limitada a esto. Nótese que el esquizofilano se puede denominar como "SPG" en los ejemplos. También, el siRNA dirigido a la luciferasa se puede referir como "siLuc", y el siRNA dirigido a CD40 se puede referir como "siCD40".

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

- 10 Los complejos de ácido nucleico-polisacárido usados en los siguientes ejemplos se formaron como sigue. Se preparó SPG con un peso molecular de aproximadamente 150.000 para tener una concentración final de 15 mg/ml en una solución acuosa de hidróxido sódico 0,25 N, luego se agitó durante 1 hora, y se dejó estar a 4°C durante 1 día para modificación. Se añadió una solución de un siRNA a la que se había añadido poli(dA) modificado en S disuelto primero en fosfato sódico 330 mM a esta solución modificada de SPG, y la mezcla se neutralizó y se dejó estar a 4°C por no menos de 24 horas. En este momento, se preparó la mezcla para que tuviera 0,27 mol de SPG por mol de siRNA. Nótese que, en el siRNA con poli(dA) añadido modificado en S, se unieron 40 desoxiadeninas que han reaccionado con fosforotioato con el extremo 5' de la cadena sentido del siRNA mediante enlaces fosfoéster. En los siguientes ejemplos, el poli(dA) modificado en S se puede denominar como dA40(s). El grado de modificación en S de todas las polidesoxiadeninas modificadas en S usadas en los siguientes ejemplos fue del 100%.

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

- 25 La preparación se llevó a cabo para satisfacer las condiciones mostradas en la Tabla 1 añadiendo una muestra a un tampón fosfato (PBS) o un medio de cultivo celular (RPMI + FBS al 10%) (FBS: Biological Industries Cat# 04-001-1A, RPMI: Wako Pure Chemical Industries, S.L., Cat# 189-02025)). La muestra se incubó a 37°C durante 4 horas o 24 horas, después se sometió a electroforesis bajo condiciones de 100 V y 60 min usando gel de poliacrilamida al 12,5% (Tris-borato-EDTA (TBE)), y se tiñó con Oro SYBR (Lifetechnologies Japón).

- 30 En la Tabla 1, en dA40(s)-siLuc(21 nt), se añadió polidesoxiadenina que ha reaccionado con fosforotioato de 40 mer al extremo 5' de la cadena sentido de siRNA de 21 mer (SEQ ID N.º 1) dirigido a luciferasa. En dA40(s)-siLuc(27 nt), se añadió polidesoxiadenina que ha reaccionado con fosforotioato de 21 mer al extremo 5' de la cadena sentido de siRNA de 27 mer (SEQ ID N.º 3) dirigido a luciferasa.

Tabla 1

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

- 35 Como resultado, con respecto a los siRNAs a los que se había añadido poli(dA) que ha reaccionado con fosforotioato de 40 mer, las muestras que no están en la forma de un complejo de un siRNA y SPG en un medio de cultivo celular que contiene enzima degradativa (carril 2 y 5) y los controles de los carriles 1 y 4 tuvieron bandas poco precisas, lo que indica degradación, y las muestras que estaban en la forma de un complejo de un siRNA y SPG (carriles 3, 6, y 7) mostraron bandas claramente visibles, lo que indica que los complejos de ácido nucleico-

polisacáridos eran estables. Nótese que las muestras con siRNAs a los que había añadido poli(dA) que ha reaccionado con fosforotioato eran más estables en un medio de cultivo celular que contiene enzimas degradativas que aquellas con siRNAs a los que no se había añadido poli(dA) que ha reaccionado con fosforotioato.

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

5 (3-1) Sensibilidad a Dicer del complejo de ácido nucleico-polisacárido con cola de dA no modificada en S

En este ejemplo, se usó un kit enzimático de dicer humano recombinante (fabricado por Genlantis S. A.: Cat# T510002). También, se prepararon pre-mezclas que tienen los siguientes componentes (A a E).

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

B. ATP 10 mM: 1 µl

10 C. MgCl₂ 50 mM: 0,5 µl

D. tampón de reacción Dicer: 4 µl

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

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

20 En la Tabla 2, siRNA(21 nt) indica un siCD40 de 21 mer (SEQ ID N.ºs. 5 y 6) dirigido a CD40. En dA40-siCD40(21 nt), se añadió polidesoxiadenina de 40 mer al extremo 5' de la cadena sentido (SEQ ID N.º 5) de un siRNA (SEQ ID N.ºs. 5 y 6) de 21 mer dirigido a CD40. siLuc indica un siRNA de 21 mer dirigido a luciferasa mostrada en SEQ ID N.ºs. 1 y 2. En dA40-siLuc(21 nt), se añadió polidesoxiadenina de 40 mer al extremo 5' de la cadena sentido (SEQ ID N.º 1) de un siRNA (SEQ ID N.ºs. 1 y 2) de 21 mer dirigido a luciferasa.

Tabla 2

Carril	Muestra
1	Marcador
2	siCD40(21 nt)
3	dA40-siCD40(21 nt)
4	dA40-siCD40(21 nt): Dicer añadida
5	siLuc(21 nt)
6	dA40-siLuc(21 nt)
7	dA40-siLuc(21 nt): Dicer añadida
8	siLuc(27 nt)
9	dA40-siLuc(27 nt)
10	dA40-siLuc(27 nt): Dicer añadida

25 Los resultados de la electroforesis descrita anteriormente muestran que la banda de electroforesis del carril 2 era claramente visible como la del carril 3, y la banda del carril 6 era claramente visible como la del carril 7, y por lo tanto poli(dA)-siRNA(21 nt) no se escinde por Dicer, pero por otro lado, la banda del carril 10 era más incierta que la del carril 9, y poli(dA)-siRNA(27 nt) se escinde por Dicer.

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

30 De la misma forma como en (3-1) anterior, se evaluó la sensibilidad a Dicer de un complejo de ácido nucleico-polisacárido con una cola de dA modificada en 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 calentada a 37°C
6	dA40(s)-siCD40(21 nt): Dicer añadida
7	Marcador
8	siLuc(21 nt)
9	siLuc(27 nt)
10	dA40(s)-siCD40(27 nt)
11	dA40-siCD40(27 nt): Incubación con agua calentada a 37°C
12	dA40-siCD40(27 nt): Dicer añadida

En la Tabla 3, siLuc(21 nt) indica un siRNA de 21 mer (SEQ ID N.ºs. 1 y 2) dirigido a luciferasa. siLuc(27 nt) indica un siRNA de 27 mer (SEQ ID N.º. 3 y 4) dirigido a luciferasa. En dA40(s)-siCD40(21 nt), se añadió polidesoxiadenina que ha reaccionado con fosforotioato de 40 mer al extremo 5' de la cadena sentido (SEQ ID N.º 5) de un siRNA de 21 mer (SEQ ID N.º. 5 y 6) dirigido a CD40. En dA40(s)-siCD40(27 nt), se añadió polidesoxiadenina que ha reaccionado con fosforotioato de 40 mer al extremo 5' de la cadena sentido (SEQ ID N.º 7) de un siRNA de 27 mer (SEQ ID N.º. 7 y 8) dirigido a CD40.

Los resultados de la electroforesis mostraron que la banda del carril 6 era tan visible como las de los carriles 4 y 5 y por lo tanto el siRNA de tipo 21 nt, incluso cuando se había añadido a él poli dA modificado en S, no se escinde por Dicer, pero por otro lado, la banda del carril 12 era más incierta que las de los carriles control 10 y 11, y por lo tanto el siRNA de tipo 27 nt se escinde por Dicer.

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

Se introdujo un vector de expresión de Luciferasa Dual psiCHECK™-2 (Promega Cat# C8021) dentro de células HEK 293 usando Lipofectamina™ LTX (Lifetechnologies Japón, Cat# 15338-500). En este momento, se ajustó el número de células para que sean 50.000 por pocillo. Se introdujo dA40-siLuc(21 nt) o dA40-siLuc(27 nt) dentro de células que usan TransIT™-TKO (Takara Bio, S.A., Cat# V2154), y las células se incubaron a 37°C durante 20 horas en un incubador de CO₂. Después, se llevó a cabo un ensayo Dual de Luciferasa (fabricado por Promega, sistema de ensayo Dual-Glo Luciferase, Cat# E2920) para medir el efecto de interferencia del ARN. Como un control, se llevó a cabo el mismo proceso usando una muestra de ácido nucleico. Con respecto al efecto de interferencia del ARN, se compararon dos expresiones de luciferasa en el control, y el efecto de interferencia del ARN en ese momento se consideró como 0%, y la expresión de inhibición en cada muestra se expresó en %.

Los resultados se muestran en la FIG. 1. Se mostró que dA40-siLuc(21 nt) de 21 mer unido a poli(dA), incluso sin ser escindido por Dicer, produce el mismo efecto de interferencia del ARN que dA40-siLuc(27 nt) de 27 mer.

Ejemplo 5: Efecto de interferencia del ARN del complejo siRNA/SPG unido con poli(dA) modificado en S

Se evaluó el efecto de interferencia del ARN de un complejo de SPG y un siRNA quimérico con poli(dA) que ha reaccionado con fosforotioato usando un ensayo Dual de Luciferasa (fabricado por Promega, sistema de ensayo Dual-Glo Luciferase, Cat# E2920). Se usaron células RAW264.7 (células dRAW), que expresan fuertemente Dectina-1, (obtenidas del profesor asociado Yoshiyuki Adachi (inmunología) del Departamento de Farmacología, Universidad de Tokio de Farmacia and Ciencias de la Vida). Se muestran las muestras usadas en la Tabla 4 a continuación. En la muestra 4 en la Tabla 3, se introdujo dA40(s)-siLuc(21 nt) usando un TransIT™-TKO (Takara Bio, S. A., Cat# V2154).

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

Tabla 4

	Muestra	Concentración de TransIT-TKO ($\mu\text{l/ml}$)	Concentración de siRNA (nM)	Efecto de interferencia del ARN (%)
1	Control (co-transfección con psiCHECK TM -2)	-	10	0
2	siLuc(21 nt)	-	10	8,8
3	dA40(s)-siLuc(21 nt)	-	10	-4
4	dA40(s)-siLuc(21 nt) (transIT-TKO añadido)	0,1	10	1,8
5	Complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG	-	10	41

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

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

En este ejemplo, se evaluó la dependencia de la dosis de la actividad de siRNA. Se usaron células dRAW, que proliferan en un serocultivo al 10%. Se muestran las muestras usadas en este ejemplo en la Tabla 5 a continuación.

10 Este ejemplo se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se recuperaron las células dRAW, se sembraron sobre una placa de 48 pocillos para que fueran 20.000 células/pocillo/200 μl , se incubaron en un incubador de CO₂ a 37°C durante 20 horas. Se añadieron un complejo psiCHECKTM-2/LTX en una cantidad de 20 μl /pocillo y un medio de cultivo en una cantidad de 180 μl /pocillo a la placa de 48 pocillos. Después, se llevó a cabo un ensayo Dual Luc (fabricado por Promega, sistema de ensayo Dual-Glo Luciferasa, Cat# E2920). Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

	Muestra	Concentración de siRNA (nM)	Efecto de interferencia del ARN (%)
1	Control (Co-transfección)	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

15 A partir de la Tabla 5, se mostró que el complejo poli(dA)(s)-siRNA produce un efecto de interferencia del ARN de manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7: Capacidad de introducción del complejo poli(dA)(s)-siRNA en la célula

(7-A) Capacidad de introducción en células dRAW

20 Se sembraron células dRAW para que fueran 1.000.000 células/placa de Petri (5 ml) y se incubaron en un incubador de CO₂ a 37°C durante 20 horas. Después, se añadieron dA40(s)-siLuc(21 nt) desnudo marcado con Alexa 647 y un complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647 al medio de cultivo cada uno en una concentración de 100 nM y se pusieron en contacto con las células dRAW. Después de que se añadió cada siRNA, las células se recuperaron 1, 2, 4, y 8 horas más tarde. Las células recuperadas se fijaron mediante formaldehído equilibrado al 10% (100 μl /placa de Petri), y se midieron el número de células marcadas con Alexia 647 mediante citometría de flujo (FACS).

25 De acuerdo con los resultados, el número de células marcadas con Alexia 647 usando el dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG fue más de dos veces mayor que el número de células marcadas obtenidas usando dA40(s)-siLuc(21 nt) desnudo, y

parece que la captación celular del complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG es más de dos veces mayor.

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

5 Se obtuvieron células de bazo a partir de ratones (C57BL/6, machos, 7 semanas de edad; 4 ratones) de acuerdo con un método estándar. Algunas de las células de bazo obtenidas se almacenaron bajo refrigeración para usar como control. Las células de bazo restantes se separaron en un grupo celular CD11c(-) y un grupo celular CD11c(+)

10 usando una columna MACS MS. La separación mediante la columna se llevó a cabo dos veces. Se preparó un grupo celular CD11c(+) para que tuviera 7×10^5 células, y se cultivaron en una placa de 6 pocillos (2 ml de volumen) durante 48 horas (37°C, CO₂ al 5%) para que satisficieran las condiciones mostradas en la Tabla 6 a continuación. Después de cultivar, se llevó a cabo el análisis por FACS usando los anticuerpos de FACS mostrados en los paréntesis en la Tabla 6. En la tabla, Dectina-1-FITC indica un anticuerpo anti-dectina-1 modificado con FITC, CD11c-FITC indica un anticuerpo anti-CD40 modificado con FITC, y control de Isotipo PE indica un anticuerpo de control de isotipo modificado con PE.

Tabla 6

	Muestra
1	Células CD11c(-) (Dectina-1-FITC)
2	Células CD11c(+) (Control de Isotipo PE)
3	Células CD11c(+) (CD11c-FITC)
4	Células CD11c(+) (Dectina-1-FITC)
5	Células CD11c(+) + SPG (Dectina-1-FITC)
6	Células CD11c(+) + dA40(s)-siCD40(27 nt) desnudo 100 nM (Dectina-1-FITC)
7	Células CD11c(+) + complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG 100 nM (Dectina-1-FITC)

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

(7-C) Incorporación dentro de RLC (complejo de carga RISC)

20 Se obtuvieron células de bazo a partir de ratones (C57BL/6, machos, 7 semanas de edad; 4 ratones) de acuerdo con un método estándar. Algunas de las células de bazo obtenidas se almacenaron bajo refrigeración para usar como control. Las células de bazo restantes se separaron en un grupo celular CD11c(-) y un grupo celular CD11c(+)

25 usando una columna MACS MS. La separación mediante la columna se llevó a cabo dos veces. Se preparó un grupo celular CD11c(+) para que tuviera 2×10^4 células, y se cultivaron en portas de cristal con cámara (4 pocillos, 1 ml de volumen/pocillo) durante 24 horas (37°C, CO₂ al 5%). Después, se añadieron siLuc en el que el extremo 5' de la cadena antisentido se había marcado con Alexa 647 y un complejo dA40(s)-siLuc/SPG en el que se había marcado el extremo 5' de la cadena antisentido con Alexa 647 a células CD11c(+) para lograr 100 nM, y las células se cultivaron durante 1 hora (37°C, CO₂ al 5%).

30 Una hora más tarde, se eliminó el sobrenadante de cultivo por succión. Se añadieron 500 μ l de una solución de paraformaldehído al 4%/PBS a cada pocillo, y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de paraformaldehído/PBS por succión, se añadió 1 ml de PBS a cada pocillo, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, y después el PBS se eliminó por succión. Este proceso se repitió una vez más (a continuación, el procedimiento durante 5 minutos de incubación a temperatura ambiente con PBS se denominará como procedimiento de lavado). Se añadieron 500 μ l de una solución de Tritón X-100 al 0,1%/PBS a cada pocillo, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y después se eliminó la solución de Tritón X-100 al 0,1%/PBS por succión. El procedimiento de lavado se llevó a cabo dos veces. Se añadieron a cada pocillo 500 μ l de una solución de suero de cabra normal (NGS) al 10%/PBS, y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eliminar la solución de suero de cabra normal (NGS) al 10%/PBS por succión, se preparó un anticuerpo de ratón anti-TRBP2 para lograr 130 ng/ml con Tritón X-100 al 0,1%, NGS al 1,5%, y BSA/PBS, después se añadieron 500 μ l del anticuerpo a cada pocillo, y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de anticuerpo se eliminó por succión, el procedimiento de lavado se llevó a cabo 3 veces. Se diluyó un anticuerpo anti- IgG de ratón Alexa 488 (Lifetechnologies Japón) 750 veces con Tritón X-100, NGS al 1,5%, y BSA/PBS, y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de anticuerpo se eliminó por succión, y el procedimiento de

lavado se llevó a cabo 3 veces. Después de liminar el PBS por succión, se quitó la cámara, y se montó una muestra usando un medio de montaje que contiene un agente anti-desvanecimiento. Se tomó una imagen de esta muestra con un microscopio laser confocal y se analizó.

5 Se confirmó a partir de los resultados que el siRNA del complejo dA40(s)-siLuc/SPG que había sido captado dentro de las células y TRBP2, que es la proteína núcleo de RLC, se localizaron en la misma localización, y las imágenes coincidían en la misma profundidad focal. Es claro a partir de los resultados que el siRNA captado por las células y TRBP2 se localizan dentro de tal distancia que pueden interactuar uno con otro, o es decir, el siRNA se incorpora en RLC. Por otro lado, en el caso donde se usó siLuc marcado con Alexa 647 por separado, no se observó siLuc incorporado.

10 (7-D) Inhibición de la expresión de ARNm de CD40 *in vitro*

(i) PCR a tiempo real

15 Se suspendieron células dRAW de pases de cultivo (al 80% de confluencia) en medio de cultivo (RPMI-FBS al 10% (Lifetechnologies Japón, N.º cat. 12718011S)) y se prepararon para tener 1×10^5 células/ml. Se añadió la suspensión celular a una placa de 96 pocillos para tener 10.000 células por pocillo (100 μ l/pocillo) y se cultivaron durante toda la noche bajo condiciones de 37°C y CO₂ al 5%. Después de cultivar se eliminó el sobrenadante del cultivo mediante un aspirador, y se añadieron 100 μ l de un medio de cultivo a cada pocillo. Se repitió dos veces este procedimiento. Las muestras (Tabla 7) cada una ajustada para que tengan una concentración de 100 nM usando de antemano un medio de cultivo se añadieron en una cantidad de 100 μ l por pocillo, y se cultivaron durante 20 horas bajo condiciones de 37°C y CO₂ al 5%. Después de cultivar, se añadieron 100 μ l de un medio de cultivo a cada pocillo, y se elimina después el medio de cultivo mediante un aspirador. Se añadieron 60 ng/ml de interferón gamma (IFN- γ , PeptoTech, N.º cat. 315-05) preparado de antemano usando un medio de cultivo en una cantidad de 100 μ l por pocillo, y se cultivaron durante 4 horas bajo condiciones de 37°C y CO₂ al 5%. Después de cultivar, se prepararon los ARNs totales usando un kit CellAmp Direct RNA Prep (Takara Bio, S. A., N.º cat. 37329) a partir de las células de cada pocillo. Con los ARNs totales preparados como moldes, se sintetizaron los ADNcs usando un kit reactivo Primer Script RT (Takara Bio, S. A., N.º cat. RR037A). Los ADNcs sintetizados se sometieron a qPCR a tiempo real usando SYBR Prime Ex Taq II (Takara Bio, S. A., N.º cat. RR081A) para medir niveles de expresión de ARNm de CD40. Al mismo tiempo, se midieron los niveles de expresión del ARNm de la beta-actina, y esto se usó para corregir los valores de ARNm de CD40 medidos. Los valores corregidos se consideraron como los niveles de expresión de ARNm de CD40 en condiciones respectivas. Las secuencias del cebador usadas para la qPCR se muestran 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

Cebador de CD40 de ratón	Cebador directo	CAAGGATTGCGAGGCATGTG	SEQ ID N.º 9
	Cebador inverso	TGACAGACGGTATCAGTGGTCTCAG	SEQ ID N.º 10
Cebador de β -actina de ratón	Cebador directo	TGGCACCCAGCACAATGAA	SEQ ID N.º 11
	Cebador inverso	CTAAGTCATAGCCGCCTAGAAGCA	SEQ ID N.º 12

35 Se confirmó a partir de los resultados que el nivel de expresión de CD40 alcanzado mediante la adición de SPG solo o siCD40 desnudo a células que expresan Dectina-1 no era menor que el alcanzado por el control (sin muestra), o no se indujo actividad ARNi, sin embargo, la adición de un complejo siCD40/SPG a células que expresan Dectina-1 inhibió la expresión de ARNm de CD40 sin debilitar la actividad ARNi del siRNA.

(ii) FACS

40 Se separaron células CD11(+) en células de bazo, y se analizó la proporción de células CD40 positivas en las

5 células CD11(+) mediante FACS. Además, se usó el mismo entorno que en el cultivo celular, o es decir, se añadieron las células a un medio de cultivo RPMI+FBS al 10% y se cultivaron durante 4 horas a 48 horas específicas después de calentarlas a 37°C en incubación con CO₂. 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 se analizó la expresión de CD40 posterior mediante FACS. El método para tratar las células del bazo es como se describe anteriormente en (7-B). Los anticuerpos usados en FACS se muestran en los paréntesis en la Tabla 9 a continuación. En la tabla, el control de Isotipo PE indica un anticuerpo de control modificado con PE, y CD40-PE indica un anticuerpo anti-CD40 modificado con PE.

Tabla 9

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

10 Los resultados mostraron que las células positivas con CD expresado disminuyen con la muestra 4 y el complejo siCD40/SPG inhibe la expresión de CD40 en la superficie celular primaria. Por otro lado, con siCD40 no en forma de un complejo con SPG, no se observó reducción en el número de células CD40 positivas, y no fue posible inhibir suficientemente la expresión de CD40.

15 Parece que en este ejemplo, se formó un complejo de siRNA y SPG, y de este modo el siRNA se estabilizó en el suero y la sangre, permitiendo así que el siRNA se introduzca de manera más eficaz en las células que el siRNA desnudo y se administre en el citoplasma, y como resultado, se inhibió la expresión de ARNm, y se inhibió la expresión de la molécula diana en la superficie de la membrana celular.

Ejemplo 8

20 Se estableció como molécula diana un factor coestimulador CD40, que es un factor de respuesta temprana conocido de una inmuno-reacción, y se trataron las células de un ratón respondedor con un siRNA dirigido a esta molécula. Se evaluó el efecto farmacológico llevando a cabo una reacción linfocitaria mixta (MLR) entre un grupo de células estimuladoras y un grupo de células respondedoras tratadas o no tratadas con siRNA y midiendo las tasas de proliferación celular de los respectivos grupos mediante un kit de quimioluminiscencia BrdU.

25 Cuando se lleva a cabo la MLR, el uso de células de bazo respondedoras CD11c(-) hace que las células presentadoras de antígeno (APCs) sean deficientes, suprimiendo así una reacción linfocítica normal e inhibiendo la proliferación celular. Se añadieron a estas, células de bazo CD11c(+) tratadas con un complejo siCD40/SPG, y se observó el grado de recuperación de la proliferación celular. Se confirmó, a partir de una comparación de MRL alogénica y MLR singénica a la que se añadió o no se añadió un complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG, que se logró una notable inducción de la inmunosupresión mediante la adición del complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG (el grado de recuperación de la proliferación celular se redujo: FIGs. 2 y 3).

30 En este ejemplo, se usó un ratón C57BL/6 como un ratón respondedor, y Balb/c se usó como un ratón estimulador. Durante la MLR, se usaron las células del bazo estimuladoras después de que se detuviera la proliferación celular de las células de bazo estimuladoras con mitomicina C (MMC) añadida cuando se recogieron las células estimuladoras de bazo.

35 La MLR en pre-cultivo *in vitro* se refiere a un método en el que se agrega un complejo siCD40/SPG a células CD11c positivas separadas de las células respondedoras de bazo de ratón, después se devolvieron las células a un grupo celular CD11 negativo y se mezclaron luego con células de bazo estimuladoras tratadas con mitomicina C (MMC), y se observó una reacción de MLR. Es decir, se unió (o introdujo) un complejo dA40(s)-siRNA/SPG a las células diana con antelación, y se evaluó la inducción de la inmunosupresión en la reacción de MLR.

(8-A): Efecto inmunosupresor por el complejo de ácido nucleico-polisacárido en la MLR en pre-cultivo usando células CD11c positivas

En esta prueba se comprobó si el complejo dA40(s)-siCD40(27 nt) demuestra una acción inmunosupresora o no.

Preparación celular

45 Se recogieron células de bazo 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 agentes hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de agente hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se suspendieron en FBS al 10% (DS Pharma Biomedical Co. S. A.) + RPMI (5 ml), y las células de bazo respondedoras se trataron con mitomicina C (MMC) (se añadieron 25 µg de MMC a las 10⁷ células finales).

5 Purificación de células CD11c positivas (marcaje magnético)

Las células recogidas de células de bazo se ajustaron para tener 10⁸ células/muestra y se suspendieron en una solución tampón (400 µl). Se añadieron 100 µl de microperlas CD11c, y las células se dejaron reposar en un refrigerador (2º a 8ºC) durante 15 minutos.

Separación magnética

10 Se lavó una columna con una solución tampón (tampón MACS: EDTA 2 mM, BSA al 0,5% en PBS (1x) desgasificado después de la preparación), se vertieron 500 µl de una suspensión de células marcadas magnéticamente con una pipeta y se dejaron fluir. El fluido que había salido se recogió y se usó como células CD11c(-).

Procedimiento de adición del grupo complejo

15 Las células CD11c positivas recogidas se dividieron para que fueran 1,0x10⁵ células/condición. Se añadieron siCD40 desnudo y un complejo siCD40/SPG a las mismas para tener una concentración final de 100 nM, y las células se incubaron a 37ºC durante 4 horas. Se usaron 5x10⁵ células respondedoras (esplenocitos) y 5x10⁵ células estimuladoras (una mezcla de 2,5x10⁴ células CD11c positivas y 4,75x10⁵ células CD11c negativas) en la MLR. Las condiciones de la MLR se muestran en la Tabla 10 a continuación.

20 Tabla 10

Condiciones de MLR

	Muestra
1	Control MLR alogénica Balbc / C57BL6 CD11c (-/+)
2	MLR alogénica Balbc / C57BL6 CD11c (-/+) dA40(s)-siCD40 desnudo 10 nM
3	MLR alogénica Balbc / C57BL6 CD11c (-/+) complejo dA40(s)-siCD40/SPG 10 nM

*C57BL6 CD11c (-/+): La proporción de células CD11c (-) y células CD11c(+) mezcladas fue CD11c(-) : CD11c(+) = 95 : 5.

* En la tabla, a menos que se especifique lo contrario, las células de bazo estimuladoras eran tratadas con MMC.

25 * En la tabla, las células MLR indicadas como (Balbc / C57BL6) indican (cepa de ratón de linfocitos usados como estimuladores / cepa de ratón de linfocitos usados como respondedores).

* En la tabla, siCD40 tiene secuencias de bases que se muestran en SEQ ID N.º. 7 y 8.

30 Los resultados se muestran la FIG. 2. La FIG. 2 muestra la inhibición de la recuperación de la proliferación mediante una aloreacción. No se observó proliferación celular cuando todas las células de bazo Balb/c y las células CD11c(-) separadas a partir de C57BL/6 se sometieron a la MLR. Por otro lado, cuando las células de bazo Balb/c y las células CD11c (-/+) separadas a partir de C57BL/6 se sometieron a la MLR, se activó una reacción alogénica y se recuperó una reacción de proliferación celular. En el caso donde se puso en contacto un complejo con las células diana CD11c(+), y luego se mezclaron las células de nuevo con células CD11c(-) y se sometieron a la MLR junto con las células de bazo Balb, se inhibió la recuperación de la proliferación celular. Es decir, se demostró que las células CD11c positivas inducen inmunosupresión en la MLR en pre-cultivo.

35 (8-B): Dependencia de la dosis de la acción inmunosupresora por el complejo de ácido nucleico-polisacárido usando células CD11c positivas

40 En este experimento, se verificó si el complejo dA40(s)-siCD40(27 nt)/SPG demuestra una acción inmunosupresora de una manera dependiente de la dosis. La preparación de las células se llevó a cabo de la misma manera que anteriormente en (A) usando ratones (Balb/c (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones), C57BL/6 (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones)). Además, se llevó a cabo la purificación y separación magnética de células CD11c positivas de la misma manera que anteriormente en (A). Las condiciones de la MLR se muestran en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11

Condiciones de la MLR

	Muestra
1	MLR alogénica (Balbc / C57BL6)
2	MLR singénica (C57BL6 / C57BL6)
3	MLR singénica (Balbc / Balbc)
4	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) dA40(s)-siCD40(21 nt) desnudo 10 nM
5	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) dA40(s)-siCD40(21 nt) desnudo 100 nM
6	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG 10 nM
7	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG 100 nM
8	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) CD11c (-/+) complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG 400 nM

* En la tabla, a menos que se especifique lo contrario, las células estimuladoras se trataron con MMC.

5 * En la tabla, las células MLR están indicadas como (cepa de ratón de linfocitos usados como estimulador / cepa de ratón de linfocitos usados como respondedor).

Los resultados de la MLR se muestran en la FIG. 3. La FIG. 3 muestra que las células CD11c positivas inducen inmunosupresión de una manera dependiente de la dosis en la MLR en pre-cultivo.

Ejemplo 9

(9-A) MLR *in vitro*

10 En este experimento, se evaluó el efecto inhibitor del crecimiento de linfocitos del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG administrado *in vitro*. El método de preparación de células es el siguiente.

15 Se recogieron células de bazo de ratones (estimuladoras: Balb/c (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones) y respondedoras: C57BL/6 (machos de 7 semanas de edad, 2 ratones)). Se añadieron agentes hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (3 ml de agente hemolizante, 2 min). Se añadieron 8 ml de RPMI, y la mezcla se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante mediante un aspirador, y se añadieron 10 ml de RPMI a estas para suspender las células. Se repitieron la centrifugación y procedimientos posteriores. Se eliminó el sobrenadante mediante un aspirador, después se suspendieron las células en 5 ml de RPMI/FBS al 10%, y se midió el recuento de células. Las células de bazo del estimulador se trataron con mitomicina C (MMC) (37°C, 30 min) (se añadieron 25 µg de MMC a las 10⁷ células finales). Después del tratamiento con MMC, se suspendieron las células en 10 ml de RPMI y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó mediante un aspirador, se le añadieron 10 ml de RPMI, y se repitieron 4 veces la centrifugación y los procedimientos posteriores. Se eliminó el sobrenadante mediante un aspirador, después se suspendieron las células en 3 ml de RPMI/FBS al 10%, se midió el recuento de células y se ajustó la concentración celular para que fuera de 5x10⁶ células/ml. El complejo (o siMOCK) se añadió a las células de bazo (5x10⁶ células para cada condición) del respondedor con el fin de tener una concentración final de 10 nM, y las células se cultivaron durante 4 horas a 37°C. Después de cultivar, se añadieron 10 ml de RPMI al fluido celular para suspender las células, y se centrifugaron las células a 300 x g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante mediante un aspirador, se le añadieron 10 ml de RPMI, y la centrifugación y los procedimientos posteriores se repitieron 2 veces. Las células se suspendieron en 1 ml de RPMI/FBS al 10%, se midió el recuento de células y se ajustó la concentración celular para que fuera de 5x10⁶ células/ml. Se mezclaron en un pocillo 5x10⁵ de las células estimuladoras y 5x10⁵ de las células respondedoras (un volumen final de 200 µl/pocillo), y se cultivaron las células en un ambiente de 37°C y de CO₂ al 5% durante 72 horas. Después de cultivar, se midió el crecimiento celular mediante un ensayo que usa quimioluminiscencia por captación de BrdU (ELISA de Proliferación Celular, BrdU) (Roche Applied Science).

35 Además, se llevó a cabo una MLR *in vitro* en la que las células de bazo estimuladoras se trataron con un siRNA. Se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente excepto que el tratamiento con siRNA se llevó a cabo después del tratamiento con MMC de células estimuladoras y que las células respondedoras después del recuento celular se almacenaron bajo refrigeración sin tratarse hasta el comienzo de la MLR. Las condiciones de la MLR se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Condiciones de la MLR (caso donde la muestra se agrega a células de bazo respondedoras)

	Muestra
1	MLR singénica (C57BL6 / C57BL6)
2	MLR alogénica (Balbc / C57BL6)
3	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) complejo dA40(s)-siCD40/SPG 10 nM
4	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) siMOCK (PBS)

Condiciones de la MLR (caso donde la muestra se agrega a células de bazo estimuladoras)

	Muestra
1	MLR singénica (C57BL6 / C57BL6)
2	MLR alogénica (Balbc / C57BL6)
3	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) complejo dA40(s)-siCD40/SPG 10 nM
4	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) siMOCK (PBS)
5	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) SPG solo (equivalente a siRNA 10 nM de complejo)
6	MLR alogénica (Balbc / C57BL6) dA40(s)-siCD40 desnudo 10 nM

5

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

10

(9-B) MLR *ex vivo*

15

En este experimento, se examinó el comportamiento de siRNA en un cuerpo vivo administrando un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG en ratones respondedores mediante una inyección (i.v.) en la vena caudal, recogiendo células de bazo después de un tiempo de 4 horas, y llevando a cabo la MLR con células de bazo estimuladoras de ratón. El método de preparación de células es el siguiente.

20

Se recogieron células de bazo de ratones (estimuladoras: Balb/c (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones) y respondedoras: C57BL/6 (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones)). Se inyectó un complejo siRNA/SPG por vía intravenosa en los ratones respondedores 4 horas antes de recoger las células del bazo. Se añadieron agentes hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de agente hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se suspendieron en 5 ml de FBS al 10% (DS Pharma Biomedical Co. S.A.) + RPMI (4×10^5 células/pocillo), y las células de bazo estimuladoras se trataron con mitomicina C (MMC) (se añadieron 25 μg de MMC a las 10^7 células finales). Las condiciones de la MLR se muestran en la Tabla 13 a continuación.

25

Tabla 13

Condiciones de la MLR

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

5 Los resultados se muestran en la FIG. 4. En la FIG. 4, el valor (actividad de esplenocitos) obtenido restando el valor numérico de la reacción sinérgica del valor numérico de la reacción alogénica de un control (valor obtenido restando el recuento de células de la muestra 2 del recuento de células de la muestra 6) se representa como el 100%, y se muestra cuánto se inhibe la reacción proliferativa de linfocitos que se obtiene de la reacción alogénica por la administración del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG. Está claro a partir de los resultados que el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibe significativamente la activación de linfocitos mediante la administración a un cuerpo vivo.

10 Ejemplo 10: Captación celular específica para células que expresan Dectina-1

En este experimento, se evaluó la captación específica de un complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647 dentro de células que expresan Dectina-1. El método de prueba es el siguiente.

15 Se recubrió con colágeno Tipo I-P una cámara de 4 pocillos. A continuación, se añadieron 500 µl de células HEK 293 T y células dHEK en una concentración de 1×10^5 células/ml, y se cultivaron durante toda la noche (37°C, CO₂ al 5%). Luego, se reemplazó el medio de cultivo para agregar 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 CO₂ al 5%. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído equilibrado al 10%. Las células fijadas se observaron bajo un microscopio confocal láser (sistema Carl Zeiss LSM710 NLO), y se midió la intensidad de fluorescencia de Alexa 647 exhibida por las células mediante citometría de flujo. Además, el nivel de Dectina-1 expresado en la superficie de las células fijadas se midió mediante citometría de flujo usando un anticuerpo marcado con FITC.

20 Obsérvese que las células HEK 293 T usadas en este experimento son células epiteliales de riñón embrionario humano que no expresan Dectina-1, y las células dHEK son células HEK 293 T que se han transformado para expresar Dectina-1.

25 Los resultados obtenidos se muestran en las FIGS. 5 y 6. La FIG. 5 muestra imágenes de células tratadas con el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647, la FIG. 6A muestra los resultados de medir la intensidad de fluorescencia de Alexa 647 de las células tratadas con el dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647, y la FIG. 6B muestra los resultados de medir la intensidad de fluorescencia de FITC de las células tratadas con el dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647. A partir de los resultados queda claro que la captación del complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG marcado con Alexa 647 se confirma solo en las células dHEK que expresan Dectina-1, y el complejo de ácido nucleico-polisacárido de la presente invención es captado por endocitosis en células con expresión de Dectina-1. También, está claro que el nivel de Dectina-1 expresado en células dHEK disminuye a medida que se absorbe el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG, y por lo tanto la Dectina-1 se absorbe dentro de las células junto con el complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG.

35 Ejemplo 11

(11-A)

40 En este experimento, se examinó el comportamiento de siRNA en un cuerpo vivo administrando un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG en ratones respondedores mediante una inyección (i.v.) en vena caudal, recolectando las células de bazo después de un periodo de 4 horas, y llevando a cabo una MLR con células de bazo de ratón estimuladoras. El método de preparación de células es el siguiente.

Se recogieron células de bazo de ratones (estimuladoras: Balb/c (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones) y respondedoras: C57BL/6 (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones)). Se inyectó un complejo siRNA/SPG por vía

intravenosa en los ratones respondedores 4 horas antes de recoger las células del bazo. Se añadieron agentes hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de agente hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se suspendieron en 5 ml de FBS al 10% (DS Pharma Biomedical Co. S.A.) + RPMI (4×10^5 células/pocillo), y las células de bazo estimuladoras se trataron con mitomicina C (MMC) (se añadieron 25 μg de MMC a las 10^7 células finales). Las condiciones de la MLR se muestran en la Tabla 14 a continuación.

Tabla 14

Condiciones de la MLR

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

Los resultados obtenidos se muestran en la FIG. 7. En la FIG. 7, el valor (actividad de esplenocitos) obtenido restando el valor numérico de la reacción sinérgica del valor numérico de la reacción alogénica de un control (valor obtenido restando el recuento de células de la muestra 2 del recuento de células de la muestra 6) se representa como el 100%, y se muestra cuánto se inhibe la reacción proliferativa de linfocitos resultante de la reacción alogénica mediante la administración del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG. Está claro a partir de los resultados que el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibe significativamente la activación de linfocitos mediante la administración *in vivo*.

(11-B)

En este experimento, se examinó el comportamiento de siRNA en un cuerpo vivo administrando un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG en ratones respondedores y en ratones estimuladores mediante una inyección (i.v.) en vena caudal, recolectando las células de bazo después de un periodo de 12 horas, y llevando a cabo una MLR con células de bazo estimuladoras de ratón. El método de preparación de células es el siguiente.

Se recogieron células de bazo de ratones (estimuladoras: Balb/c (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones) y respondedoras: C57BL/6 (machos de 8 semanas de edad, 3 ratones)). Se inyectó un complejo siRNA/SPG por vía intravenosa en los ratones estimuladores y los ratones respondedores 12 horas antes de recoger las células del bazo. Se añadieron agentes hemolizantes (cloruro de amonio, potasio) para disolver los eritrocitos (5 ml de agente hemolizante, 5 ml de RPMI). Las células se resuspendieron en 5 ml de FBS al 10% (DS Pharma Biomedical Co. S.A.) + RPMI (4×10^5 células/pocillo), y las células de bazo estimuladoras se trataron con mitomicina C (MMC) (se añadieron 25 μg de MMC a las 10^7 células finales). Las condiciones de la MLR se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15

Condiciones de la MLR

	Muestra
1	Medio
2	MLR alogénica Balbc (MMC) / B6 (PBS)
3	MLR alogénica Balbc (MMC) / B6 (20 μg de complejo dA40(s)-siLuc(21 nt)/SPG i.v.)
4	MLR alogénica Balbc (MMC) / B6 (20 μg de dA40(s)-siCD40(21 nt) y SPG presente separadamente en solución i.v.)
5	MLR alogénica Balbc (MMC) / B6 (20 μg de complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG i.v.)
6	MLR singénica B6 (PBS i.v.) / B6 (PBS i.v.)

Los resultados obtenidos se muestran en la FIG. 8. En la FIG. 8, el valor (actividad de esplenocitos) obtenido restando el valor numérico de la reacción sinérgica del valor numérico de la reacción alogénica de un control (valor obtenido restando el recuento de células de la muestra 2 del recuento de células de la muestra 6) se representa como el 100%, y se muestra cuánto se inhibe la reacción proliferativa de linfocitos resultante de la reacción alogénica mediante la administración del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG. También se confirmó a partir de los resultados que, como los resultados anteriores de (9-A), el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG inhibe significativamente la activación de linfocitos mediante la administración *in vivo*.

Ejemplo 12

Se recolectaron células de bazo de ratones Balb/c. Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos en una cantidad de 5×10^6 células/pocillo, y se añadió un medio de cultivo RPMI que contenía 10% en volumen de FBS para alcanzar 1 ml/pocillo. Se añadió a la placa un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG (300 ng/pocillo desde el punto de vista de siRNA) que usó SPG con modificación de la cadena lateral por biotina o una muestra control que contiene PBS como siMock, y se cultivó en un incubador de CO₂ (37°C) durante toda la noche. Se eliminó el medio de cultivo por succión, luego se resuspendieron las células en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) que contiene NaCl 100 mM y EDTA 1 mM y se rompieron durante 15 segundos mediante un sonicador, se añadieron 50 ml partículas magnéticas marcadas con estreptavidina (Roche Applied Science, N° cat. 11641778001), y se llevó a cabo una reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos mientras se agitaba. Se llevó a cabo la centrifugación para recoger un precipitado, el precipitado resultante se resuspendió en 100 µl de tampón dodecil sulfato sódico (SDS), se sometió a electroforesis de poliacrilamida-SDS, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, se llevó a cabo la detección de TRBP2 con un anticuerpo anti-TRBP2 de ratón y un anticuerpo anti-IgG de ratón unido a peroxidasa.

Como resultado, se encontró que dA4(s)-siCD40(21 nt) que está en forma de un complejo con SPG está en una forma compleja con TRBP2.

Ejemplo 13

Se estudió el efecto de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG en aloinjerto cardiaco usando modelo de ratón de trasplante cardiaco 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. Los esquemas de dosificación son los siguientes. Se administró una dosis de 2 µg/cabeza al mismo tiempo al donante 3 días antes (en el día -3) y 1 día después (en el día -1) de la extirpación cardiaca, y se administró una dosis de 2 µg/cabeza al mismo tiempo al ratón receptor 3 días antes (en el día -3) y 1 día antes (en el día -1) del trasplante de la misma manera. En el día 0, se extirpó el corazón del ratón donante, y se trasplantó el corazón quirúrgicamente de manera heterotópica en el ratón receptor. Después del trasplante, se administró cada dosis de 2 µg/cabeza de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG al mismo tiempo adicionalmente a través de la vena de la cola del ratón receptor 1 día (día 1), 3 días (día 3), 5 días (día 5), y 7 días (día 7) después del trasplante cardiaco. Después de la finalización de la administración, se observó el latido cardiaco del corazón trasplantado del ratón receptor a lo largo del tiempo. Además, como una comparación, se realizaron de la misma manera que anteriormente una prueba donde se administró un complejo dA40(s)-siGAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)(21 nt)/SPG en lugar del complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG en la misma cantidad y una prueba donde no se administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG.

Los resultados obtenidos se muestran en la FIG. 9. En la FIG. 9, "complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG" indica un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG, y "complejo siGAPDH/SPG" indica un complejo dA40(s)-siGAPDH(21 nt)/SPG. Como se puede ver en la FIG. 9, cuando se administró un 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 se confirmó la supervivencia de todos los ratones receptores incluso a los 90 días después del trasplante. Por otro lado, 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% en el día 10 después del trasplante.

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

A partir de estos resultados, se cree que el dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG se introdujo eficazmente en células presentadoras de antígeno para suprimir la expresión de CD40 de modo que se suprimió la activación de las células T específicas de antígeno.

Ejemplo 14

Se usaron ratones modelo de trasplante cardiaco ectópico y se examinó un efecto de inmunotolerancia de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG mediante transferencia adoptiva.

5 Específicamente, se administraron 2 μg /cabeza de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a un primer ratón Donante (C57BL/10, macho) y a un primer ratón receptor (CBA/N, macho) a través de la vena de la cola. El régimen de administración es el siguiente. Para primer ratón Donante, se administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a 2 μg /cabeza por dosis 3 días (día -3) y 1 día (día -1) antes del aislamiento del corazón, y para el primer ratón Receptor, se administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a 2 μg /cabeza por dosis 3 días (día -3) y 1 día (día -1) antes del trasplante de la misma manera que se describe anteriormente. En el día 0, se aisló el corazón a partir del primer ratón Donante y el corazón aislado se trasplantó quirúrgicamente en el sitio ectópico en el primer ratón Receptor. Después del trasplante, al primer ratón Receptor, se administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a través de la vena de la cola a 2 μg /cabeza por dosis 1 día (día 1), 3 días (día 3), 5 días (día 5), y 7 días (día 7) después del trasplante cardiaco. Al final de la administración, en el primer ratón Receptor, se observaron los latidos del corazón trasplantado a lo largo del tiempo. Luego, se aislaron células del bazo del primer ratón Receptor en el momento en que los días que el corazón trasplantado estaba latiendo llegaron a 30 días, y a un segundo ratón Receptor (CBA/N, macho), que recibe 5×10^6 células a través de la vena de la cola, se administraron las células de bazo aisladas, seguido del aislamiento del corazón a partir de un segundo ratón Donante (C57BL/10, macho), y el corazón aislado se trasplantó quirúrgicamente en un sitio ectópico en el segundo ratón Receptor (grupo Día 30 A. T. (B10 a CBA)). Al final del trasplante cardiaco ectópico, se observaron los latidos del corazón trasplantado en un segundo ratón Receptor a lo largo del tiempo.

Como grupos comparativos, cada grupo en el caso donde se llevó a cabo el trasplante cardiaco ectópico bajo las mismas condiciones que las condiciones descritas anteriormente, excepto que se usó Balb/c (macho) como un primer ratón Receptor (grupo Día 30 A. T. (Balb/c a CBA)); en el caso donde se llevó a cabo el trasplante cardiaco ectópico bajo las mismas condiciones que las condiciones descritas anteriormente excepto que las células de bazo se aislaron del primer ratón Receptor en el momento en que los días en que latía el corazón trasplantado del primer ratón Receptor llegaron a 100 días (grupo Día 100 A. T. (B10 a CBA)); y en el caso donde se llevó a cabo el trasplante cardiaco ectópico bajo las mismas condiciones que las anteriormente descritas excepto que el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG no se administró al primer ratón Receptor y el primer ratón Donante (grupo Virgen A.T. (B10 a CBA)) se examinó de la misma manera que se describió anteriormente.

30 Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 10. Como se indica claramente en la Fig. 10, en el caso donde se administró un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG, el porcentaje en que el corazón trasplantado del segundo ratón Receptor estuvo latiendo con normalidad durante un largo periodo fue drásticamente alto, por lo tanto el segundo ratón Receptor mantuvo la tasa de supervivencia del 90% incluso a 50 días después del trasplante. Por otro lado, en el grupo Día 30 A. T. (Balb/c a CBA), en el grupo Día 100 A. T. (B10 a CBA) y el grupo Virgen A. T. (B10 a CBA), el corazón trasplantado del segundo ratón Receptor normalmente no latía a los 20 días después del trasplante, de modo que el segundo ratón receptor tenía la tasa de supervivencia del 0% a los 30 días después del trasplante en todos estos grupos.

Está claro a partir de los resultados que un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG tiene una alta capacidad de inducir tolerancia inmune específica de donante.

40 Ejemplo 15

Se examinó un efecto de tolerancia inmune de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG mediante MLR. Específicamente, la MLR se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente método.

Preparación de células del Receptor (Respondedoras)

45 Se recogieron células de bazo de un ratón (CBA, macho) y se seleccionaron células T a partir de las células recogidas usando una columna de enriquecimiento de células T (fibra de nylon) para preparar células Receptoras.

Preparación de células del Donante (Estimuladoras)

Se recogieron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de un ratón (C57BL/10, macho), y las células recogidas se expusieron a radiación de 20 Gy para preparar células estimuladoras.

50 Mientras tanto, se recogieron células de bazo de un ratón (CBA, macho) y luego se separaron las células dendríticas CD11c(+) de las células de bazo obtenidas para preparar células estimuladoras.

Preparación de células Reguladoras

Se administraron a un ratón Donante (C57BL/10, macho) y a un ratón Receptor (CBA, macho) 2 μg /cabeza de un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a través de la vena de la cola. El régimen de administración es el siguiente. El complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG se le administró al ratón Donante a 2 μg /cabeza por dosis 3 días (día -3) y 1

día (día -1) antes del aislamiento del corazón, y al ratón Receptor se le administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a 2 µg/cabeza por dosis 3 días (día -3) y 1 día (día -1) antes del trasplante de la misma manera como se describió anteriormente. En el día 0, se aisló el corazón a partir del ratón Donante y el corazón aislado se trasplantó quirúrgicamente en el sitio ectópico en el ratón Receptor. Después del trasplante, al ratón Receptor, se le administró el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG a través de la vena de la cola a 2 µg/cabeza por dosis 1 día (día 1), 3 días (día 3), 5 días (día 5), y 7 días (día 7) después del trasplante cardiaco. Al final de la administración, en el ratón Receptor, se observaron los latidos del corazón trasplantado a lo largo del tiempo. Luego, se aislaron células del bazo del ratón Receptor en el momento en que los días que el corazón trasplantado latía llegaron a 30 días. Cada una de las células T CD4(+)CD25(-), células T CD11c(-) (macrófago), células T CD4(+)CD25(+) (Treg, célula T reguladora) y células dendríticas CD11c(+) derivadas de CBA tratado con trasplante cardiaco ectópico se aislaron a partir de células de bazo recogidas mediante un clasificador de células para preparar células Reguladoras.

Mientras tanto, se recogieron las células de bazo de un ratón (CBA, macho) que no recibió un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG y que no se trató mediante trasplante cardiaco ectópico. Posteriormente, se separaron las células dendríticas CD11c(+) de CBA Virgen a partir de las células de bazo obtenidas para preparar células Estimuladoras.

Condiciones de la MLR

Se mezclaron células estimuladoras, células reguladoras y células respondedoras en un pocillo que contenía RPMI/FBS al 10% y se cultivó la mezcla a 37°C en un entorno de CO₂ al 5%. Después del cultivo, se midió la proliferación de las células respondedoras mediante un ensayo que usa quimioluminiscencia mediante captación de BrdU (ELISA de Proliferación Celular, BrdU) (Roche Applied Science). Las condiciones de la MLR se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16

	Células Respondedoras	Células Estimuladoras	Células Reguladoras
Condición 1	Células T derivadas de CBA		
Condición 2	Células T derivadas de CBA	BMDC derivadas de C57BL/10	
Condición 3	Células T derivadas de CBA	Células dendríticas CD11c(+) derivadas de CBA	
Condición 4	Células T derivadas de CBA	BMDC derivadas de C57BL/10	Células T CD4(+)CD25(-) derivadas de CBA tratado con trasplante cardiaco ectópico
Condición 5	Células T derivadas de CBA	BMDC derivadas de C57BL/10	Células T CD11c(-) derivadas de CBA tratado con trasplante cardiaco ectópico
Condición 6	Células T derivadas de CBA	BMDC derivadas de C57BL/10	Células T CD4(+)CD25(+) derivadas de CBA tratado con trasplante cardiaco ectópico
Condición 7	Células T derivadas de CBA	BMDC derivadas de C57BL/10	Células dendríticas CD11c(+) derivadas de CBA Virgen
Condición 8	Células T derivadas de CBA	BMDC derivadas de C57BL/10	Células T CD11c(+) derivadas de CBA tratado con trasplante cardiaco ectópico

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 11. Se encuentra a partir de los resultados que en el caso donde se usaron células dendríticas CD11c(+) derivadas de CBA Virgen como células Reguladoras, las células Receptoras se incrementaron enormemente. Por el contrario, en el caso donde se usaron como células Reguladoras células T y células dendríticas derivadas de CBA que recibieron un complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG y se trató con un trasplante cardiaco ectópico, se inhibió el aumento de células Receptoras. Especialmente en el caso donde se usaron células T CD4(+)CD25(+) y células dendríticas CD11c(+) derivadas de CBA tratado con trasplante cardiaco ectópico, el aumento de células Receptoras se inhibió significativamente.

De los resultados de la MLR se deduce que el complejo dA40(s)-siCD40(21 nt)/SPG tiene un alto efecto de tolerancia inmune específica de donante.

Obsérvese que las secuencias de nucleótidos de siLuc y siCD40 usadas en los Ejemplos 1 a 15 son como se muestran en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17

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 AGAAUC 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.

5 <120> Agente para la mejora del injerto inmunológico

<130> PCT0023P

<150> PCT/JP2011/68265

<151> 2011-08-10

10 <150> PCT/JP2012/53583

<151> 2012-02-15

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

15 <212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena sentido de siLuc(21nt)

<400> 1

20 ggccuuucac uacuccuacg a 21

<210> 2

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cadena antisentido de siLuc(21nt)

<400> 2

guaggaguag ugaaggcca g 21

<210> 3

30 <211> 27

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena sentido de siLuc(27nt)

35 <400> 3

cuggccuuuc acuacuccua cgagcac 27

<210> 4

<211> 27

- <212> ARN
<213> Artificial
- <220>
<223> Cadena antisentido de siLuc(27nt)
- 5 <400> 4
gugcucguag gaguagugaa aggccag 27
- <210> 5
<211> 21
<212> ARN
10 <213> Artificial
- <220>
<223> Cadena sentido de siCD40(21nt)
- <400> 5
ggagggcacc gcagaaucau u 21
- 15 <210> 6
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial
- <220>
20 <223> Cadena antisentido de siCD40(21nt)
- <400> 6
ugauucugcg gugccuccu u 21
- <210> 7
<211> 27
25 <212> ARN
<213> Artificial
- <220>
<223> Cadena sentido de siCD40(27nt)
- <400> 7
30 aaggagggca cgcagaauc agacacu 27
- <210> 8
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial
- 35 <220>
<223> Cadena antisentido de siCD40(27nt)
- <400> 8
agugucugau ucugcggugc ccuccuu 27
- <210> 9
<211> 20
40 <212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> Cebador directo para CD40 de ratón
- 45 <400> 9
caaggattgc gaggcatgtg 20
- <210> 10
<211> 25
<212> ADN
50 <213> Artificial

ES 2 684 969 T3

<220>

<223> Cebador inverso para CD40 de ratón

<400> 10

tgacagacgg tatcagtggt ctgag 25

5

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador directo para beta-actina de ratón

<400> 11

tggcaccag cacaatgaa 19

<210> 12

<211> 25

15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para beta-actina de ratón

<400> 12

20 ctaagtcata gtccgcctag aagca 25

REIVINDICACIONES

1. Un agente que contiene un complejo de ácido nucleico-polisacárido de un siRNA para un factor coestimulador y esquizofilano para usar en terapia de trasplante de una célula, tejido u órgano que induce tolerancia inmunológica específica de donante.
- 5 2. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se añade polidesoxiadenina a al menos un extremo de una cadena sentido y una cadena antisentido del siRNA.
3. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde al menos una porción de los enlaces fosfodiéster de la polidesoxiadenina han reaccionado con fosforotioato.
- 10 4. El agente para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la célula, tejido u órgano donante es una célula derivada de médula ósea.
5. El agente para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el factor coestimulador es el expresado en la célula que expresa Dectina-1.
6. El agente para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el factor coestimulador es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en CD40, B7.1 y B7.2.
- 15 7. El agente para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el factor coestimulador es CD40.
8. El agente para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la terapia de trasplante es trasplante de riñón, trasplante de corazón, trasplante de pulmón, trasplante de médula ósea, trasplante de piel, o trasplante de córnea.

20

Fig.1

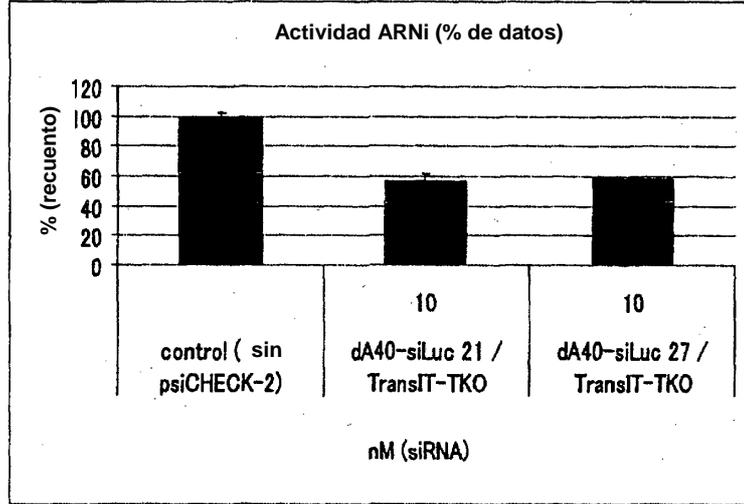


Fig.2

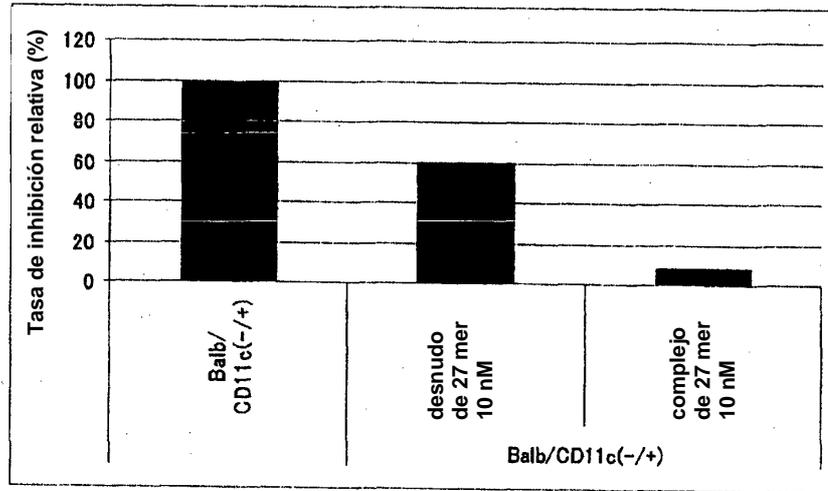


Fig.3

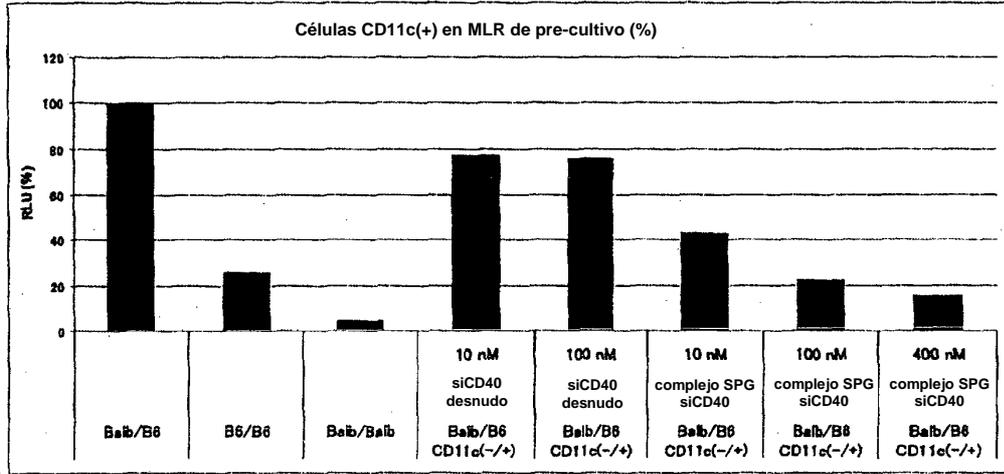


Fig.4

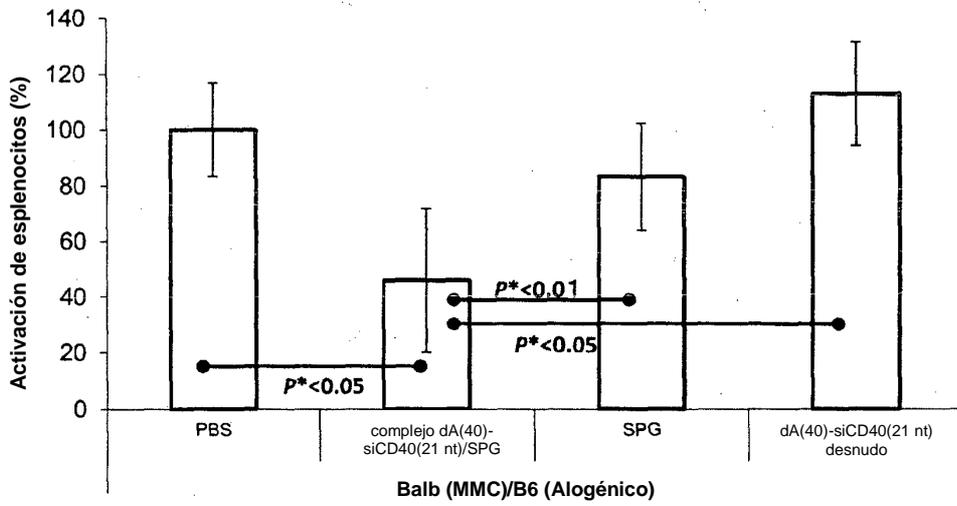
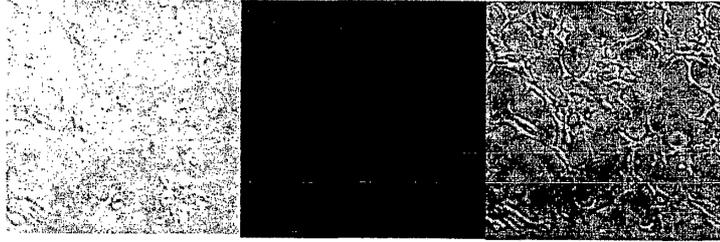


Fig.5

Célula HEK239T

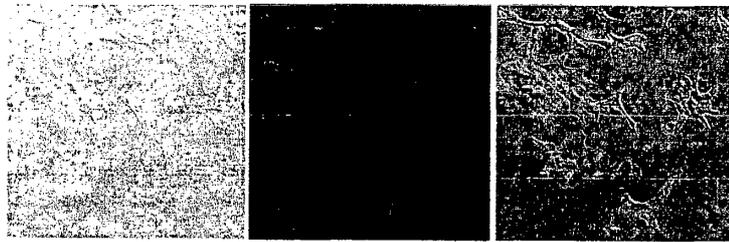


Campo óptico

Fluorescencia

Fusión

Célula dHEK



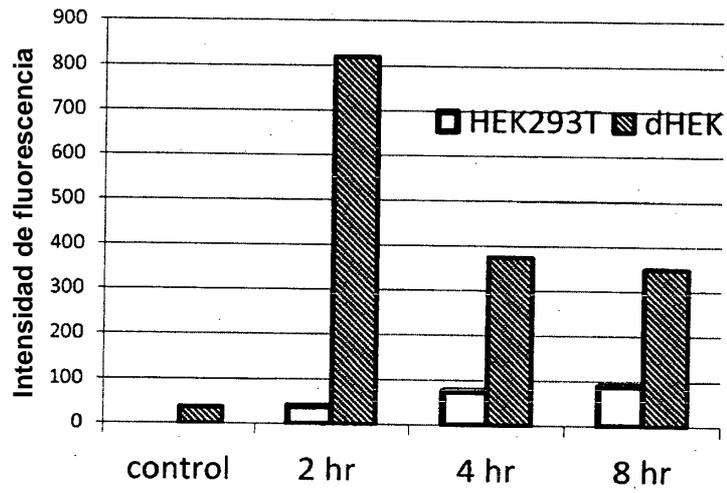
Campo óptico

Fluorescencia

Fusión

Fig.6

A



B

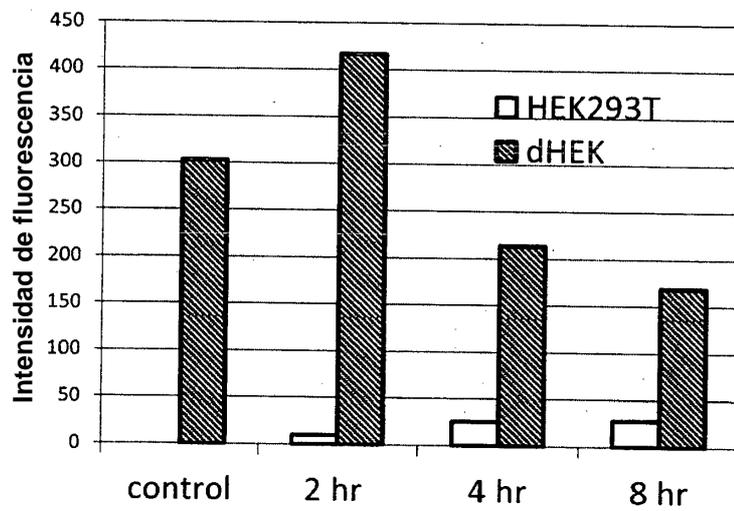


Fig.7

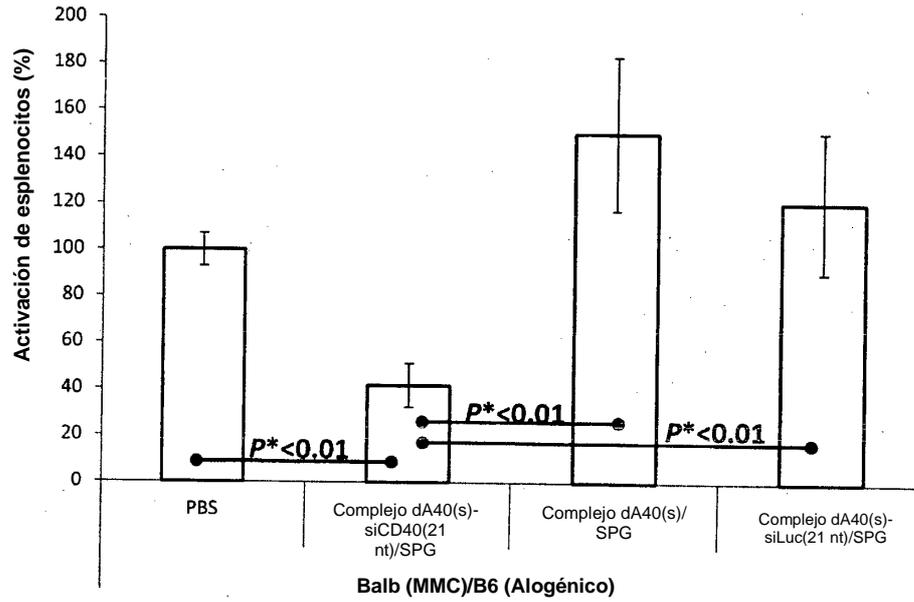


Fig.8

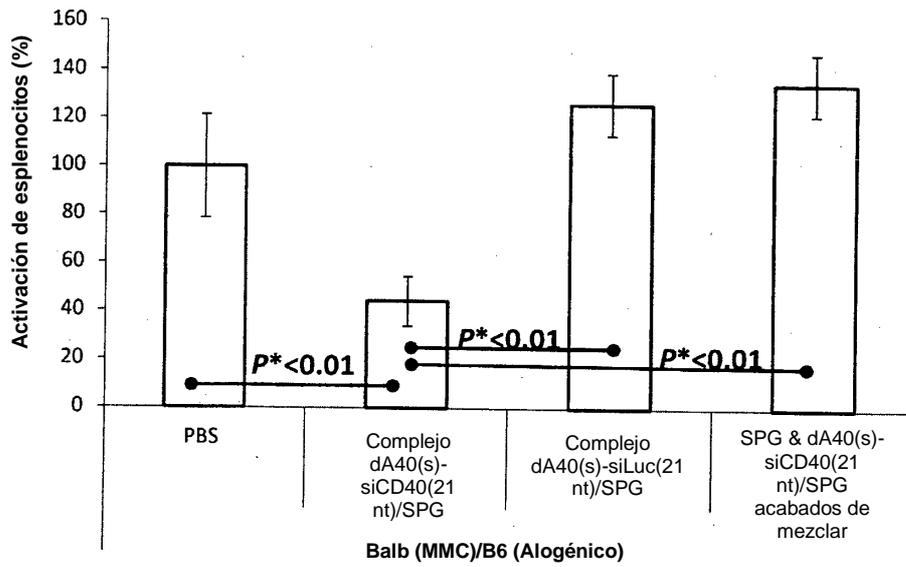


Fig. 9

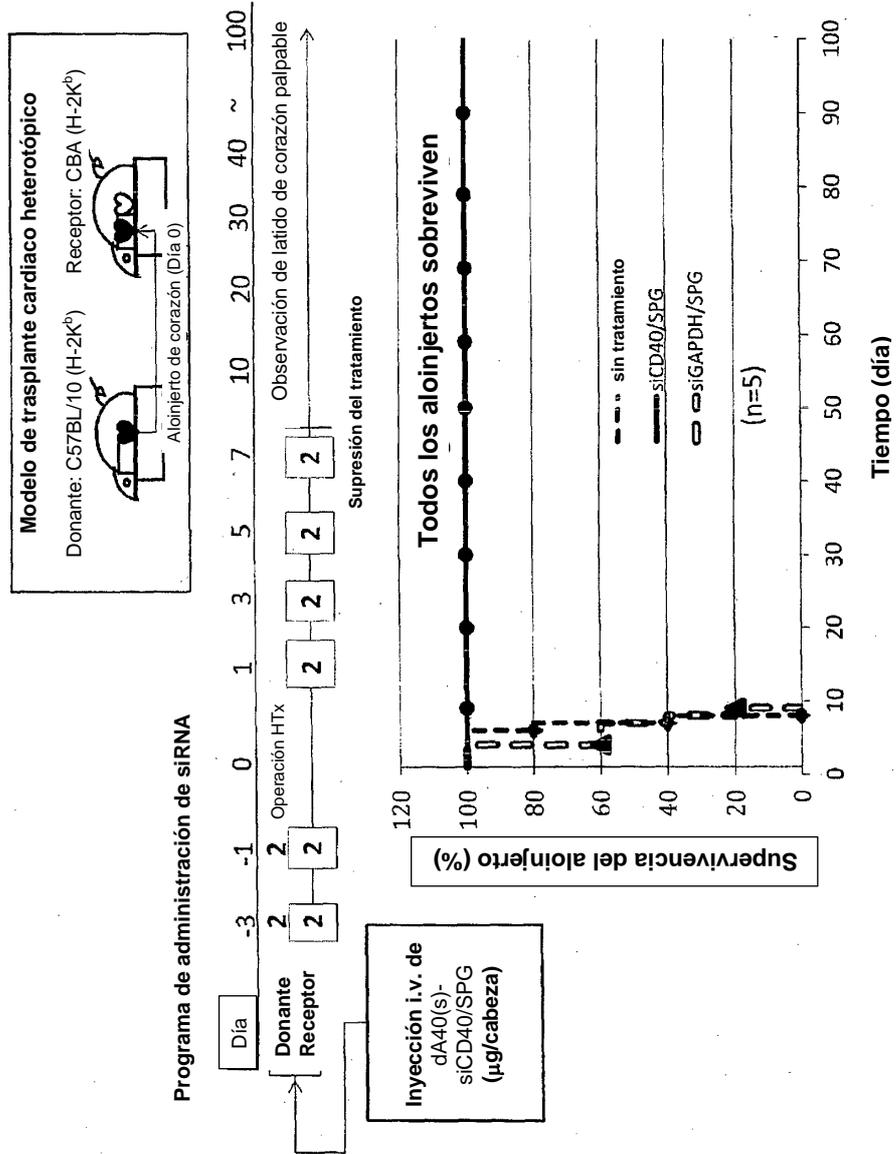


Fig.10

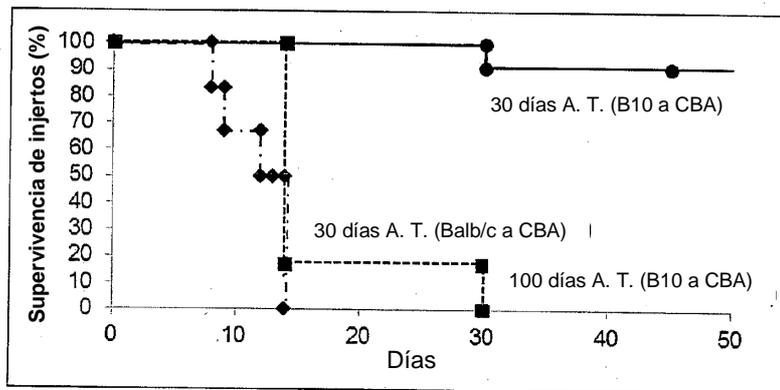


Fig.11

