

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 762**

21 Número de solicitud: 201031026

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **02.07.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
26.01.2012

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Berzal Herranz, Alfredo y**
Reyes Darias, José Antonio

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método y kit para la detección de la activación de interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón.**

57 Resumen:

Método y kit para la detección de la activación de interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón.

La presente invención se refiere a una combinación de cebadores y un método para la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón. La amplificación se realiza mediante RT-PCR multiplex (mRT-PCR) donde los cebadores empleados amplifican los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β . Además, la presente invención incluye un kit con la combinación de los cebadores mencionados y otros componentes.

ES 2 372 762 A1

DESCRIPCIÓN

Método y kit para la detección de la activación de interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón.

5 La presente invención se refiere a una combinación de cebadores y un método para la detección y/o cuantificación de la activación del sistema interferón y de la respuesta inflamatoria independiente de interferón producida por la liberación de citoquinas proinflamatorias. La amplificación se realiza mediante RT-PCR multiplex (mRT-PCR) donde los cebadores empleados amplifican los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β . Además, la presente invención se refiere a un kit con la combinación de los cebadores mencionados y otros componentes.

10 **Estado de la técnica anterior**

Los ácidos nucleicos pueden inhibir la expresión génica o actuar como agentes terapéuticos. Sin embargo, muchos de los ácidos nucleicos, incluidos los RNAs de cadena simple (ssRNA), RNAs de cadena doble (dsRNA) y oligo-desoxirribonucleótidos (ODN) que contienen en su secuencia dinucleótidos CpG no metilados (CpG ODN), pueden estimular el sistema interferón o la respuesta inflamatoria independiente de interferón producida por la liberación de citoquinas proinflamatorias en los mamíferos.

Así, pequeños ssRNA pueden desencadenar una potente inducción de interferón en una variedad de líneas celulares, de la misma forma, pequeños RNA interferentes (siRNA) sintéticos o expresados a partir de plásmidos o vectores virales pueden inducir una importante respuesta mediada por interferón cuando se expresan en determinadas líneas celulares. Los CpG ODN sintéticos activan las células inmunes a través del receptor Toll-like 9 (TLR-9) estimulando el sistema interferón o la respuesta inflamatoria independiente de interferón producida por la liberación de citoquinas proinflamatorias. Estos CpG ODN se han dividido en tres clases, A, B y C, en función de su modo inmunoestimulador y su secuencia. Los CpG ODN de las clases A y C inducen altos niveles de interferón- α (IFN- α), en contraste, los CpG ODN de la clase B inducen preferentemente la producción de las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-8 e IL-10, pero son relativamente pobres inductores del IFN- α (Vollmer J *et al.*, 2004 J Endotoxin Res. 10(6) pag. 431-438; Agrawal S y Kandimalla ER, 2007. Biochemical Society Transactions 35, 6). A diferencia de las IL-6 e IL-10, la IL-8 (citoquina proinflamatoria) es inducida en células no pertenecientes al sistema inmune, que expresan de forma estable el TLR-9 (Hemmi H *et al.*, 2000 Nature. 7, 408(6813) pag. 740-745).

La inducción de citoquinas proinflamatorias y/o interferón (IFN) por la transfección o la administración *in vivo* de ácidos nucleicos pueden influir de manera significativa en las aplicaciones *ex vivo* o *in vivo* de estas estrategias de inactivación de la expresión génica o terapéuticas, debido a los efectos inespecíficos asociados con la respuesta del sistema interferón y/o a la toxicidad relacionada con la respuesta inflamatoria independiente de interferón desencadenada por la liberación de citoquinas proinflamatorias. Por ello, es recomendable, para cualquier ácido nucleico, que se esté utilizando con fines de inhibición de la expresión génica o terapéutica, mediante algún método eficaz, determinar si se produce o no la activación de la respuesta interferón y la detección de la expresión de citoquinas proinflamatorias. Esta comprobación es esencial para asignar inequívocamente a un determinado ácido nucleico un efecto inhibitor específico o terapéutico.

La activación del interferón implica la inducción de más de 300 genes estimulados por interferón (ISGs). La forma de saber si existe o no activación de la respuesta del interferón es analizando los niveles de los genes o proteínas inducidos por dicha respuesta. El desarrollo de kits comerciales proporciona un procedimiento para evaluar la existencia o no de efectos no específicos de activación de la respuesta dependiente de interferón, analizando los niveles de algunas proteínas (mediante análisis de western o Elisa) o genes (mediante PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) que son inducidos como consecuencia de la activación del sistema del interferón.

Actualmente sólo existe un kit en el mercado capaz de detectar mediante RT-PCR si pequeños siRNAs pueden afectar la respuesta dependiente de interferón, analizando, mediante dos pasos sucesivos, la expresión de los genes OAS1, OAS2, MX1, IFITM1 e ISGFy (System biosciences "Interferón Response Detection Kit for validation of siRNA experiments" (Cat. #SI300A-1) User Manual).

La RT-PCR es la técnica más sensible que existe, para determinar la presencia o ausencia de un determinado RNA molde en una mezcla. La metodología usada para realizar una RT-PCR es realizar una reacción RT bajo óptimas condiciones y luego usar una fracción de la misma como molde para realizar una PCR convencional en un tubo diferente. Este procedimiento ha sido denominado RT-PCR en dos pasos o en dos tubos. Sin embargo, otra posibilidad más sencilla, es añadir todos los componentes necesarios para la RT y la PCR en un mismo tubo para realizar dichas reacciones en un solo paso y sin interrupción. Este procedimiento más simple se denomina RT-PCR en un solo paso o en un solo tubo y decrece considerablemente la probabilidad de la contaminación debida a la manipulación durante el proceso. Esta técnica monoespecífica permite la detección de un RNA diana, requiriendo, por tanto, tantas reacciones como número de RNAs queramos detectar.

Por otro lado, la mRT-PCR no sólo posee la sensibilidad de la técnica RT-PCR sino que además permite la detección y cuantificación simultánea de dos o más genes diana de una muestra de RNA en una misma reacción haciendo que el procedimiento sea mucho más rápido, de menor coste, y más reproducible debido a que exige una menor manipulación con lo que se minimizan errores y evita contaminaciones en este paso (Koch, 2004. Nat Rev Drug Discov, Vol. 3, 749-761). Sin embargo, debido a la complejidad que supone esta técnica a la hora de encontrar una combina-

ción de cebadores específica que permita la amplificación simultánea de los genes seleccionados para la detección, actualmente sólo se dispone de un kit comercial basado en la mRT-PCR (Hemavision-7 System DNA Technology A/S, Aarhus, Denmark) de aplicación rutinaria en el diagnóstico molecular hematopatológico, el cual detecta simultáneamente las siete translocaciones más frecuente en la leucemia. Un estudio científico demostró una eficacia del 100% de este kit en el análisis de muestras de pacientes (Salto-tellez *et al.*, 2003. Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 5, No. 4, 231-236).

También se debe tener en cuenta que la sensibilidad de las diferentes líneas celulares a la activación de genes inducidos en respuesta a la activación del sistema del interferón puede variar significativamente. El tipo celular, las condiciones de crecimiento y el número de genes pueden afectar la susceptibilidad, nivel y extensión de la activación de la respuesta del interferón. Por tanto, cuanto mayor sea el número de genes o proteínas analizados y cuanto más sensibles sean estos genes a la estimulación, mayor será la probabilidad de asegurarnos si existe o no una activación del interferón.

A todos estos factores, hay que añadir que, además de respuestas dependientes de interferón también se pueden inducir respuestas inflamatorias que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias como por ejemplo IL-8, independientes del sistema interferón.

En este contexto, es necesario desarrollar un método capaz de identificar de una manera reproducible, rápida y eficaz cualquier respuesta inmunológica asociada con la introducción de ácidos nucleicos y otros productos en los distintos tipos de líneas celulares usadas en tratamientos, como por ejemplo, la terapia génica.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una combinación de cebadores y a un método para la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón. La amplificación se realiza mediante RT-PCR (del inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) multiplex (mRT-PCR) donde los cebadores empleados amplifican simultáneamente los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β . Además, la presente invención incluye un kit con la combinación de los cebadores mencionados y otros componentes.

La presente invención proporciona, por tanto, un procedimiento capaz de identificar de forma simultánea y en un solo paso, genes que se asocian tanto con la activación de interferón como con la respuesta inflamatoria independiente de interferón, basado en la técnica de mRT-PCR utilizando para ello una combinación de cebadores específica.

El método aquí descrito utiliza una combinación de cebadores definida que proporcionan la ventaja de analizar simultáneamente, en un sólo paso, los niveles de expresión relativa de tres genes implicados en la respuesta mediada por interferón (OAS2, ISG56 e IFN α o IFN β), así como del gen de la citoquina proinflamatoria, la interleuquina 8 (IL-8), y de un control interno, reduciendo considerablemente el riesgo de contaminación.

Aunque el número de genes que podrían servir de candidatos y, por tanto, el número de combinaciones de cebadores a utilizar para llevar a cabo de la detección por mRT-PCR es muy amplio, no todas estas combinaciones son posibles, así, por ejemplo se comprobó que si se incluía el gen OAS-1, de características similares a OAS-2, los resultados no eran los correctos en todos los casos, de igual forma se tuvieron que ensayar distintas parejas de cebadores para cada uno de los genes hasta conseguir los resultados esperados, lo que pone de manifiesto la complejidad que requiere encontrar la combinación de cebadores adecuadas para conseguir analizar el efecto inductor de la respuesta del interferón y la citoquina proinflamatoria IL-8 que los distintos tipos de ácidos nucleicos u otras moléculas utilizados, por ejemplo, con fines terapéuticos, son capaces de provocar en los distintos tipos celulares.

Mientras que los genes OAS2, ISG56 e IFN α (o IFN β), son tres de los genes de mayor sensibilidad a la inducción por la activación de la respuesta del interferón a ácidos nucleicos, la detección de la citoquina proinflamatoria IL-8 proporciona una gran ventaja adicional a la invención debido a que amplía el espectro de los tipos celulares a los que puede ser aplicado este kit frente a lo ya existente en el estado de la técnica permitiendo determinar si un determinado ácido nucleico u otro producto es inmunoestimulador sin necesidad de utilizar células del sistema inmune, puesto que, como ya se ha comentado anteriormente la IL-8, a diferencia de otras citoquinas, es inducida en células no pertenecientes al sistema inmune.

Por tanto, el procedimiento aquí descrito, basado en la mRT-PCR, es útil para analizar la respuesta que provocan en la célula tanto ácidos nucleicos como cualquier otro producto o manipulación celular capaz de inducir en ella una respuesta inmunológica.

Debido a la complejidad que requiere el método que aquí se propone para dar lugar a una detección efectiva y reproducible en un solo paso de la respuesta inmune que induce un determinado ácido nucleico en una célula, la combinación de cebadores que se emplea es muy específica, de forma que permite la detección simultánea de los 5 genes en una sola reacción. En el apartado de ejemplos de la presente invención se detallan otros parámetros optimizados para llevar a cabo el método como la concentración de Mg⁺², la temperatura de anillamiento, el número de ciclos y las cantidades relativas de cada una de las 5 parejas de cebadores que describen el mejor modo de llevar a cabo el método de la invención.

ES 2 372 762 A1

Así, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de los cebadores directos SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 para la detección y/o cuantificación de:

- 5 a. los genes OAS2, ISG56 e IFN α o IFN β involucrados en la activación del interferón y,
 - b. el gen IL-8 involucrado en la respuesta inflamatoria independiente de interferón producida por la liberación de citoquinas proinflamatorias,
- 10 en una muestra biológica aislada de un sujeto o en un cultivo celular. Preferentemente el sujeto es un mamífero.

En una realización preferida se usa además el cebador directo SEQ ID NO: 11 y el cebador reverso SEQ ID NO: 12 para la detección y/o cuantificación del gen control GAPDH.

15 El término "cebador" tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a un oligonucleótido de secuencia específica y complementaria a una secuencia nucleotídica diana que es capaz de hibridar con esta última y servir como punto de iniciación para una polimerización nucleotídica catalizada por una ARN polimerasa, una ADN polimerasa o una transcriptasa reversa (RT).

20 Para amplificar un fragmento por PCR son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a la hebra molde (cebador directo) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas amplificaciones con una enzima ARN/ADN polimerasa termorresistente, un fragmento que pueda ser detectado y/o cuantificado. Un paso previo puede ser la retrotranscripción de la secuencia situada aguas arriba del cebador reverso mediante el empleo de una enzima retrotranscriptasa (RT). Preferentemente, en la presente invención se utiliza la técnica mRT-PCR. Esta técnica consiste en realizar la reacción de RT y la de amplificación por PCR en el mismo paso, de forma que permite analizar fácilmente, en menor tiempo y sin errores debidos a contaminación por manipulación durante el proceso, los tres genes implicados en la respuesta mediada por interferón, el gen de la citoquina proinflamatoria y el control interno.

30 Los cebadores que forman parte de los usos descritos, han sido diseñados siguiendo criterios que se detallan en los ejemplos (ver ejemplo 2.1). Mediante estos cebadores es posible detectar tanto los genes que se estimulan si la célula sufre una respuesta mediada por interferón como los que se estimulan si la respuesta de la célula es una respuesta inflamatoria independiente de interferón. Así, los genes que pueden ser detectados son:

- 35 • el gen OAS2, detectado mediante la pareja de cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2, este gen codifica para una proteína esencial que es inducida por interferón y está implicada en la respuesta inmune innata contra infecciones virales. Estas moléculas activan la RNasa L, dando lugar a la degradación del ARN viral y la inhibición de la replicación viral. Los tres miembros conocidos de esta familia de genes se encuentran en un clúster en el cromosoma 12.
 - 40 • el gen ISG56 o IFIT1, detectado mediante la pareja de cebadores SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4, fuertemente inducido en respuesta a interferón, dsRNAs o infección por virus. En humanos existen cuatro miembros que pertenecen a esta familia de genes: IFIT-1 o ISG56, IFIT-2 o ISG54, IFIT-4 o ISG60 e IFIT-5 o ISG58,
 - 45 • el gen IFN α o el gen IFN β , detectados mediante la pareja de cebadores SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 o la pareja de cebadores SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10 respectivamente, que constituyen el interferón tipo I. Los interferones de tipo I son una familia de polipéptidos con actividad citoquina que se descubrieron originalmente por su actividad inhibidora en la infección viral de líneas celulares *in vitro* (Pestka *et al.*, 2004). Dependiendo de la homología de sus secuencias, los interferones de tipo I se clasifican en interferón alfa (IFN α) e interferón beta (IFN β), ambos tienen una actividad biológica muy similar siendo ejemplos de la llamada respuesta inmune innata y sus estructuras moleculares son muy parecidas. La función de estas citoquinas es muy importante en la respuesta inmune contra múltiples tipos de infecciones virales, ya que inician mecanismos que activan la muerte inducida por apoptosis de las células infectadas y la inhibición de la replicación viral, a la vez que se favorece la presentación de antígenos. Recientemente, se ha descrito que también llevan a cabo sus funciones mediante la activación directa de células NK, B y T, así como de células dendríticas en la respuesta inmune (Le Bon A *et al.*, 2006; Le Bon A *et al.*, 2003). El IFN α es producido principalmente por los leucocitos infectados por virus, mientras que el IFN β es producido por fibroblastos infectados por virus. El IFN α también estimula la síntesis de proteínas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I), estas moléculas están presentes en las membranas de todas las células con núcleo y participan en la presentación de antígenos (en particular de antígenos virales) para que sean reconocidos por el sistema inmune y,
 - 50 • el gen IL-8, detectado mediante la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6, codifica la proteína IL-8 que es una quimioquina de naturaleza proinflamatoria producida por macrófagos y otros tipos de células como fibroblastos, células endoteliales y monocitos, que no se induce en respuesta a interferón. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos. Amplifica la respuesta inflamatoria local. A través de una cadena de reacciones bioquímicas, IL-8 es secretada actuando como un importante mediador de la respuesta inmune del sistema inmunitario innato.
- 65

ES 2 372 762 A1

La expresión “detección y/o cuantificación”, tal y como se emplea en la descripción de la invención, hace referencia a la detección de la presencia y/o a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa. Preferentemente la detección y/o cuantificación se realiza en cultivos celulares, donde el término “cultivo celular” hace referencia al cultivo de células aisladas. Preferentemente las células proceden de organismos eucariotas pluricelulares, más preferiblemente dichos organismos son mamíferos. Las células pueden proceder, pero sin limitarse, de una muestra biológica aislada, donde la muestra biológica es, pero sin limitarse, un tejido o un fluido biológico como por ejemplo plasma sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo o pus.

Debido a que ácidos nucleicos y otras moléculas usadas como agentes terapéuticos, son capaces de activar el interferón o la respuesta inflamatoria independiente de interferón provocando efectos inespecíficos en las células, resulta necesario evaluar si estas moléculas inducen o no este tipo de respuestas en las células. Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al método, en adelante primer método de la invención, para determinar la capacidad de un agente para provocar una respuesta inmune que comprende:

- a. seleccionar un cultivo celular que previamente ha sido tratado con dicho agente,
- b. amplificar de forma simultánea los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , utilizando los cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10 y,
- c. detectar y/o cuantificar los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , en el cultivo celular seleccionado.

La expresión “agente”, tal y como se emplea en la descripción de la invención, hace referencia a cualquier molécula capaz de activar el interferón o la respuesta inflamatoria independiente de interferón, provocando así una respuesta inmunológica en la célula. A su vez, la expresión “respuesta inmune” o “respuesta inmunológica”, según se emplea en la presente descripción hace referencia a la forma en la que el cuerpo reconoce y se defiende de dichos agentes activando el interferón y/o la respuesta inflamatoria independiente de interferón.

Los ácidos nucleicos, por ejemplo, se han visto que pueden provocar la inducción del sistema interferón y/o de la respuesta inflamatoria independiente de interferón, desencadenando efectos inespecíficos que pueden afectar sensiblemente a su efectividad como agentes terapéuticos. Además, otros productos o manipulación celular capaces de inducir una respuesta inmunológica en las células también pueden ser detectados.

El agente se puede seleccionar, pero sin limitarse, de entre la lista que comprende: ácidos nucleicos, sustancias transfectantes (como lípidos catiónicos, nanodendrómicos y cualquier otro agente utilizado para introducir ácidos nucleicos en células) y aditivos químicos (como por ejemplo cualquier componente del medio de cultivo o que se añade al mismo para enriquecerlo como fosfato, aminoácidos, entre otros o también cualquier agente químico que pueda acompañar al ácido nucleico o mezcla de transfección como sales). Preferentemente el agente es un ácido nucleico donde este ácido nucleico puede ser, pero sin limitarse, un oligodesoxirribonucleótido, un ssRNA o un dsRNA. Preferentemente el dsRNA es siRNA.

Por tanto, mediante este primer método de la invención se obtienen datos útiles para evaluar si, por ejemplo pero sin limitarse, un ácido nucleico se podría utilizar en terapia génica sin producir efectos secundarios relacionados con la estimulación del interferón y/o la respuesta inflamatoria independiente de interferón en el sujeto, confirmando de esta manera que los datos que se obtienen al someter a las células a distintos tratamientos, como por ejemplo terapia génica, que implican la introducción de ácidos nucleicos u otras moléculas en las células, son específicos de tales tratamientos y no debidos a una respuesta mediada por la activación de interferón o la respuesta inflamatoria independiente de interferón.

Para llevar a cabo la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y la respuesta inflamatoria según se describe en el paso (b) del primer método de la invención, se llevan a cabo amplificaciones de forma simultánea utilizando los pares de cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 (cebador directo/cebador reverso); SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4 (cebador directo/cebador reverso); SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 (cebador directo/cebador reverso) y o bien SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 (cebador directo/cebador reverso) o bien SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10 (cebador directo/cebador reverso). En una realización preferida, además también se lleva a cabo la amplificación del gen control GAPDH utilizando los pares de cebadores SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12 (cebador directo/cebador reverso).

En primer lugar se sintetiza una secuencia de ADN codificante (cDNA) de la región aguas arriba del lugar de hibridación del cebador reverso con el ARN del paso (a) mediante la reacción de retrotranscripción (RT). La síntesis de cDNA se realiza por medio de cualquier enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa (RT) que utiliza el ARN aislado de la muestra biológica y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6 y o bien SEQ ID NO: 8 o bien SEQ ID NO: 10, además del cebador reverso SEQ ID NO: 12, que harán de iniciadores para obtener el cDNA de cadena simple o monocatenario complementario a la secuencia de ARN del gen correspondiente. En segundo lugar se obtienen fragmentos de ADN bicatenarios amplificados mediante PCR utilizando como molde el cDNA descrito y los pares de cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 y o bien SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 o bien SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10, además del par de cebadores SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12. Este tipo de PCR se denomina RT-PCR. Debido a que, preferentemente la detección

y/o cuantificación simultánea de los genes diana se realiza mediante mRT-PCR, en un solo paso o un solo tubo y sin interrupción, todos los componentes necesarios para ambos procesos (RT y PCR) son añadidos al inicio. Para la síntesis del cDNA y las posteriores amplificaciones es necesaria la presencia de entre otros componentes: ADN polimerasa termorresistente, cloruro de magnesio en una concentración determinada y tampones que creen las condiciones físico-químicas adecuadas para que funcionen todos los componentes y se consiga con ello la amplificación (ver ejemplo 2.1). De esta forma se obtiene una mezcla de reacción que contiene los fragmentos amplificados de cada uno de los genes (si la muestra los contiene), para seguidamente poder ser detectados y/o cuantificados.

Para determinar si ácidos nucleicos y otras moléculas usadas como agentes terapéuticos son capaces de activar el interferón y/o la respuesta inflamatoria independiente de interferón se puede además comparar la desviación de los resultados obtenidos en el apartado (c) del primer método de la invención con respecto a unos controles o valores de referencia. En este caso, los controles son aquellas amplificaciones que proceden de muestras no tratadas con el agente terapéutico (ácidos nucleicos u otras moléculas) y que por tanto, los genes involucrados en la activación del interferón y/o la respuesta inflamatoria independiente de interferón están ausentes (controles negativos que corresponden con los carriles control 1, 4, 6 y 8 en la Figura 1). La medida de la desviación de las amplificaciones obtenidas de las muestras problema respecto de los controles, puede llevarse a cabo por ejemplo, pero sin limitarse, mediante comparación de la presencia o ausencia de bandas. Esta desviación puede ser atribuida a la presencia o ausencia de los genes OAS2, ISG56, IL-8 y/o IFN α o IFN β en las muestras analizadas.

El método además incluye un control interno (el gen de GAPDH) que indica que las reacciones se han realizado en condiciones óptimas y que no hay activación del interferón ni liberación de IL-8. Este control interno es amplificado gracias al par de cebadores SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles, en adelante segundo método de la invención, para la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y de la respuesta inflamatoria independiente de interferón que comprende:

- a. obtener una muestra biológica aislada de un sujeto o seleccionar un cultivo celular,
- b. amplificar de forma simultánea los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , utilizando los cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10 y,
- c. detectar y/o cuantificar los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , en la muestra biológica aislada o en el cultivo celular seleccionado.

La muestra biológica es aislada de un sujeto, donde el sujeto es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente humano o animal, para llevar a cabo el resto de pasos del método "in vitro". La muestra biológica puede proceder de cultivos celulares, tejidos y/o fluidos biológicos del sujeto, donde los fluidos biológicos se seleccionan, pero sin limitarse de la lista que comprende plasma sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo o pus, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere al método, en adelante tercer método de la invención, de obtención de datos útiles para diagnosticar una respuesta inmunológica en un sujeto o cultivo celular, es decir, se refiere al método de diagnóstico de la respuesta inmunológica en un sujeto o cultivo celular que comprende además de los pasos (a), (b) y (c) del segundo método de la invención:

- d. comparar los resultados obtenidos en (c) con unos valores de referencia para encontrar una desviación significativa y,
- e. atribuir la desviación a la presencia de respuesta inmunológica en el sujeto o cultivo celular.

Para encontrar una desviación significativa, se compara la desviación de los resultados obtenidos en el apartado (c) con respecto a unos controles o valores de referencia. Los controles o valores de referencia son, pero sin limitarse, aquellas muestras que no presentan genes involucrados en la activación del interferón o la respuesta inflamatoria independiente de interferón. La medida de la desviación de las amplificaciones obtenidas de las muestras problema respecto de los controles, puede llevarse a cabo por ejemplo, pero sin limitarse, mediante comparación de la presencia o ausencia de bandas. Esta desviación puede ser atribuida a la presencia o ausencia de los genes OAS2, ISG56, IL-8 y/o IFN α o IFN β en las muestras analizadas.

En una realización preferida del segundo y tercer método de la invención además se amplifica el gen control GAPDH utilizando los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. Como hemos comentado anteriormente, la amplificación se realiza mediante mRT-PCR.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit, en adelante kit de la invención, que comprende los cebadores directos SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10.

ES 2 372 762 A1

En una realización preferida, el kit de la invención además comprende el cebador directo SEQ ID NO: 11 y el cebador reverso SEQ ID NO: 12 que permiten la detección de un control interno necesario para comprobar que las reacciones se han realizado en condiciones óptimas y que no hay activación del interferón ni liberación de IL-8.

Además de los aspectos anteriormente descritos, el kit puede incluir los reactivos necesarios para la amplificación por mRT-PCR: ADN polimerasa, retrotranscriptasa, nucleótidos, magnesio y otros componentes. También podría incluir instrucciones para llevar a cabo la amplificación por medio de las condiciones adecuadas como por ejemplo concentración de los cebadores, temperatura de alineamiento, hibridación, elongación, número de ciclos de amplificación, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de la invención para la obtención de datos útiles para la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y de la respuesta inflamatoria independiente de interferón en una muestra biológica aislada de un sujeto o en un cultivo celular. La detección y/o cuantificación se realiza preferentemente en un cultivo celular.

Y, finalmente, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit de la invención para determinar la capacidad de un agente para provocar una respuesta inmune en un cultivo celular que previamente ha sido tratado con dicho agente.

En una realización preferida, el agente es preferentemente un ácido nucleico donde dicho ácido nucleico es, pero sin limitarse, un oligodesoxirribonucleótido, un ssRNA o un dsRNA, donde preferentemente el dsRNA es siRNA.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra los resultados obtenidos por mRT-PCR en muestras de RNA total extraídas de diferentes líneas celulares (293T, 293T/TLR-9, U87CD4CXCR4 y Namalwa) tratadas con distintos tipos de ácidos nucleicos (ssRNA, dsRNA, siRNA y OD2006).

Carril 1, Línea celular 293T sin transfectar (control). Carril 2, Línea celular 293T transfectada con 0,5 μ g de ssRNA. Carril 3, Línea celular 293T transfectada con 0,5 μ g de dsRNA. Carril 4, Línea celular 293T expresando establemente el TLR9 (Control). Carril 5, Línea celular 293T expresando establemente TLR9, estimulada con 2,5 μ M de CpG ODN de clase B (OD2006). Carril 6, Línea celular Namalwa sin estimular (control). Carril 7, Línea Namalwa estimulada con 2,5 μ M de CpG ODN de clase B (OD2006). Carril 8, Línea celular U87CD4CXCR4 sin transfectar (control). Carril 9, Línea celular U87CD4CXCR4 transfectada con 0,5 μ g de ssRNA. Carril 10, Marcador de tamaño molecular.

Ejemplos

La invención describe el desarrollo de un procedimiento basado en la técnica de mRT-PCR que permite analizar fácilmente y en un solo paso los niveles de expresión relativa de tres genes implicados en respuesta mediada por interferón (OAS2, ISG56 y IFN α o IFN β), así como el gen de la citoquina proinflamatoria, (IL-8). El análisis de todos estos genes más un control interno se realiza simultáneamente en una única reacción, lo cual reduce considerablemente el riesgo de contaminación.

A lo largo de los distintos ejemplos se demuestra que este procedimiento es útil para analizar el efecto que puede tener un determinado ácido nucleico sobre la activación del interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón producida por la liberación de citoquinas proinflamatorias. Igualmente se pueden detectar las respuestas inmunes provocadas por cualquier otro producto o manipulación celular, no sólo los ácidos nucleicos.

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ejemplos que describen el diseño de los cebadores de la invención y el método que permite la detección de la activación del interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón en diferentes situaciones de células transfectadas con ssRNA, dsRNA y/o incubadas con ODN de clase B.

Además, también se muestra cómo la utilización de la técnica mRT-PCR pone de manifiesto la especificidad y efectividad del kit propuesto en la invención para evaluar si un determinado ácido nucleico es capaz de inducir una respuesta inmunológica en la célula donde es introducido.

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones de la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

*Líneas celulares, transfecciones y extracción del RNA*5 1.1 *Líneas celulares*

Las líneas celulares 293T, obtenida de células embrionarias humanas de riñón y 293T expresando establemente el TLR-9 (293T/TLR-9), fueron crecidas en medio DMEM (de las siglas en inglés *Dubelcco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% de suero bovino inactivado, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina, 0,11 mg/ml de piruvato sódico y 2 mM de L-glutamina. La línea U87CD4CXCR4, procedente de células de astroglioma expresando el receptor CD4 y el correceptor CXCR4, fue crecida en el mismo medio que el anterior, pero adicionalmente suplementado con 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 (Geneticina (*Gico BRL Life Technologies Inc.*)) y con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina. La línea celular Namalwa, línea de células B humana de linfoma de Burkitt, fue crecida en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino, 2 mM de L-glutamina y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina. Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C, en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂.

1.1 *Transfecciones*

Las células adherentes 293T, 293T/TLR-9 y U87CD4CXCR4 fueron cosechadas mediante tripsinización (0.25% tripsina, 0.02% EDTA) y sembradas en placa de 24 pocillos a una densidad celular de 8-10x10⁴ células por pocillo mientras que las Namalwa fueron sembradas a una densidad de 5x10⁵ células/ml. Las placas fueron incubadas 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ antes de transfectarlas o tratarlas.

Las células 293T fueron transfectadas usando como agente trasflectante la lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) con un siRNA sintético denominado anti-PBS siRNA (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14) y un ssRNA (SEQ ID NO: 15) de 57 ribonucleótidos sintetizados *in vitro* con la T7 RNA polimerasa (*Promega*), un dsRNA sintético poli I:C (*Sigma*) (RNA sintético de cadena doble formado por un polímero de ácido polinosínico y otro polímero de ácido citidílico). Las células U87CD4CXCR4 fueron transfectadas con un 0,5 μg de ssRNA (SEQ ID NO: 15) y las 293T/TLR-9 con 2,5 μM del oligonucleótido fosforotioato OD2006 (SEQ ID NO: 16) (*Invivogen*) perteneciente a la clase B usando como agente transfectante Fugene HD (*Roché*). Las células Namalwa fueron incubadas con 2,5 μM del oligonucleótido fosforotioato OD2006 (SEQ ID NO: 16) (*Invivogen*).

1.2 *Extracción del RNA*

El RNA total de las diferentes líneas celulares fue extraído usando el Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) siguiendo las indicaciones del propio fabricante. El RNA extraído fue disuelto en 20 μl de agua estéril y libre de nucleasas. Después del tratamiento con RQ1 DNasa (*Promega*) la concentración del RNA fue cuantificada usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La calidad del RNA fue analizada en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 0.5 X y también midiendo espectrofotométricamente el ratio OD260/280. El RNA total purificado fue conservado a -80°C hasta su uso.

Ejemplo 2

*Diseño de los cebadores de la invención y detección mediante mRT-PCR*45 2.1 *mRT-PCR*

Varios parámetros tales como la concentración de los diferentes cebadores (desde 0.04 a 0.8 μM), concentración de Mg²⁺ (desde 1 a 5 mM), temperatura de anillamiento (de 50°C a 60°C), temperatura de extensión (de 65°C hasta 72°C), duración del periodo de extensión (de 30 segundos hasta 5 minutos) y aditivos (BSA de 0.2 a 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) fueron examinados para establecer las mejores condiciones para la amplificación simultánea de todas las dianas analizadas.

Para calcular la temperatura de disociación de las diferentes parejas de cebadores y eliminar las posibles interacciones cebador-cebador se utilizó el software Primers 3, para diseñar los cebadores. Para descartar la posibilidad de la existencia de secuencias repetidas a las secuencias dianas dentro del genoma celular a las cuales los cebadores diseñados podrían unirse, los cebadores fueron alineados usando la base de secuencias del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y la herramienta de alineamiento local (BLAST).

La mRT-PCR fue realizada utilizando el *SuperScript™ One-Step RT-PCR* con *Platinum® Taq* (*Invitrogen*). La reacción fue realizada en un volumen final de 25 μl , y se usó 1 μg de RNA total como molde, 12.5 μl de 2X reaction Mix, 1 μl RT/Platinum Taq Mix, 5 pmoles del cebador 5' GAPDH (SEQ ID NO: 11) y del 3' GAPDH (SEQ ID NO: 12) específicos para la amplificación del gen GAPDH, 5 pmoles de cada cebador para la amplificación específica del gen IFN α (SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8) o IFN β (SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10), 5 pmoles de cada cebador para la amplificación específica del gen ISG56 (SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4), 20 pmol de cada cebador para la amplificación específica del gen OAS-2 (SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2) y 10 pmoles de cada cebador para la amplificación específica del gen IL-8 (SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6), 2 mM de MgCl₂ y 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA. Todas las parejas de cebadores utilizadas vienen recogidas en la Tabla 1.

ES 2 372 762 A1

Después de la RT a 55°C durante 30 minutos y 3 minutos a 95°C, la amplificación fue llevada a cabo en 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 2 minutos a 68°C y una extensión final de 10 minutos a 68°C. La mRT-PCR fue realizada en un termo-ciclador Bio-RAD iCycler.

5

TABLA 1

Secuencia de los cebadores utilizados en la mRT-PCR semi-quantitativa

10

Se muestra el número de acceso del NCBI de las secuencias utilizadas para el diseño de los cebadores 5' y 3'.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Gen diana	Número de acceso NCBI	Posición/ Nombre del cebador	Número de secuencia	Tamaño del producto amplificado
OAS2	NM_002535	320-343 5'OAS2	SEQ ID NO: 1 TGGCTCCTATGGACGGAAAACAGT	505
		844-824 3'OAS2	SEQ ID NO: 2 TGTTCCCAGGCATACACCGTA	
ISG56	NM_001548	14651484 5'ISG56	SEQ ID NO: 3 CTTGAGCCTCCTTGGGTTTCG	137
		1601-1580 3'ISG56	SEQ ID NO: 4 GCTGATATCTGGGTGCCTAAGG	
IL-8	NM_000584.2	102-393 5'IL-8	SEQ ID NO: 5 ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	292
		3'IL-8	SEQ ID NO: 6 TCTCAGCCCTCTTCAAACCTTCTC	
IFNA16	NM_002173	153-173 5'IFN- α	SEQ ID NO: 7 TTTCTCCTGCCTGAAGGACAG	373
		525-504 3'IFN- α	SEQ ID NO: 8 TCTCATGATTTCTGCTCTGACA	
IFNB1	NM_002176	198-210 5'IFN- β	SEQ ID NO: 9 CCTGTGGCAATTGAATGGGAGGC	370
		567-543 3'IFN- β	SEQ ID NO: 10 CCAGGCACAGTGAAGTGTCTCCTT	
GAPDH	AF261085	109-127 5'GAPDH	SEQ ID NO: 11 GAAGGTGAAGGTCCGAGTC	226
		334-315 3'GAPDH	SEQ ID NO: 12 GAAGATGGTGAATGGGATTTC	

ES 2 372 762 A1

2.2 Confirmación de los productos de PCR

Una vez concluida la mRT-PCR, un mismo volumen (2 μ l) de cada una de la reacciones fue mezclado con tampón de carga y los productos de la reacción fueron resueltos en un gel de agarosa al 2% con tampón TAE al 0.5X. La electroforesis fue realizada a 100 v durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue teñido en una solución de 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, lavado y los productos de PCR fueron visualizados mediante el uso de un transiluminador de UV.

Ejemplo 3

Detección de la estimulación de la activación de interferón y la respuesta inflamatoria independiente de interferón

La Figura 1 muestra el resultado de la aplicación de la técnica de mRT-PCR a muestras de RNA total extraídas de diferentes líneas celulares (293T, 293T/TLR-9, U87CD4CXCR4 y Namalwa) tratadas con distintos tipos de ácidos nucleicos (ssRNA (SEQ ID NO: 15), dsRNA (dsRNA sintético poli I:C), siRNA (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14) y el oligonucleótido fosforotioato ODN2006 (SEQ ID NO: 16). Los tres genes de respuesta mediada por interferón (OAS2, ISG56, IFN α o IFN β), el gen de la interleuquina proinflamatoria (IL-8) y el control interno de la reacción (GAPDH) fueron amplificados simultáneamente mediante mRT-PCR en una sola y única mezcla de reacción. Todos los productos fueron del tamaño esperado. Los niveles de expresión se determinaron por comparación con los obtenidos para el control interno.

Como se puede comprobar en la Figura 1, los amplicones generados son del tamaño esperado (ver Tabla 1) y productos inespecíficos no fueron detectados.

La Figura 1 muestra que en los carriles control no tratados (carriles 1, 4, 6 y 8) sólo se obtuvo una única banda correspondiente al gen de la GAPDH utilizado como control interno, el cual nos indica que la reacciones fueron realizadas en condiciones óptimas y que no hay activación del interferón ni liberación de IL-8. Sin embargo, en los carriles 2, 3, 5, 7 y 9, se observan los diferentes perfiles de expresión de respuesta de las diferentes células cuando son tratadas con diversos tipos de ácidos nucleicos, lo cual permite determinar si existe o no activación de la respuesta del interferón e inducción del gen de la IL-8 de una forma rápida, sensible y sencilla.

Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del procedimiento propuesto en la presente invención, que mediante la técnica de mRT-PCR, permite la detección simultánea de 5 genes en una sola reacción, bajo unas condiciones específicas y no convencionales que fueron optimizadas en cuanto a la concentración de Mg⁺², temperatura de anillamiento, número de ciclos, diseño de cebadores y cantidades relativas de cada una de las 5 parejas de cebadores, siendo estas condiciones y no otras, las responsables del funcionamiento correcto y la reproducibilidad de la RT-PCR multiplex, es decir, de la efectividad para detectar de forma rápida y segura si un determinado ácido nucleico u otra molécula provoca activación de interferón y/o respuesta inflamatoria independiente de interferón.

ES 2 372 762 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de los cebadores directos SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5 y, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9, y de los cebadores reversos SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6 y, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10, para la detección y/o cuantificación de:
- a. los genes OAS2, ISG56 e IFN α o IFN β involucrados en la activación del interferón y,
 - 10 b. el gen IL-8 involucrado en la respuesta inflamatoria independiente de interferón producida por la liberación de citoquinas proinflamatorias,
- en una muestra biológica aislada de un sujeto o en un cultivo celular.
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, donde se usa además el cebador directo SEQ ID NO: 11 y el cebador reverso SEQ ID NO: 12 para la detección y/o cuantificación del gen control GAPDH.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la detección y/o cuantificación se realiza en un cultivo celular.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la muestra biológica aislada es un tejido o un fluido biológico.
- 25 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, donde el sujeto es un mamífero.
6. Método de obtención de datos útiles para determinar la capacidad de un agente para provocar una respuesta inmune, que comprende:
- 30 a. seleccionar un cultivo celular que previamente ha sido tratado con dicho agente,
 - b. amplificar de forma simultánea los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , utilizando los cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 y, SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10, y
 - 35 c. detectar y/o cuantificar los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , en el cultivo celular seleccionado.
7. Método de obtención de datos útiles para la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y de la respuesta inflamatoria independiente de interferón que comprende:
- 40 a. obtener una muestra biológica aislada de un sujeto o seleccionar un cultivo celular,
 - b. amplificar de forma simultánea los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , utilizando los cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 y, SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9/SEQ ID NO: 10, y
 - 45 c. detectar y/o cuantificar los genes OAS2, ISG56, IL-8 e IFN α o IFN β , en la muestra biológica aislada o en el cultivo celular seleccionado.
- 50 8. Método de obtención de datos útiles para diagnosticar respuesta inmune en un sujeto o cultivo celular, que comprende los pasos (a), (b) y (c) del método según la reivindicación 7 y además los siguientes pasos:
- 55 d. comparar los resultados obtenidos en (c) con unos valores de referencia para encontrar una desviación significativa y,
 - e. atribuir la desviación a la presencia de respuesta inmune en el sujeto o en el cultivo celular.
- 60 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde además se amplifica el gen control GAPDH utilizando los cebadores SEQ ID NO: 11/SEQ ID NO: 12.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde la amplificación del paso (b) se realiza mediante mRT-PCR.
- 65 11. Método según la reivindicación 6, donde el agente es un ácido nucleico.

ES 2 372 762 A1

12. Método según la reivindicación 11, donde el ácido nucleico es un oligodesoxirribonucleótido.

13. Método según la reivindicación 11, donde el ácido nucleico es ssRNA.

5 14. Método según la reivindicación 11, donde el ácido nucleico es dsRNA

15. Método según la reivindicación 14, donde el dsRNA es siRNA.

10 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 donde la muestra biológica aislada es un tejido o un fluido biológico.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el sujeto es un mamífero.

15 18. Kit que comprende los cebadores directos SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5 y, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9, y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 6 y, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10.

20 19. Kit según la reivindicación 18 que además comprende el cebador directo SEQ ID NO: 11 y el cebador reverso SEQ ID NO: 12.

20. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, para la obtención de datos útiles para la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y de la respuesta inflamatoria independiente de interferón en una muestra biológica aislada de un sujeto o en un cultivo celular.

25 21. Uso del kit según la reivindicación 20, donde la detección y/o cuantificación se realiza en un cultivo celular.

22. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, para determinar la capacidad de un agente para provocar una respuesta inmune en un cultivo celular que previamente ha sido tratado con dicho agente.

30 23. Uso según la reivindicación 22, donde el agente es un ácido nucleico.

24. Uso según la reivindicación 23, donde el ácido nucleico es un oligodesoxirribonucleótido.

35 25. Uso según la reivindicación 24, donde el ácido nucleico es ssRNA.

26. Uso según la reivindicación 24, donde el ácido nucleico es dsRNA

27. Uso según la reivindicación 26, donde el dsRNA es siRNA.

40

45

50

55

60

65

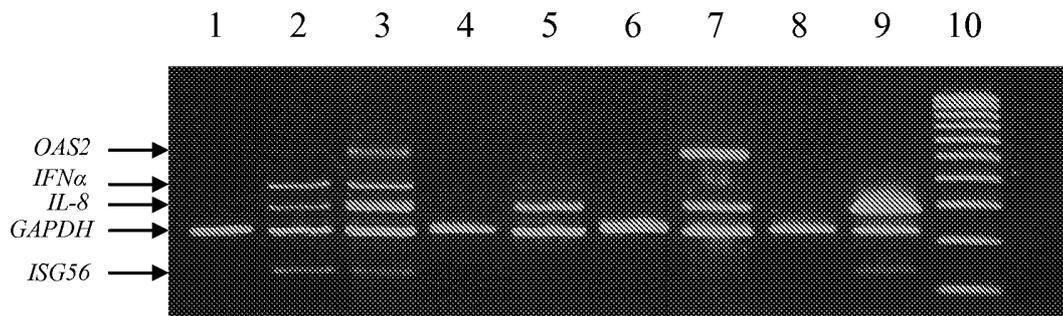


FIG. 1

ES 2 372 762 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- 5 <120> Método y kit para la detección de la activación del interferón y la respuesta inflamatoria
- <130> 1641.722
- 10 <140> P201031026
- <141> 2010-07-02
- <160> 16
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 24
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> Cebador directo OAS2
- <400> 1
- 30 **tggtcctat ggacggaaaa cagt** 24
- <210> 2
- <211> 21
- 35 <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Cebador reverso OAS2
- <400> 2
- 45 **tgttcccagg catacaccgt a** 21
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 55 <223> Cebador directo ISG56
- <400> 3
- cttgagcctc cttgggttcg** 20
- 60 <210> 4
- <211> 22
- <212> DNA
- 65 <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 372 762 A1

<223> Cebador reverso ISG56

<400> 4

5 gctgatatct gggcgcctaa gg 22

<210> 5
<211> 24
10 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador directo IL-8

<400> 5

20 atgacttcca agctggccgt ggct 24

<210> 6
25 <211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador reverso IL-8

<400> 6

35 tctcagccct cttcaaaact tctc 24

<210> 7
40 <211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador directo IFN alfa

<400> 7

50 tttctcctgc ctgaaggaca g 21

<210> 8
<211> 22
55 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Cebador reverso IFN alfa

<400> 8

65 tctcatgatt tctgctctga ca 22

<210> 9

ES 2 372 762 A1

	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador directo IFN beta	
10	<400> 9	
	cctgtggcaa ttgaatggga ggc	23
	<210> 10	
15	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador reverso IFN beta	
	<400> 10	
25	ccaggcacag tgactgtcct cctt	24
	<210> 11	
	<211> 19	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador directo GAPDH	
	<400> 11	
40	gaaggtgaag gtcggagtc	19
	<210> 12	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador reverso GAPDH	
	<400> 12	
	gaagatggtg atgggatttc	20
55	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> RNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> anti-PBS siRNA directo	

ES 2 372 762 A1

	<400> 13		
	gguggcgccc gaacagggac cuu		23
5	<210> 14		
	<211> 23		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> anti-PBS siRNA reverso		
15	<400> 14		
	ggucccuguu cgggcgccac uuu		23
	<210> 15		
20	<211> 57		
	<212> RNA		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> SSRNA		
30	<400> 15		
	uaccagguaa uguaccacga cuuacgucgu guguuucucu gguuugcuuc uagugug		57
	<210> 16		
35	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido fosforotioato ODN-2006		
	<400> 16		
45	tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24
50			
55			
60			
65			



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201031026

22 Fecha de presentación de la solicitud: 02.07.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 2080814 A2 (GENENTECH, INC.) 22.07.2009, todo el documento.	1-27
A	US 20070092890 A1 (GENENTECH, INC.) 26.04.2007, todo el documento.	1-27
A	US 20060280684 A1 (RIIKKA LUND; ZHI CHEN; RIITA LAHESMAN) 14.12.2006, todo el documento.	1-27
A	"Interferon Response Detection Kit for validation of siRNA experiments" (Cat. # SI300A-1) User Manual © 2006 System Biosciences (SBI); [Recuperado de Internet: URL: http://www.systembio.com/downloads/Manual_IRDkit_v4.pdf]; [Recuperado de Internet el 14.06.2011]; todo el documento.	1-27

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.06.2011

Examinador
M. García Coca

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.06.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-27
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-27
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 2080814 A2 (GENENTECH, INC.)	22.07.2009
D02	US 20070092890 A1 (GENENTECH, INC.)	26.04.2007
D03	US 20060280684 A1 (RIIKKA LUND; ZHI CHEN; RIITA LAHESMAN)	14.12.2006
D04	"Interferon Response Detection Kit for validation of siRNA experiments" (Cat. # SI300A-1) User Manual	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-27, es el uso de los cebadores SEQ ID 1-SEQ ID 10 para la detección y/o cuantificación de los genes OAS2, ISG56, IFN α ; o IFN β , e IL-8 (reiv. 1-5). También es objeto de la invención un método de obtención de datos útiles para determinar la capacidad de un agente para provocar una respuesta inmune (reiv. 6 y parcialmente 9-17), un método de obtención de datos útiles para la detección y/o cuantificación de la activación del interferón y de la respuesta inflamatoria independiente de interferón (reiv. 7 y parcialmente 9-17), un método de obtención de datos útiles para diagnosticar la respuesta inmune en un sujeto o cultivo celular (reiv. 8 y parcialmente 9-17), todos ellos basados en la detección simultánea de dichos genes. Por último también es objeto de la invención un kit y su uso para la realización de los distintos métodos (reiv. 18-27).

Novedad y Actividad Inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes)

Los documentos D01 y D02 divulgan métodos y composiciones para la detección de enfermedades autoinmunes, basados en la detección en el sujeto de determinados genes entre los que se encuentran OAS2 e IFIT1. La presencia de dichos genes es indicativo de enfermedad autoinmune.

El documento D03 divulga métodos para la identificación de compuestos capaces de modular la actividad de los linfocitos CD4+, basándose en la diferencia de expresión de determinados genes entre los que se encuentran IFIT1, OAS2 y IL-8, en presencia y/o ausencia del compuesto a analizar. Este documento también divulga métodos para determinar la predisposición, o prevalencia de enfermedades inmunes (por ejemplo, autoinmunes) en un sujeto, basándose también en la diferencia de expresión de varios genes, entre los que se encuentran IFIT1, OAS2 y IL-8.

El documento D04, divulga un kit capaz de detectar mediante RT-PCR si pequeños siRNAs pueden afectar a la respuesta dependiente de interferón. Con dicho kit se analiza la expresión de los genes OAS1, OAS2, MX1, IFITM1 e ISGFy.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-27. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-27 es con referencia a los documentos D01-D04 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).