

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 216**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2007** **E 11170912 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014** **EP 2371958**

54 Título: **Nuevos ARNip y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**25.10.2006 US 854503 P**

**15.05.2007 US 930493 P**

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

**30.04.2014**

73 Titular/es:

**QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**6501 Dumbarton Circle**  
**Fremont, California 94555, US**

72 Inventor/es:

**FEINSTEIN, ELENA y**  
**KALINSKI, HAGAR**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

ES 2 458 216 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

Nuevos ARNip y métodos de uso de los mismos

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 60/854,503 presentada el 25 de octubre de 2006, y de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 60/930,493 presentada el 15 de mayo de 2007.

## CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas que los comprende y sus usos para la inhibición de ciertos genes, incluyendo los genes pro-apoptóticos. Los compuestos y composiciones así son útiles en el tratamiento de individuos que sufren de enfermedades o afecciones y o síntomas asociados con dichas enfermedades o afecciones en las que la expresión génica tiene consecuencias adversas. En modalidades particulares, la invención proporciona los oligonucleótidos de ARNip, las composiciones que los comprenden y sus usos en el tratamiento de la insuficiencia renal aguda (ARF).

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## 20 ARNip y ARN de interferencia

- La interferencia por ARN (iARN) es un fenómeno que involucra el silenciamiento postraduccional gen-específico dependiente del ARN de cadena doble (bc). Los intentos iniciales de estudiar este fenómeno y manipular experimentalmente las células de mamíferos se frustraron mediante un mecanismo de defensa antiviral activo y no-específico que se activó en respuesta a largas moléculas de ARNbc (Gil y otros, Apoptosis, 2000, 5:107-114). Después, se descubrió que ARNs de cadenas dobles sintéticas de 21 nucleótidos podían mediar el iARN específico al gen en células de mamíferos, sin estimular los mecanismos genéricos de defensa antiviral Elbashir y otros, Nature 2001, 411:494-498 y Caplen y otros, PNAS 2001, 98:9742-9747). Como resultado, los ARNs pequeños de interferencia (ARNip), que son ARNs de cadenas dobles cortas, se han usado ampliamente para inhibir la expresión génica y comprender la función génica.

- 30 La interferencia por ARN (iARN) es mediada por pequeños ARNs de interferencia (ARNips) (Fire y otros, Nature 1998, 391:806) o microARNs (miARNs) (Ambros V. Nature 2004, 431:350-355); y Bartel DP. Cell. 2004 116(2):281-97). El proceso correspondiente se denomina comúnmente como silenciamiento génico post-transcripcional específico como cuando observado en plantas y como extinción cuando observado en hongos.

- 35 Un ARNip es un ARN de cadena doble que regula descendente o silencia (es decir, inhibe completamente o parcialmente) la expresión de un gen/ARNm endógeno o exógeno. La interferencia por ARN se basa en la capacidad de ciertas especies de ARNbc para entrar en un complejo de proteína específica, donde se dirigen después a los ARN celulares complementarios y los degradan específicamente. Así, la respuesta de la interferencia por ARN caracteriza un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, comúnmente denominado como un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media la escisión del ARN de cadena sencilla que tiene la secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARNip de cadena doble. La escisión del ARN objetivo puede ocurrir en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del ARNip de cadena doble (Elbashir, y otros, Genes Dev., 2001, 15:188). En más detalle, los ARNbc más largos se digieren en fragmentos de ARNbc cortos (17-29 pb) ARNbc (denominados además como ARN inhibidores cortos o "ARNips") por ARNasas tipo III (DICER, DROSHA, etc., (verBernstein y otros, Nature, 2001, 409:363-6 y Lee y otros, Nature, 2003, 425:415-9). El complejo de proteína RISC reconoce estos fragmentos y el ARNm complementario. El proceso completo se culmina por la escisión de la endonucleasa del ARNm objetivo (McManus y Sharp, Nature Rev Genet, 2002, 3:737-47; Paddison y Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003, 5(3): 217-24). (Para información adicional en estos términos y mecanismos propuestos, ver por ejemplo, Bernstein, y otros, RNA. 2001, 7(11):1509-21; Nishikura, Cell. 2001, 107(4):415-8 y publicación PCT núm. WO 01/36646).

- Los estudios revelaron que ARNip puede ser eficaz in vivo tanto en mamíferos como humanos. Específicamente, Bitko y otros, mostraron que los ARNip específicos dirigidos contra el gen de la nucleocápsida N del virus sincitial respiratorio (RSV) son eficaces en el tratamiento de los ratones cuando se administran por vía intranasal (Bitko y otros, Nat. Med. 2005, 11(1):50-55). Para revisiones de las aplicaciones terapéuticas de ARNip ver Barik (Mol. Med 2005, 83: 764-773) y Chakraborty (Current Drug Targets 2007 8(3):469-82). Adicionalmente, se han realizado estudios clínicos con ARNip cortos que se dirigen al receptor VEGFR1 para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en pacientes humanos. En estudios tal ARNip administrado por inyección intravítrea (intraocular) se encontró eficaz y seguro en los 14 pacientes analizados (Kaiser, Am J Ophthalmol. 2006 142(4):660-8).

## Genes pro-apoptóticos

Los genes pro-apoptóticos generalmente se definen como genes que juegan un papel en la muerte celular apoptótica. Genes pro-apoptóticos, útiles en la presente invención incluyen caspasa 2, peptidasa cisteína asociada a la apoptosis (CASP2).

## Pérdida de audición:

### Ototoxicidad inducida por sustancias químicas

Los efectos ototóxicos de varios fármacos terapéuticos en células auditivas y las neuronas del ganglio espiral son frecuentemente el factor que limita su utilidad terapéutica. Fármacos ototóxicos usados comúnmente incluyen el ampliamente usado agente quimioterapéutico cisplatina y sus análogos, antibióticos de aminoglucósidos, por ejemplo, gentamicina, quinina y sus análogos, salicilato y sus análogos, y diuréticos del asa.

Por ejemplo, se sabe que los aminoglucósidos antibacterianos tales como gentamicina, estreptomina, kanamicina, tobramicina, y similares, tienen efectos secundarios tóxicos graves, particularmente ototoxicidad y nefrotoxicidad, que reducen su valor como agentes terapéuticos (ver Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6ta edición, A. Goodman Gilman y otros, incluye caspasa 2, cisteína peptidasa asociada a la apoptosis (CASP2). eds; Macmillan Publishing Co., Inc., 1980. Nueva York, págs. 1169-71). Así, la ototoxicidad es un efecto secundario dosis-limitante reconocido de la administración de antibióticos. Los estudios han demostrado que de 4 a 15% de los pacientes que reciben un gramo por día durante más de una semana desarrollan pérdida de audición medible, que empeora gradualmente y puede conducir a la sordera permanente si continúa el tratamiento.

La ototoxicidad es además un efecto secundario grave dosis-limitante para la cisplatina, un complejo de coordinación de platino, que ha demostrado ser eficaz en una variedad de cánceres humanos incluyendo el cáncer testicular, ovárico, vejiga, y de cabeza y cuello. La cisplatina (Platinol®) daña los sistemas auditivos y vestibulares. Los salicilatos, tal como la aspirina, son los fármacos más comúnmente usados debido a sus efectos anti-inflamatorios, analgésicos, antipiréticos y anti-trombóticos. Desafortunadamente, ellos también tienen efectos secundarios ototóxicos incluyendo silbido ("zumbido en los oídos") y pérdida temporal de la audición. Además, si el medicamento se usa en dosis altas durante un tiempo prolongado, el deterioro auditivo puede volverse persistente e irreversible.

Sin estar limitados por la teoría, se cree que los fármacos cisplatina y otros fármacos potencialmente ototóxicos inducen los efectos ototóxicos través de la apoptosis en el tejido del oído interno, particularmente las células ciliadas del oído interno (Zhang y otros, Neuroscience 2003, 120(1):191-205; Wang y otros, J. Neuroscience, 2003, 23(24):8596-8607). En mamíferos, las células ciliadas auditivas sólo se producen durante el desarrollo embrionario y en caso de pérdida no se regeneran durante la vida después del nacimiento. Por lo tanto, una pérdida de células ciliadas se traducirá en la sordera profunda e irreversible. Desafortunadamente, actualmente no hay terapias eficaces para tratar la cóclea y revertir esta condición. Así, una terapia eficaz para prevenir la muerte celular de las células ciliadas auditivas puede ser de gran valor terapéutico. La solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/655,610, asignada al solicitante de la presente invención se refiere a los métodos para tratar el deterioro de la audición en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor del polinucleótido p53, y opcionalmente un inhibidor de un gen pro-apoptótico.

### Presbiacusia

Otro tipo de pérdida de la audición es la presbiacusia, que es pérdida de la audición que ocurre gradualmente en la mayoría de las personas a medida que envejecen. Aproximadamente 30-35 por ciento de los adultos entre las edades de 65 y 75 años y 40-50 por ciento de las personas de 75 y más experimentan pérdida de la audición. Como consecuencia, hay una necesidad de medios para prevenir, reducir o tratar la incidencia y/o severidad de los trastornos del oído interno y deterioros auditivos que involucran el tejido del oído interno, particularmente las células ciliadas del oído interno.

### Trauma acústico

El trauma acústico es un tipo de pérdida de la audición que es causada por la exposición prolongada a ruidos fuertes. Sin desear estar limitado por la teoría, la exposición a ruidos fuertes provoca que las células ciliadas en la cóclea se conviertan en menos sensibles. Con la exposición más severa, la lesión puede provenir desde una pérdida de células adyacentes de soporte hasta la interrupción completa del órgano de Corti. La muerte de la célula sensorial puede conducir a la degeneración progresiva walleriana y pérdida de fibras nerviosas auditivas primarias.

De particular interés son las condiciones adversas que surgen como un efecto secundario de los fármacos terapéuticos, incluyendo cisplatina y sus análogos, antibióticos aminoglucósidos, salicilato y sus análogos, o diuréticos del asa. Hay así, una necesidad de métodos de tratamiento que permitirán un dosis mayor y de ese modo más eficaz, mientras que prevengan o reduzcan los efectos ototóxicos causados por estos fármacos. Así, son necesarias las composiciones y métodos que proporcionan un medio seguro, eficaz y prolongado para el tratamiento profiláctico o curativo de las afectaciones auditivas relacionadas con el daño, pérdida o degeneración del tejido del oído interno, particularmente la ototoxina-inducida y particularmente involucrando las células ciliadas del oído interno. En los mamíferos, las células ciliadas auditivas sólo se producen durante el desarrollo embrionario y no se regeneran en caso de pérdida durante la vida después del nacimiento por lo tanto, una pérdida de las células ciliadas resultará en la sordera profunda e irreversible. Desafortunadamente, en la actualidad, no hay terapias eficaces para tratar la cóclea y revertir esta afección. Así, una terapia eficaz para prevenir la muerte celular de las células ciliadas auditivas puede ser de gran valor terapéutico.

### **Insuficiencia renal aguda**

La insuficiencia renal aguda (ARF) es un síndrome clínico caracterizado por el rápido deterioro de la función renal que ocurre en días. La característica principal de la ARF es un descenso brusco de la tasa de filtrado glomerular (GFR), resultando en la retención de desechos nitrogenados (urea, creatinina). A nivel mundial, la ARF severa se produce en aproximadamente 170-200 personas por millón de habitantes al año. En la actualidad, no hay un tratamiento específico para la ARF establecida. Varios fármacos se han encontrado que mejoran la ARF experimental tóxica e isquémica, que se manifiesta por los niveles inferiores de creatinina sérica, daño histológico reducido y una recuperación más rápida de la función renal en modelos animales. Estos incluyen antioxidantes, bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, sustancias vasoactivas, factores de crecimiento, agentes anti-inflamatorios y más. Sin embargo, cuando estos fármacos se probaron en ensayos clínicos ningún beneficio se mostró y su uso para el tratamiento de la ARF no se aprobó.

En la mayoría de los pacientes hospitalizados con ARF, la ARF es causada por la necrosis tubular aguda (ATN), que resulta de insultos isquémicos y/o nefrotóxicos. La hipoperfusión renal es causada por choque hipovolémico, cardiogénico y séptico, mediante la administración de fármacos vasoconstrictores o lesión renovascular. Las nefrotoxinas incluyen toxinas exógenas tales como medios de contraste y aminoglucósidos, así como la toxina endógena tal como mioglobina. Los estudios recientes sugieren que la apoptosis en los tejidos renales es prominente en la mayoría de casos humanos de ARF. El sitio principal de la muerte celular apoptótica es la nefrona distal. Durante la fase inicial de la lesión isquémica, la pérdida de la integridad del citoesqueleto de actina conduce al aplanamiento del epitelio, con pérdida de borde en cepillo, pérdida de los contactos celulares focales, y la subsiguiente liberación de la célula del sustrato subyacente. Se ha sugerido que la muerte celular apoptótica en el túbulo puede ser más predictiva de los cambios funcionales que de muerte celular necrótica (Komarov y otros, Science. 1999, 285(5434):1733-7); Supavekin y otros, Kidney Int. 2003, 63(5):1714-24). En conclusión, no hay formas actualmente satisfactorias de la terapia para la prevención y/o tratamiento de la insuficiencia renal aguda, y hay una clara necesidad de desarrollar nuevos compuestos para este propósito.

### **Trasplante Renal**

#### **Función retardada del injerto**

La función retardada del injerto (DGF) es la complicación más común del período postoperatorio inmediato en el trasplante renal y resulta en el mal resultado del injerto (Moreso y otros, 1999. Nephrol. Dial. Transplant. 14(4):930-35). Aunque la incidencia y definición de DGF varían entre los centros de trasplante, las consecuencias son invariables: estancia hospitalaria prolongada, procedimientos invasivos adicionales y costo adicional para el paciente y el sistema de atención de la salud.

Rechazo agudo al trasplante

El rechazo del injerto se ha clasificado en tres subconjuntos en función de la aparición de la destrucción del injerto: rechazo hiperagudo es el término que se aplica a la destrucción del injerto muy precoz, generalmente dentro de las primeras 48 horas. El rechazo agudo tiene un inicio de diversos días a meses o incluso años después del trasplante y puede implicar mecanismos humorales y/o celulares. El rechazo crónico se refiere a la respuesta inmune alorreactiva crónica.

### **Glaucoma**

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera en el mundo. Afecta a aproximadamente 66,8 millones de personas en todo el mundo. Al menos 12,000 estadounidenses quedan ciegos por esta enfermedad cada año (Kahn y Milton, Am J Epidemiol. 1980, 111(6):769-76). El glaucoma se caracteriza por la degeneración de los axones en la cabeza del nervio óptico, principalmente debido a la presión intraocular (IOP) elevada. Una de las formas más comunes del glaucoma, conocido como glaucoma primario de ángulo abierto (POAG), resulta de la resistencia aumentada de la salida del

humor acuoso en la red trabecular (TM), causando la elevación de la IOP y daño eventual del nervio óptico. Mucke (IDrugs 2007, 10(1):37-41) revisa los terapéuticos actuales, incluyendo ARNip para varios objetivos en el tratamiento de enfermedades oculares, por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el glaucoma. Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo

El síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS), conocido también como síndrome de distrés respiratorio (SDR) o síndrome de distrés respiratorio del adulto (en contraste con el síndrome de distrés respiratoria infantil, IRDS) es una reacción grave a las diversas formas de lesiones en el pulmón. Este es el trastorno más importante que resulta en aumento de la permeabilidad edema pulmonar.

ARDS es una enfermedad pulmonar grave causada por una variedad de insultos directos e indirectos. Se caracteriza por la inflamación del parénquima pulmonar que conduce a el intercambio de gases afectados con la liberación sistémica concomitante de mediadores inflamatorios que causan inflamación, hipoxemia y frecuentemente resultan en una falla de múltiples órganos. Esta condición es una amenaza para la vida y con frecuencia mortal, necesitando generalmente de la ventilación mecánica e ingreso en una unidad de cuidados intensivos. Una forma menos grave se denomina lesión pulmonar aguda (ALI).

#### **Rechazo agudo del trasplante de pulmón**

Rechazo agudo de aloinjertos permanece siendo un problema significativo en el trasplante de pulmón pesar de los avances en la medicación inmunosupresora. El rechazo, y en última instancia, la morbilidad y mortalidad temprana pueden resultar de la lesión de isquemia-reperfusión (I/R) y lesión hipóxica.

#### **Lesión de la médula espinal**

La lesión de la médula espinal o mielopatía, es una alteración de la médula espinal que resulta en pérdida de sensibilidad y/o movilidad. Los dos tipos más comunes de lesión de la médula espinal se deben al trauma y enfermedad. Las lesiones traumáticas son frecuentemente debido a accidentes automovilísticos, caídas, accidentes de saltos disparados, y similares. Las enfermedades que pueden afectar la médula espinal incluyen polio, espina bífida, tumores, y ataxia de Friedreich.

#### **Lesión por isquemia-reperfusión después de un trasplante de órganos**

La lesión por isquemia-reperfusión (IRI) es una de las principales causas de muerte en los receptores de aloinjertos de órganos. IRI significativo se produce en todos los trasplantes de órganos de un donante fallecido, y en algunos de los donantes vivos. Contribuye al rechazo agudo aumentado y la función del aloinjerto deteriorada a largo plazo. En el trasplante de pulmón, la única terapia definitiva para muchos pacientes con enfermedad pulmonar en fase terminal, tiene bajas tasas de supervivencia en todos los receptores de aloinjertos sólidos.

#### **Úlceras por presión**

Las úlceras por presión, frecuentemente conocidas como úlceras de decúbito o úlceras por presión, son áreas de piel y tejido dañado. Con la presión no aliviada, la isquemia tisular puede desarrollar lo que resulta en la acumulación de residuos metabólicos en el tejido intersticial, que resulta en la anoxia y la muerte celular. Esta isquemia inducida por presión conduce además a la hipoxia excesiva del tejido, que promueve más aun la proliferación bacteriana y la destrucción del tejido.

#### **Degeneración macular relacionada con la edad**

La causa más común de la disminución de la visión mejor corregida en los individuos mayores de 65 años en los Estados Unidos es el trastorno de la retina conocido como degeneración macular relacionada con la edad (AMD). El área del ojo afectado por la AMD es la mácula, una área pequeña en el centro de la retina, compuesta fundamentalmente de células fotorreceptoras. Cuando la AMD progresa, la enfermedad se caracteriza por pérdida de la visión central, aguda. La llamada AMD "seca" representa aproximadamente 85% - 90% de los pacientes con AMD e involucra alteraciones en la distribución de pigmentos en los ojos pérdida de los fotorreceptores y disminuye la función de la retina debido a la atrofia general de las células. AMD "húmeda" involucra la proliferación de vasos coroideos anormales lo que conduce a coágulos o cicatrices en el espacio subretinal. Así, la aparición de la AMD "húmeda" ocurre debido a la formación de una red neovascular coroidea anormal (neovascularización coroidea, CNV) debajo de la retina neural. Los vasos sanguíneos formados nuevamente son excesivamente débiles. Esto conduce a la acumulación de fluido subretinal y sangre conduciendo a la pérdida de la agudeza visual. Eventualmente, hay pérdida total de la retina funcional en la región involucrada, ya que se forma una gran cicatriz disciforme que involucra la coroide y la retina. Mientras que los pacientes con AMD seca pueden mantener una visión de

calidad decreciente, la AMD húmeda frecuentemente resulta en la ceguera. (Hamdi & Kenney, Frontiers in Bioscience, e305-314, mayo 2003).

### Retinopatía diabética

La retinopatía diabética (DR) se reconoce como un trastorno vascular de la retina que exhibe exceso de la permeabilidad capilar, cierre vascular, y proliferación de nuevos vasos. La DR se produce en dos etapas: no-proliferativa y proliferativa. En la etapa no-proliferativa de la enfermedad se caracteriza por una pérdida de pericitos capilares de la retina, engrosamiento de la membrana basal y desarrollo de microaneurismas, hemorragias puntuales de membrana, y exudados duros. En la fase proliferativa de la enfermedad se caracteriza por la neovascularización extensa, la intrusión de vasos en el vítreo, sangrado y fibrosis con la consiguiente tracción de la retina, lo que conduce al deterioro severo de la visión. La patente de Estados Unidos núm. 6,740,738 y patentes relacionadas, y solicitudes al cesionario de la presente invención se dirigen a la inhibición del gen y proteína RTP801, involucradas en la retinopatía.

### Mucositis oral

La mucositis oral, conocida además como estomatitis, es un efecto secundario común y debilitante de los regímenes de quimioterapia y radioterapia, que se manifiesta en sí como eritema y lesiones ulcerosas dolorosas de la boca y la garganta. Las actividades rutinarias, tales como comer, beber, tragar y hablar pueden ser difíciles o imposibles para los sujetos con mucositis oral severa. La terapia paliativa incluye la administración de analgésicos y enjuagues tópicos.

### Síndrome del ojo seco

El síndrome de ojo seco es un problema común generalmente como resultado de una disminución en la producción de la película lagrimal que lubrica los ojos. La mayoría de los pacientes con ojo seco experimentan molestia, y ninguna pérdida de la visión; aunque en los casos más severos, la córnea puede dañarse o infectarse. Las gotas humectantes (lágrimas artificiales) se pueden usar para el tratamiento mientras que ungüentos lubricantes pueden ayudar a los casos más severos.

Terapias más eficaces para tratar las enfermedades y trastornos anteriormente mencionados pueden ser de gran valor terapéutico.

### RESUMEN DE LA INVENCION

La descripción describe inhibidores de un gen pro-apoptótico que comprende CASP2 (Ver Tabla A, más abajo, para más detalles de los genes. En varias modalidades, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste de ARNip, ARNhc, un aptómero, una molécula antisentido, miARN, una ribozima, y un anticuerpo. En las modalidades actualmente preferidas el inhibidor es ARNip.

Como consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona nuevos oligoribonucleótidos de cadena doble que inhiben la expresión de un gen pro-apoptótico que comprende CASP2. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de tales oligoribonucleótidos o un vector capaz de expresar el oligoribonucleótido.

La presente invención proporciona un compuesto de ARN de cadena doble que tiene la estructura:



en donde cada uno de N y N' es un nucleótido que puede modificarse o no-modificarse en su residuo de azúcar; en donde cada uno de  $(N)_x$  y  $(N')_y$  es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente;

en donde cada uno de x e y es un entero entre 19 y 40;

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es 1-5 nucleótidos consecutivos covalentemente unidos al terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y

en donde la secuencia de  $(N)_x$  comprende la sec. con núm. de ident.: 140 y la secuencia de  $(N')_y$  comprende la sec. con núm. de ident.:139. Los genes actualmente preferidos son genes de mamíferos que comprenden CASP2 (sec. con núms. de ident.:10-11). Las sec. con núms. de ident. representan las secuencias del ARNm de los genes listados.

En una modalidad la invención se dirige a un compuesto de ARN de cadena doble que tiene la estructura:

5' AGGAGUUCCACAUUCUGGC 3' (cadena antisentido) (sec. con núm. de ident.: 140)  
3' UCCUCAAGGUGUAAGACCG 5' (cadena sentido) (sec. con núm. de ident.:139)

en donde cada uno de A, C, G, y U es un ribonucleótido que puede modificarse o no-modificarse en su residuo de azúcar, y en donde cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido por un enlace covalente.

5 En algunas modalidades el enlace covalente que une cada N o N' consecutivo es un enlace fosfodiéster. En varias modalidades de todos los enlaces covalentes son enlaces fosfodiéster. En algunas modalidades, cada uno de x e y es un entero entre 19 y 40.

10 En algunas modalidades, x=y. En varias modalidades el compuesto comprende ribonucleótidos en donde x = y y cada uno de x e y es 19, 20, 21, 22 o 23. En algunas modalidades x = y =23. En otras modalidades x = y =19.

15 En algunas modalidades el compuesto es el extremo romo, en donde por ejemplo tanto Z como Z' están ausentes. En una modalidad alternativa, el compuesto comprende al menos un saliente 3', en donde al menos uno de Z o Z' está presente. Z y Z' pueden comprender independientemente uno o más nucleótidos modificados o no modificados covalentemente unidos, por ejemplo dT o dA invertidos; dT, LNA, nucleótido exacto y similares. En algunas modalidades cada uno de Z y Z' se seleccionan independientemente de dT y dTdT.

20 En algunas modalidades, cada uno de N o N' está sin modificar su residuo de azúcar. En algunas modalidades N o N' comprende una modificación en el residuo de azúcar de uno o más ribonucleótidos. En otras modalidades el compuesto comprende al menos un ribonucleótido modificado en el residuo de azúcar. En algunas modalidades el compuesto comprende una modificación en la posición 2' del residuo de azúcar, que comprende preferentemente la presencia de una porción amino, un fluoro, un alcoxi o un alquilo. En ciertas modalidades la modificación 2' comprende una porción metoxi. Un modificación actualmente preferida es una 2' metoxi del residuo de azúcar (2'-O-metil; 2'-O-Me; 2'-O-CH<sub>3</sub>).

25 En algunas modalidades el compuesto comprende ribonucleótidos alternativos modificados en una o ambas cadenas antisentido o sentido. En ciertas modalidades el compuesto comprende los ribonucleótidos alternativos modificados en las cadenas antisentido y sentido. En otras modalidades el compuesto comprende los ribonucleótidos alternativos modificados sólo en la cadena antisentido. En ciertas modalidades el ribonucleótido medio de la cadena antisentido está sin modificar; por ejemplo el ribonucleótido en la posición 10 en una cadena 19-mer o en la posición 12 en una cadena 23-mer.

30 En modalidades adicionales cada ribonucleótido en el extremo 5' y 3' de la cadena antisentido se modifica en sus residuos de azúcar, y cada ribonucleótido en el extremo 5' y 3' de la cadena sentido se modifica en sus residuos de azúcar. En algunas modalidades, tanto la cadena antisentido como la cadena sentido son no-fosforiladas en su extremo 3' y 5'. En otras modalidades, tanto la cadena antisentido como la cadena sentido son fosforiladas en su extremo 3'.

35 En algunos aspectos, un grupo 2'-O-metil está presente en el nucleótido primero, tercero, quinto, séptimo, noveno, undécimo, decimotercero, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno de la cadena antisentido, y en el nucleótido segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo de la cadena sentido.

40 Algunas modalidades de la invención se refieren a una composición farmacéutica que comprende el compuesto como se describe en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Algunas modalidades de la invención se refieren a un compuesto como se describe en la presente, para uso en la terapia.

45 Algunas modalidades de la invención se refieren a un compuesto como se describe en la presente para su uso en el tratamiento de una lesión por isquemia-reperfusión, en donde la lesión por perfusión es la insuficiencia renal aguda (ARF).

50 En ciertas modalidades la presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura:

5' (N)<sub>x</sub> 3' cadena antisentido  
3' (N')<sub>y</sub> 5' cadena sentido

en donde cada uno de N y N' es un nucleótido que puede modificarse o no-modificarse en su residuo de azúcar;

en donde x=y =19 y la secuencia de (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> son completamente complementarias;

55 en donde los ribonucleótidos alternativos en (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> se modifican para resultar en una modificación 2'-O-metil en el residuo de azúcar de los ribonucleótidos; en donde los ribonucleótidos en el extremo 5' y 3' de (N)<sub>x</sub> se modifican;

en donde los ribonucleótidos en el extremo 5' y 3' de (N')<sub>y</sub> no se modifican;  
 en donde (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> están fosforilados y no-fosforilados en el extremo 3' y 5'; y  
 en donde cada uno de N y N' se selecciona del grupo de oligómeros se exponen en la sec. con núms. de ident.139 y 140.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la presente invención, en una cantidad eficaz para inhibir la expresión del gen humano CASP2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, la presente descripción describe un método para la enfermedad o trastorno, asociado con la expresión de CASP2, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un ARNip que reduce o inhibe la expresión de al menos uno de los genes pro-apoptóticos.

15 Más específicamente, la presente descripción describe los métodos y composiciones útiles en el tratamiento de un sujeto que sufre de insuficiencia renal aguda (ARF), pérdida de la audición, glaucoma, síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS) y otras lesiones agudas de pulmón y respiratorias, lesión (por ejemplo, lesión por isquemia-reperfusión) en el trasplante de órganos incluyendo trasplante de pulmón, riñón, médula ósea, corazón, páncreas, córnea o hígado, nefrotoxicidad, lesión de la médula espinal, úlceras por presión, síndrome del ojo seco, mucositis oral y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) .

20 Los métodos descritos comprenden administrar al sujeto uno o más compuestos inhibidores que reduce, inhibe o regula descendente la expresión de CASP2; y en particular ARNip en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo el paciente.

25 En una modalidad, la presente descripción describe los métodos para tratar una enfermedad o afección seleccionada de la pérdida de la audición, insuficiencia renal aguda, glaucoma, síndrome de distrés respiratorio agudo, una lesión pulmonar aguda, rechazo de trasplante de órganos, lesión por isquemia-reperfusión, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, lesión de la médula espinal, úlceras por presión, osteoartritis, síndrome de ojo seco y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un oligonucleótido que inhibe la expresión de un gen cuya secuencia de ARNm se expone en cualquier una de las sec. con núms. de ident.:10-11, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección. En algunas modalidades, el oligonucleótido es ARNip, que comprende preferentemente un oligómero cuya secuencia se expone en cualquier una de las sec. con núms. de ident.: 139-140. En una modalidad, la presente descripción describe los métodos para tratar la insuficiencia renal aguda en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un oligonucleótido que inhibe la expresión de CASP2 (cuya secuencia de ARNm se expone en la sec. con núm. de ident.:10-11 en una cantidad eficaz para tratar la insuficiencia renal aguda.

35 En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de una dosis terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido sujeto para la preparación de una composición para tratar un sujeto que sufre de una enfermedad o afección seleccionada de pérdida de la audición, insuficiencia renal aguda, glaucoma, síndrome de distrés respiratorio agudo, una lesión pulmonar aguda, rechazo de trasplante de órganos, lesión por isquemia-reperfusión, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, lesión de la médula espinal, úlceras por presión, osteoartritis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), en donde el oligonucleótido inhibe la expresión de un gen cuya secuencia de ARNm se expone en cualquier una de las sec. con núms. de ident.:10-11.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La presente invención generalmente se refiere a los compuestos que regulan descendente la expresión de varios genes, incluyendo los genes pro-apoptóticos, particularmente a los nuevos pequeños ARN de interferencia (ARNips), y al uso de estos nuevos ARNip en el tratamiento de varias enfermedades y afecciones médicas. Las enfermedades y afecciones que se tratan en particular comprenden la insuficiencia renal aguda (ARF)

50 Las moléculas y composiciones que inhiben los genes pro-apoptóticos de la invención, y los usos de estos se discuten a lo largo de la presente, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones se pueden emplear de manera beneficiosa en el tratamiento de un sujeto que sufre de cualquiera de dichas afecciones.

55 Cuando se describen los aspectos o modalidades de la invención en términos de grupos de Markush u otra agrupación de alternativas, aquellos con experiencia en la técnica reconocerán que la invención se describe también de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

60



### Genes pro-apoptóticos

Un "gen pro-apoptótico" se define generalmente como un gen que juega un papel positivo en la muerte celular apoptótica. Para los propósitos de esta solicitud, los genes pro-apoptóticos preferidos comprenden CASP2, y los usos preferidos de ARNip u otros inhibidores de CASP2 se listan en la Tabla A más abajo. En vista que los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de las indicaciones enumeradas, debe tenerse en cuenta que ciertos compuestos pueden ser más eficaces en un tejido en particular que en otro. Las indicaciones preferidas se listan en la Tabla A, a continuación.

| Inter.                                                                                                                                                                         | Gen   | Nombre completo e ID del gen humano                      | Enfermedad/ afecciones preferidas                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4                                                                                                                                                                              | CASP2 | caspara 2, cisteína peplidasa relacionada con apoptosis  | ARF, glaucoma, pérdida de audición, lesión de la médula espinal, trasplante renal, trasplante pulmonar y lesión pulmonar por isquemia-reperfusión, mucositis oral, ojo seco |
|                                                                                                                                                                                |       | gi 39995058 ref NM_032982.2 (sec. con núm. de ident.:10) |                                                                                                                                                                             |
|                                                                                                                                                                                |       | gi 39995060 ref NM_032983.2 (sec. con núm. de ident.:11) |                                                                                                                                                                             |
| ARDS: síndrome de distrés respiratorio agudo; AMD: degeneración macular relacionada con la edad; COPD: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ARF: insuficiencia renal aguda |       |                                                          |                                                                                                                                                                             |

La Tabla A comprende las sec. con núms. de ident. de polinucleótidos del ARNm de los genes de CASP2 dirigido por los compuestos de la presente invención (expuesto como sec. con núms. de ident.:10 y 11). Los genes de CASP2 listados en la Tabla A, *arriba*, se describen con más detalle como sigue:

#### **Caspasa 2, cisteína peptidasa asociada a la apoptosis (precursor celular neural 2 expresado y regulado descendente en el desarrollo (CASP2))**

Alias del gen: CASP-2, ICH-1L, ICH-1L/1S, ICH1, NEDD2; ICH-1 proteasa; gen regulador de apoptosis NEDD2; caspasa 2, cisteína proteasa relacionada a la apoptosis.

Este gen codifica una proteína, que es un miembro de la familia de la cisteína-ácido aspártico proteasa (caspasa). La activación secuencial de las caspasas juega un papel central en la ejecución de fases de la apoptosis celular. Las caspasas existen como proenzimas inactivas, que se someten al procesamiento proteolítico en residuos de aspártico conservados para producir dos subunidades, grande y pequeña, que se dimerizan para formar la enzima activa. La escisión proteolítica de esta proteína se induce por una variedad de estímulos apoptóticos. El empalme alternativo de este gen resulta en múltiples variantes de la transcripción que codifican diferentes isoformas. Las secuencias de polinucleótido de variantes de la transcripción de CASP2 humana 1 y 3 se exponen en las sec. con núms. de ident.:10-11, respectivamente, y las secuencias polipeptídicas correspondientes se exponen en las sec. con núms. de ident.:58-59, respectivamente.

La patente de Estados Unidos núm. 6,083,735 se refiere a los productos de corte y empalme alternativos de Casp2. Las patentes de Estados Unidos núms. 5,929,042 y 7,223,856 describen compuestos específicos de la Casp2 antisentido para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos. La publicación internacional de patente WO 02/024720 enseña la Casp2 antisentido. La publicación internacional de patente WO 02/034201 describe los métodos para tratar la retinopatía diabética; WO 03/05821 se refiere a la inhibición de los genes relacionados a la apoptosis; WO 2004/009797 enseña la Casp2 antisentido; y WO 2004/103389 se refiere a los métodos para prevenir la muerte celular. WO 2004/103389 enseña diversos ARNips que inhiben el gen Casp2.

Un "polipéptido pro-apoptótico" se refiere a un polipéptido codificado por los genes de CASP2 enumerados anteriormente, incluyendo las variantes de corte y empalme, isoformas, ortólogos o parálogos, y similares.

Un "inhibidor" es un compuesto que es capaz de inhibir la expresión de un gen o la actividad del producto de dicho gen en un grado suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. El término "inhibidor" como se usa en la presente se refiere a uno o más de un inhibidor de oligonucleótido, incluyendo ARNip, ARNhc, aptámeros, moléculas antisentido, miARN y ribozimas, así como anticuerpos. El inhibidor puede causar la inhibición completa o parcial.

El término "inhibir" como se usa en la presente, se refiere a reducir la expresión de un gen o la actividad del producto de dicho gen en una medida suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado. La inhibición puede ser completa o parcial.

Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se pueden usar de manera intercambiable y se refieren a las secuencias de nucleótidos que comprenden el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los términos deben entenderse también que incluyen, como equivalentes, análogos ya sea de ARN o ADN a los análogos hechos de nucleótido. A lo largo de esta solicitud, las secuencias de ARNm se exponen en representación de los genes correspondientes.

"Oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos. Cada nucleótido de ADN o ARN puede ser, independientemente, natural o sintético, y o modificado o sin modificar. Las modificaciones incluyen cambios en la porción de azúcar, la porción de la base y las uniones entre nucleótidos en el oligonucleótido.

La presente invención proporciona composiciones para inhibir la expresión de un gen pro-apoptótico objetivo *in vivo*, y sus usos en la terapia. Particularmente, los compuestos se pueden usar para inhibir la expresión del gen de la CASP2 pro-apoptótica en el tratamiento de una enfermedad.

Como se describe en la presente, las moléculas de ARNip o inhibidores del gen pro-apoptótico se usan como fármacos para tratar varias patologías.

#### **Oligoribonucleótidos ARNip**

La selección y síntesis del ARNip correspondiente a los genes conocidos se ha reportado ampliamente; ver por ejemplo Ui-Tei y otros, J Biomed Biotechnol. 2006; 65052; Chalk y otros, BBRC. 2004, 319(1):264-74; Sioud y Leirdal, Met. Mol Biol.; 2004, 252:457-69; Levenkova y otros, Bioinform. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei y otros, NAR 2004, 32(3):936-48. Para ejemplos de uso de, y producción de, ARNip modificados ver Braasch y otros, Biochem., 2003, 42(26):7967-75; Chiu y otros, RNA, 2003, 9(9):1034-48; PCT publications WO 2004/015107 (atugen); WO 02/44321 (Tuschl y otros), y las patentes de Estados Unidos núms. 5,898,031 y 6,107,094.

Diversos grupos describieron el desarrollo de vectores basados en ADN capaces de generar el ARNip en las células. El método generalmente involucra la transcripción de ARN horquilla pequeños que son eficientemente procesados para formar ARNip dentro de las células (Paddison y otros, PNAS USA 2002, 99:1443-1448; Paddison y otros, Genes & Dev 2002, 16:948-958; Sui y otros, PNAS USA 2002, 8:5515-5520; y Brummelkamp y otros, Science 2002, 296:550-553). Estos reportes describen métodos para generar los ARNip capaces de dirigir específicamente numerosos genes expresados endógena y exógenamente.

La presente invención proporciona oligoribonucleótidos de cadena doble (por ejemplo, ARNips), que regulan descendente la expresión del gen pro-apoptótico de acuerdo con la presente invención. Un ARNip de la invención es un oligoribonucleótido dúplex en el que la cadena sentido se deriva de la secuencia de ARNm del gen de pro-apoptótico, y la cadena antisentido es complementaria a la cadena sentido. Generalmente, alguna desviación de la secuencia de ARNm objetivo se tolera sin comprometer la actividad del ARNip (ver por ejemplo Czauderna y otros, 2003, NAR 31(11), 2705-2716). Un ARNip de la invención inhibe la expresión génica a nivel post-transcripcional con o sin destruir el ARNm. Sin estar limitado por la teoría, el ARNip puede enfocar el ARNm a la escisión y degradación específica y/o puede inhibir la traducción del mensaje dirigido.

Como se usa en la presente, el término "ribonucleótido" abarca ribonucleótidos naturales y sintéticos, no modificados y modificados. Las modificaciones incluyen los cambios en la porción de azúcar, en la porción de la base y/o en las uniones entre ribonucleótidos en el oligonucleótido.

En algunas modalidades el oligoribonucleótido de acuerdo con la presente invención comprende el ARNip modificado. En varias modalidades el ARNip comprende un ARN dúplex que comprende una primera hebra y una segunda hebra, por lo que la primera hebra comprende una secuencia de ribonucleótido de sec. con núm. de ident.:139, y la segunda hebra comprende la secuencia de ribonucleótido de sec. con núm. de ident.:140, y en donde dicha primera hebra y/o dicha segunda hebra comprende una pluralidad de grupos de ribonucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2' de la porción de azúcar por lo que dentro de cada hebra cada grupo de ribonucleótidos modificados se flanquea en uno o ambos lados por un grupo de ribonucleótidos de flanqueo por lo cual cada ribonucleótido que forma el grupo de ribonucleótido de flanqueo se selecciona de un ribonucleótido modificado o un ribonucleótido que tiene una modificación distinta de la modificación de los grupos de ribonucleótidos modificados.

En una modalidad, el grupo de ribonucleótidos modificados y/o el grupo de ribonucleótidos de flanqueo comprende un número de ribonucleótidos seleccionados del grupo que consiste de un entero de 1 a 12. En consecuencia, el grupo comprende así un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, cuatro nucleótidos, cinco nucleótidos, seis nucleótidos, siete nucleótidos, ocho nucleótidos, nueve nucleótidos, diez nucleótidos, once nucleótidos o doce nucleótidos.

- Los grupos de nucleótidos modificados y nucleótidos de flaqueo se pueden organizar en un patrón en al menos una de las hebras. En algunas modalidades la primera y segunda hebras comprenden un patrón de nucleótidos modificados. En otra modalidad, sólo una hebra comprende un patrón de nucleótidos modificado. En varias modalidades el patrón de nucleótidos modificados de dicha primera hebra es idéntico con relación al patrón de nucleótidos modificadas de la segunda hebra.
- En otras modalidades el patrón de nucleótidos modificados de dicha primera hebra se cambia en uno o más nucleótidos con relación al patrón de nucleótidos modificados de la segunda hebra.
- En algunas modalidades preferidas, el ribonucleótido medio en la cadena antisentido es un nucleótido no modificado. Por ejemplo, en una cadena antisentido oligómero-19, el ribonucleótido número 10 está sin modificar; en una cadena antisentido oligómero-21, el ribonucleótido número 11 está sin modificar; y en una cadena antisentido oligómero-23, el ribonucleótido número 12 está sin modificar. Las modificaciones o patrón de modificación, en el caso, del ARNip se pueden planificar para permitirlos.
- Las modificaciones en la porción 2' del residuo de azúcar incluyen amino, fluoro, alcoxi por ejemplo metoxi, alquilo, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, imidazol, caboxilato, tioato, C1 a C<sub>10</sub> alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF<sub>3</sub>, OCN, O-, S-, o N- alquilo; O-, S, o N-alqueno; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido entre otros, descritos en las patentes europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1.
- En algunas modalidades el ARNip presenta extremos romos, en uno o ambos extremos. Más específicamente, el ARNip puede ser de extremo romo en el extremo definido por el terminal 5' de la primera hebra y el terminal 3' de la segunda hebra, o el extremo definido por el terminal 3' de la primera hebra y el terminal 5' de la segunda hebra. En otras modalidades al menos una de las dos hebras puede tener un saliente de al menos un nucleótido en el terminal 5'. Al menos una de las hebras también puede opcionalmente tener un saliente de al menos un nucleótido en el terminal 3'. El saliente puede consistir de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos consecutivos. Un nucleótido del saliente puede ser un ribonucleótido o desoxiribonucleótido modificado o no-modificado.
- La longitud del ARN dúplex es de aproximadamente 19 a aproximadamente 40 ribonucleótidos, preferentemente 19 ribonucleótidos. Además, la longitud de cada hebra puede independientemente tener una longitud seleccionada del grupo que consiste de aproximadamente 19 a aproximadamente 40 bases, preferentemente 19 bases.
- Además, la complementariedad entre dicha primera hebra y el ácido nucleico objetivo puede ser perfecta. En algunas modalidades, las hebras son sustancialmente complementarias, es decir, que tienen uno, dos o hasta tres desajustes entre dicha primera hebra y el ácido nucleico objetivo. Sustancialmente complementaria se refiere a la complementariedad mayor que aproximadamente 84%, con otra secuencia. Por ejemplo, en una región dúplex que consiste de 19 pares de bases un desajuste resulta en 94.7% de complementariedad, dos desajustes resultan en aproximadamente 89.5% de complementariedad y 3 desajustes resultan en aproximadamente 84.2% de complementariedad, rindiendo la región dúplex sustancialmente complementaria. De acuerdo con sustancialmente idéntica se refiere a la identidad mayor que aproximadamente 84%, con otra secuencia.
- En ciertas modalidades, la primera hebra y la segunda hebra comprenden cada una al menos un grupo de ribonucleótidos modificados y al menos un grupo de ribonucleótidos de flaqueo, por lo que cada grupo de ribonucleótidos modificados comprende al menos un ribonucleótido y por lo que cada grupo de ribonucleótidos de flaqueo comprende al menos un ribonucleótido, en donde cada grupo de ribonucleótidos modificados de la primera hebra se alinea con un grupo de ribonucleótidos de flaqueo en la segunda hebra, y en donde el ribonucleótido más terminal en 5' se selecciona de un grupo de ribonucleótidos modificados, y el ribonucleótido más terminal en 3' de la segunda hebra se selecciona del grupo de ribonucleótido de flaqueo. En algunas modalidades cada grupo de ribonucleótidos modificados consiste de un solo ribonucleótido y cada grupo de ribonucleótidos de flaqueo consiste de un solo nucleótido.
- En aún otras modalidades el ribonucleótido que forma el grupo de ribonucleótidos de flaqueo en la primera hebra es un ribonucleótido sin modificar dispuesto en una dirección 3' con respecto al ribonucleótido que forma el grupo de ribonucleótidos modificados, y el ribonucleótido que forma el grupo de ribonucleótidos modificados en la segunda hebra es un ribonucleótido modificado que está dispuesto en la dirección 5' con respecto al ribonucleótido que forma el grupo de ribonucleótidos de flaqueo. En algunas modalidades la primera hebra del ARNip comprende de cinco a aproximadamente veinte, de ocho a doce, preferentemente de nueve a doce, grupos de ribonucleótidos modificados, y la segunda hebra comprende de siete a once, preferentemente de ocho a once, grupos de ribonucleótidos modificados.

La primera hebra y la segunda hebra pueden estar unidas por una estructura de bucle, que puede estar compuesta por un polímero de ácido no-nucleico, tales como, *entre otros*, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura de lazo puede estar compuesta de un ácido nucleico, incluyendo ribonucleótidos modificados y no modificados y desoxiribonucleótidos modificados y no modificados.

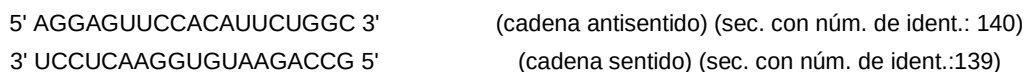
Además, el terminal 5' de la primera hebra del ARNip puede estar unido con el terminal 3' de la segunda hebra, o el terminal 3' de la primera hebra puede estar unido con el terminal 5' de la segunda hebra, donde dicho enlace es a través de un enlazador de ácido nucleico o un enlazador no de ácido nucleico. En algunas modalidades un enlazador de ácido nucleico tiene una longitud de entre aproximadamente 2-100 ácidos nucleicos, preferentemente aproximadamente 2 a aproximadamente 30 ácidos nucleicos.

En varias modalidades, la presente invención proporciona un compuesto ARN de cadena doble que tiene la estructura:



donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo de azúcar; y cada uno de  $(N)_x$  y  $(N')_y$  es un oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' por un enlace covalente; en donde cada uno de x e y es un entero entre 19 y 40; en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es 1-5 nucleótidos consecutivos covalentemente unidos al terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y en donde la secuencia de  $(N)_x$  comprende la sec. con núm. de ident.:140 y la secuencia de  $(N')_y$  comprende la sec. con núm. de ident.:139.

En un aspecto, la descripción describe un compuesto ARN de hebra doble que tiene la estructura:



en donde cada A, C, G, y U es un ribonucleótido que puede estar modificado o no modificado en su residuo de azúcar; y en donde cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido por un enlace covalente.

En algunas modalidades el compuesto comprende un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, el enlace covalente que une cada N o N' consecutivo es un enlace fosfodiéster.

En varias modalidades el compuesto comprende ribonucleótidos en donde  $x = y = 19$ .

En algunas modalidades el compuesto tiene extremos romos, por ejemplo en donde Z y Z' están ausentes. En una modalidad alternativa, el compuesto comprende al menos un 3' sobresaliente, en donde al menos uno de Z o Z' está presente. Z y Z' pueden independientemente comprender uno o más nucleótidos modificados o no-modificados covalentemente unidos, como descritos *más abajo*, por ejemplo dT o dA invertidos; dT, LNA (ácidos nucleicos cerrados), nucleótido exacto y similares. En algunas modalidades cada Z y Z' son independientemente seleccionados de dT y dTdT.

En algunas modalidades el compuesto comprende uno o más ribonucleótidos no modificados en sus residuos azúcar. En otras modalidades el compuesto comprende al menos un ribonucleótido modificado en el residuo de azúcar. En algunas modalidades el compuesto comprende una modificación en la posición 2' del residuo de azúcar. Las modificaciones en la posición 2' del residuo de azúcar incluye porciones amino, fluoro, alcoxi y alquilo. En algunas modalidades preferidas la modificación alcoxi es una porción metoxi en la posición 2' del residuo de azúcar (2'-O-metilo; 2'-O-Me; 2'-O-CH<sub>3</sub>).

En algunas modalidades el compuesto comprende los ribonucleótidos alternativos modificados en una o ambas cadenas antisentido y sentido. En ciertas modalidades el compuesto comprende los ribonucleótidos alternativos modificados en las cadenas antisentido y sentido. En alguna modalidades preferidas el ribonucleótido medio de la cadena antisentido está sin modificar; por ejemplo el ribonucleótido en la posición 10 en una cadena 19-mer.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura



en donde cada uno de  $x$  y  $y=19$  y  $(N)_x$  y  $(N')_y$  son completamente complementarios;  
 en donde los ribonucleótidos alternativos en  $(N)_x$  y  $(N')_y$  se modifican para resultar en una modificación 2'-O-metil en el residuo de azúcar de los ribonucleótidos;  
 en donde cada  $N$  en los terminales 5' y 3' de  $(N)_x$  están modificados;  
 en donde cada  $N'$  en los terminales 5' y 3' de  $(N')_y$  no están modificados;  
 en donde cada uno de  $(N)_x$  y  $(N')_y$  se selecciona del grupo de oligómeros que se exponen en la sec. con núm. de ident. 139 y 140.

10 Ambos  $(N)_x$  y  $(N')_y$  pueden ser fosforilados o no fosforilados en los terminales 3' y 5'.

En ciertas modalidades de la invención, los ribonucleótidos alternativos se modifican en la posición 2' del residuo de azúcar tanto en las cadenas antisentido como sentido del compuesto. Particularmente el ARNip ejemplificado se modificó de manera que un grupo 2'-O-metil (Me) estaba presente en el primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, oncenno, decimotercer, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno nucleótido de la cadena antisentido, con lo cual una modificación muy similar, es decir, un grupo 2'-O-Me, estaba presente en el segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo nucleótido de la cadena sentido. Además, se debe señalar que estos compuestos ARNip en particular son además de extremo romo.

20 De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, las cadenas antisentido y sentido del ARNip son fosforiladas solo en el terminal 3' y no en terminal 5'. De acuerdo con otra modalidad preferida de la invención, las cadenas antisentido y sentido son no-fosforiladas. De acuerdo con aun otra modalidad preferida de la invención, el ribonucleótido más 5' en la cadena sentido se modifica para eliminar cualquier posibilidad de fosforilación-5' *in vivo*.

## 25 Composiciones farmacéuticas

Si bien es posible que los compuestos de la presente invención se puedan administrar como químicos en bruto, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica. Como consecuencia, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos de la invención; y un portador farmacéuticamente aceptable.  
 30 Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más ARNips diferentes. En una modalidad más particular esta composición puede comprender una mezcla de ARNip con RhoA y ARNip con Casp2. Sin estar ligado por la teoría, RhoA es una GTPasa pequeña que cuando se activa inhibe el sobrecrecimiento de la neurita. Su inhibición es relevante para la lesión de la médula espinal y se puede combinar para esta indicación con los ARNip anti-apoptóticos de la invención. Esto último protegerá, y ARNip con RhoA promoverá la regeneración, y de esta manera se produce un efecto combinado o aun sinérgico.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención unido covalentemente o no covalentemente a uno o más compuestos de la invención en una cantidad eficaz para inhibir los genes pro-apoptóticos de la presente invención; y un portador farmacéuticamente aceptable. El compuesto se puede procesar intracelularmente por complejos celulares endógenos para producir uno o más oligorribonucleótidos de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y uno o más de los compuestos de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la expresión en una célula de un gen pro-apoptótico humano CASP2, el compuesto que comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a la secuencia de  $(N)_x$ ,

Sustancialmente complementario se refiere a la complementariedad de más de aproximadamente 84 %, a otra secuencia. Por ejemplo, en una región dúplex consistente de 19 pares de bases un desajuste resulta en 94.7 % de complementariedad, dos desajustes resultan en aproximadamente 89.5 % de complementariedad y 3 desajustes resultan en aproximadamente 84.2 % de complementariedad, rindiendo la región dúplex sustancialmente complementaria. Como consecuencia sustancialmente idéntica se refiere a la identidad a otra secuencia de más de aproximadamente 84 %.

Además, la invención proporciona un método para inhibir la expresión del gen pro-apoptótico, CASP2, de la presente invención por al menos 20 %, preferentemente 30 %, aún con mayor preferencia 40 % o aún 50 % en comparación con un control que comprende contactar un transcrito de ARNm del gen pro-apoptótico de la presente invención con uno o más de los compuestos de la invención.

En una modalidad, el oligorribonucleótido está inhibiendo CASP2, en el que la inhibición se selecciona a partir del grupo que comprende la inhibición de la función de gene, inhibición de polipéptido e inhibición de la expresión de ARNm.

En una modalidad, el compuesto inhibe un polipéptido pro-apoptótico, por lo que la inhibición se selecciona a partir del grupo que comprende la inhibición de la función (que se puede examinar por un ensayo enzimático o un ensayo de unión con un interactor conocido del gen/polipéptido nativo *entre otros*), inhibición de la proteína (que se puede examinar por inmunoelectrotransferencia, ELISA o inmunoprecipitación, *entre otros*) y la inhibición de la expresión de ARNm (que se puede examinar por transferencia (de tipo) Northern, RT-PCR cuantitativo, hibridación in situ o hibridación en microarreglos, *entre otros*).

En modalidades adicionales, la invención proporciona un compuesto como se describe en la presente descripción para uso en terapia.

Una persona con experiencia en la técnica entenderá que dada la longitud potencial del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención y particularmente de las cadenas individuales que forman tal ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, algunos cambios con relación a la secuencia codificante del gen pro-apoptótico CASP2 de la presente invención a cada lado es posible, donde tales cambios pueden ser hasta 1, 2, 3, 4, 5 y 6 nucleótidos en ambas direcciones, y por el que las moléculas de ácido nucleico así generadas de doble cadena estarán además dentro de la presente invención.

### Administración

Las moléculas ARNip de la presente invención se pueden administrar al tejido objetivo por aplicación directa de las moléculas desnudas preparadas con un portador o un diluyente.

El término "ARNip desnudo" se refiere a moléculas de ARNip que están libres de cualquier vehículo de suministro que actúa para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, que incluye secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes de precipitación y similares. Por ejemplo, ARNip en PBS es "ARNip desnudo".

Sin embargo, en algunas modalidades las moléculas de ARNip de la invención se suministran en formulaciones de liposomas y formulaciones de lipofectina y similares y se pueden preparar por métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núms. 5,593,972, 5,589,466, y 5,580,859.

Los sistemas de suministro dirigidos específicamente al aumento y mejora del suministro de ARNip en las células de mamíferos se han desarrollado, (ver, por ejemplo, Shen y otros, FEBS Let. 2003, 539:111-114; Xia y otros, Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010; Reich y otros, Mol. Vision 2003, 9: 210-216; Sorensen y otros, J. Mol. Biol. 2003, 327: 761-766; Lewis y otros, Nat. Gen. 2002, 32: 107-108 y Simeoni y otros, NAR 2003, 31,11: 2717-2724). El ARNip se ha usado recientemente con éxito para la inhibición de la expresión génica en primates (ver, por ejemplo Tolentino y otros, Retina 24(4):660).

Los portadores farmacéuticamente aceptables, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos, así como portadores de implante se refieren generalmente a rellenos sólidos o líquidos no tóxicos, inertes, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención e incluyen liposomas y microesferas. Los ejemplos de sistemas de suministro útiles en la presente invención incluyen patente de los Estados Unidos núms. 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos otros implantes de este tipo, sistemas de suministro, y módulos son bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. En una modalidad específica de esta invención se pueden seleccionar formulaciones tópicas y transdérmicas. Los ARNip o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran y se dosifican de acuerdo con la buena práctica médica, que tiene en cuenta el estado clínico del sujeto individual, la enfermedad a tratar, el lugar y el método de administración, el esquema de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y otros factores conocidos por los médicos.

La "dosis terapéuticamente eficaz" para los propósitos en la presente está determinada por consideraciones tales como las conocidas en la técnica. La dosis debe ser eficaz para conseguir una mejora que incluye, pero no se limita a la tasa de supervivencia mejorada o la recuperación más rápida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por aquellos con experiencia en la técnica.

En general, la dosis activa del compuesto para humanos está en el intervalo de 1 ng/kg a aproximadamente 20-100 mg/kg peso corporal por día, preferentemente aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 2-10 mg/kg peso corporal por día, en un régimen de una dosis por día o dos o tres o más veces por día por un periodo de 1-4 semanas o más. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de las vías convencionales de administración. Cabe señalar que el compuesto se puede administrar como compuesto o como la sal farmacéuticamente aceptable y puede administrarse solo o como ingrediente activo en combinación con portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse por vía oral, subcutánea o parenteral se incluye la

administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, y administración intranasal, así como las técnicas intratecal y de infusión. Los implantes de los compuestos son también útiles. Las formas líquidas se pueden preparar para inyección, el término incluye subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal, y otras rutas de administración parental. Las composiciones líquidas incluyen las soluciones acuosas, con y sin co-solventes orgánicos, o las suspensiones acuosas o de aceite, las emulsiones con aceites comestibles, así como los vehículos farmacéuticos similares. En una modalidad particular, la administración comprende la administración intravenosa. En otra modalidad particular, la administración comprende la administración tópica o local. Adicionalmente, en ciertas modalidades las composiciones para uso en los tratamientos nuevos de la presente invención se pueden formar como aerosoles, por ejemplo para la administración intranasal. En ciertas modalidades, las composiciones orales (tales como comprimidos, suspensiones, soluciones) pueden ser eficaces para el suministro local a la cavidad oral, tal como la composición oral adecuada para enjuague bucal para el tratamiento de la mucositis oral.

#### Uso en terapia

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto como se describe en la presente para uso en el tratamiento de un sujeto con necesidad de tratamiento para una enfermedad o trastorno asociado con la expresión anormal de los genes proapoptóticos CASP2. El uso del compuesto como se describe en la presente reduce o inhibe la expresión de estos genes.

En modalidades preferidas, el sujeto que se trata es un animal de sangre caliente y, particularmente, mamíferos, que incluyen humanos.

Los compuestos descritos comprenden compuestos inhibidores que se administran al sujeto, para disminuir la expresión del gen proapoptótico CASP2, en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo al sujeto.

En varias modalidades, el compuesto inhibidor se selecciona a partir del grupo que consiste de ARNip, ARNhc, un aptámero, una molécula antisentido, miARN, una ribozima, y un anticuerpo. En las modalidades actualmente preferidas, el inhibidor es ARNip.

El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o demorar (disminuir) el trastorno relacionado con el pro-apoptótico según lo indicado anteriormente. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya experimentan la enfermedad o afección, los propensos a tener la enfermedad o afección, y aquellos en los que la enfermedad o afección tiene que ser prevenida. Los compuestos de la invención se pueden administrar antes, durante o después de la aparición de la enfermedad o afección o de los síntomas asociados con la misma. En los casos donde el tratamiento es para el propósito de la prevención, la presente invención después se refiere a los compuestos como se describe en la presente para el uso en el retraso de la aparición de o evitar el desarrollo de la enfermedad o trastorno.

La presente invención se refiere al uso de compuestos que disminuyen la expresión de los genes pro-apoptóticos de la invención particularmente a ARNs de interferencia nuevos pequeños (ARNips), en el tratamiento de la insuficiencia renal aguda (ARF).

Las moléculas y composiciones que inhiben los genes pro-apoptóticos de la invención, y usos de estos, se discuten en la presente en longitud, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones se pueden emplear de manera beneficiosa en el tratamiento de un sujeto que sufre de cualquiera de dichas afecciones. Las secuencias de oligómeros preferidas útiles en la preparación de ARNip dirigido a los genes pro-apoptóticos seleccionados se exponen en las sec. con núms. de ident.: 139 y 140.

En otra modalidad preferida, los compuestos de la invención se usan para tratar la insuficiencia renal aguda, particularmente insuficiencia renal aguda debido a la isquemia en pacientes post quirúrgicos, y la insuficiencia renal aguda debido al tratamiento de quimioterapia, tales como la administración de cisplatino o insuficiencia renal aguda asociada a la sepsis. Un uso preferido de los compuestos de la invención es para la prevención de la insuficiencia renal aguda en pacientes de alto riesgo sometidos a cirugía cardíaca o cirugía vascular mayor. Los pacientes con alto riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda se pueden identificar usando varios métodos de puntuación, tal como el algoritmo Clínico Cleveland, o la desarrollada por los Hospitales Académicos de Estados Unidos (QMMI) y por la Administración de Veteranos (CICSS). Otros usos preferidos de los compuestos de la invención son para la prevención de la insuficiencia renal aguda isquémica en los pacientes con trasplante de riñón o para la prevención de la insuficiencia renal aguda tóxica en pacientes que reciben quimioterapia.

La presente invención proporciona además un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende:

proporcionar uno o más compuesto de doble cadena de la invención; y

mezclar dicho compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable .

La presente invención proporciona además un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar uno o más compuestos de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad preferida, el compuesto usado en la preparación de una composición farmacéutica se mezcla con un portador en una dosis farmacéuticamente eficaz. En una modalidad particular, el compuesto de la presente invención se conjuga a un esteroide o a un lípido o a otra molécula adecuada, por ejemplo al colesterol.

### Modificaciones

Las modificaciones o los análogos de los nucleótidos se pueden introducir para mejorar las propiedades terapéuticas de los nucleótidos. Las propiedades mejoradas incluyen un aumento de la resistencia a las nucleasas y/o aumento de la capacidad para penetrar las membranas celulares.

Como consecuencia, la presente invención incluye además todos los análogos de, o modificaciones a, un oligonucleótido de la invención que no afecta sustancialmente la función del polinucleótido u oligonucleótido. En una modalidad preferida tal modificación se relaciona con la porción base del nucleótido, con la porción azúcar del nucleótido y/o con la porción fosfato del nucleótido.

En una modalidad la modificación es una modificación de la porción fosfato, en donde la porción fosfato modificada se selecciona del grupo que comprende fosfotioato.

Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleico) oligonucleótidos. Tal síntesis, se describe, entre otros, en Beaucage and Iyer, Tetrahedron 1992; 48:2223-2311; Beaucage and Iyer, Tetrahedron 1993; 49: 6123-6194 y Caruthers, y otros, Methods Enzymol. 1987; 154: 287-313; la síntesis de los tioatos, se describe, entre otros, en Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 367-402, la síntesis de las moléculas de ARN se describe en Sproat, en Humana Press 2005 Editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y los procesos corriente abajo respectivos se describen, entre otros, en Pingoud y otros, en IRL Press 1989 editado por Oliver R.W.A.; Kap. 7: 183-208.

Otros procedimientos de síntesis son conocidos en la técnica, por ejemplo los procedimientos como se describe en Usman y otros, 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe y otros, 1990, NAR., 18, 5433; Wincott y otros, 1995, NAR. 23, 2677-2684; y Wincott y otros, 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, y estos procedimientos pueden hacer uso de grupos de protección y acoplamiento de ácido nucleico comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditas en el extremo 3'. Los nucleótidos modificados (por ejemplo 2'-O-metilado) y nucleótidos no modificados se incorporan según se desee.

Los oligonucleótidos de la presente invención se pueden sintetizar por separado y unidos entre sí post- sintéticamente, por ejemplo, por ligación (Moore y otros, 1992, Science 256, 9923; Draper y otros, Publicación de Patente Internacional núm. WO 93/23569; Shabarova y otros, 1991, NAR 19, 4247; Bellon y otros, 1997, Nucleosides & nucleótidos, 16, 951; Bellon y otros, 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), o por hibridación después de la síntesis y/o desprotección.

Se observa que una máquina disponible en el comercio (disponible, *entre otros*, de Applied Biosystems) se puede usar; los oligonucleótidos se preparan de acuerdo con las secuencias descritas en la presente. La superposición de pares de fragmentos sintetizados químicamente se pueden ligar usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo., ver Patente de Estados Unidos núm. 6,121,426). Las hebras se sintetizan separadamente y luego se hibridan entre sí en el tubo. Después, los ARNip de doble cadena se separan por HPLC de los oligonucleótidos de hebra simple que no hibridan (por ejemplo debido al exceso de uno de ellos) por HPLC. En relación con los ARNip o los fragmentos de ARNip de la presente invención, dos o más de tales secuencias se pueden sintetizar y unir entre sí para su uso en la presente invención.

Los compuestos de la invención se pueden sintetizar además a través de metodología de síntesis en tándem, como se describe por ejemplo en la publicación de la Patente de Estados Unidos núm. US 2004/0019001 (McSwiggen), en donde ambas cadenas de ARNip se sintetizan como un único fragmento de oligonucleótido contiguo o hebra separada por un enlazador escindible que se escinde posteriormente para proporcionar fragmentos de ARNip separados o hebras que se hibridan y permiten la purificación del dúplex de ARNip . El enlazador puede ser un enlazador polinucleótido o un enlazador no nucleotídico.



La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende dos o más moléculas de ARNip para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas en la presente, por lo que dichas dos moléculas se pueden mezclar físicamente entre sí en la composición farmacéutica en cantidades que generan actividad igual o de cualquier otra forma beneficiosa o se pueden unir covalentemente o no covalentemente, o unidos entre sí por un enlazador de ácido nucleico de una longitud con intervalo de 2-100, preferentemente 2-50 o 2-30 nucleótidos. En una modalidad, las moléculas de ARNip se componen de una estructura del ácido nucleico de doble cadena como se describe en la presente, en donde las dos secuencias de ARNip se seleccionan de los ácidos nucleicos que se exponen en la Tabla B.

Así, las moléculas de ARNip se pueden unir covalentemente o no covalentemente o unir por un enlazador para formar un compuesto de ARNip en tándem. Tales compuestos ARNip en tándem que comprenden dos secuencias de ARNip son típicamente de 38-150 nucleótidos de longitud, más preferentemente 38 o 40-60 nucleótidos de longitud, y en consecuencia más largo si más de dos secuencias de ARNip se incluyen en la molécula en tándem. Un compuesto en tándem más largo comprende dos o más secuencias más largas que codifican ARNip producidos a través del procesamiento celular interno, por ejemplo, ARNbc largos, se prevé además, como es una molécula en tándem que codifica dos o más ARNhc. Tales moléculas en tándem se consideran además parte de la presente invención. Un compuesto en tándem se prevé que comprende dos o más secuencias de los ARNip de la invención. En una modalidad particular, el tándem comprende RhoA ARNip unido covalentemente a uno o más de los otros ARNip de la invención. En una modalidad más particular, el compuesto en tándem puede comprender una secuencia que comprende ARNip con RhoA y una secuencia que comprende ARNip con Casp2. Sin estar ligado por la teoría RhoA es una GTPasa pequeña que cuando se activa inhibe el sobrecrecimiento de neurita y su inhibición es relevante para la lesión de la médula espinal. Así un compuesto en tándem para esta indicación puede comprender la secuencia RhoA ARNip y una o más secuencias de ARNip con los ARNip anti-apoptóticos de la invención. Este último protegerá y ARNip con RhoA promoverá la regeneración, y de esta manera se produce un efecto combinado o aún sinérgico.

Las moléculas de ARNip que se dirigen a los genes pro-apoptóticos de la invención pueden ser el principal componente activo en una composición farmacéutica, o puede ser un componente activo de una composición farmacéutica que contiene dos o más ARNip (o moléculas que codifican o endógenamente producen dos o más ARNip ya sea una mezcla de moléculas o una o más moléculas en tándem que codifican dos o más ARNip), dicha composición farmacéutica adicionalmente comprende una o más moléculas de ARNip adicionales que se dirigen a uno o más genes adicionales. La inhibición simultánea de dicho(s) gene(s) adicional (es) tendrá probablemente un efecto aditivo o sinérgico para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente.

Además, el ARNip pro-apoptótico descrito en la presente o cualquier molécula de ácido nucleico que comprende o que codifica tales ARNip se puede enlazar o unir (covalentemente o no covalentemente) a anticuerpos (incluyendo moléculas aptámero) contra moléculas internalizables de la superficie celular expresadas en las células objetivo, para lograr una orientación mejorada para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Fas (preferentemente un anticuerpo neutralizante) se pueden combinar (covalentemente o no covalentemente) con cualquier ARNip pro-apoptótica. En otro ejemplo, un aptámero que puede actuar como un ligando/anticuerpo se puede combinar (covalentemente o no covalentemente) con cualquier ARNip pro-apoptótico.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse bien directamente o con vectores virales o no virales. Cuando se administran directamente las secuencias generalmente se hacen resistentes a las nucleasas. Alternativamente, las secuencias se pueden incorporar en casetes de expresión o construcciones tales que la secuencia se expresa en la célula como se discute en la presente más abajo. Generalmente, la construcción contiene la adecuada secuencia reguladora o el promotor para permitir que la secuencia se exprese en la célula objetivo. Los vectores opcionalmente usados para la administración de los compuestos de la presente invención están disponibles en el comercio, y se pueden modificar con el propósito de la administración de los compuestos de la presente invención por métodos conocidos por un experto en la técnica.

se prevé además que un oligonucleótido largo (típicamente aproximadamente 25 a 500 nucleótidos de longitud) comprende uno o más tallos y estructuras de lazo, donde las regiones del tallo que comprenden las secuencias de los oligonucleótidos de la invención, se pueden administrar en un portador, preferentemente un portador farmacéuticamente aceptable, y los complejos celulares endógenos lo pueden procesar intracelularmente (por ejemplo, por Drosha y Dicer como se describió anteriormente) para producir uno o más pequeños oligonucleótidos de doble cadena (ARNips) que son oligonucleótidos de la invención. Este oligonucleótido se puede denominar una construcción de ARNhc en tándem. Se prevé que este oligonucleótido largo es un oligonucleótido de hebra simple que comprende uno o más estructuras de tallos y lazos, donde cada región del tallo comprende una secuencia de ARNip sentido y la correspondiente antisentido de los genes apoptóticos de la invención. Particularmente, se prevé que este oligonucleótido comprende secuencias de ARNip sentido y antisentido, que se exponen en las sec. con núms. de ident.: 139 y 140.

Todos los análogos de, o modificaciones a, un nucleótido / oligonucleótido se puede emplear con la presente invención, siempre que dicho análogo o modificación no afecte sustancialmente la función del nucleótido / oligonucleótido. Los nucleótidos se pueden seleccionar de bases modificadas de origen natural o sintético. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos incluyen inosina xantina, hipoxantina, 2 - amino adenina, 6-metilo, 2-propilo y otras adeninas de alquilo, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, citosina 6-aza y timina 6-aza, pseudo uracilo, 4 - tiuracilo, 8-halo adenina, 8-amino adenina, 8-tiol adenina, 8-tiolalquilo adeninas, 8-hidroxilo adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8 -tioalquilo guaninas, 8 - hidroxilo guanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y deaza adeninas, otras aza y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5 - trifluoro citosina. En algunas modalidades uno o más nucleótidos en un oligómero se sustituyen con inosina.

Además, los análogos de los polinucleótidos se pueden preparar en donde la estructura de uno o más nucleótidos se altera fundamentalmente y se adaptan mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en donde la desoxirribosa (o ribosa) del esqueleto de fosfato en el ADN (o ARN se sustituye con un esqueleto de poliamida el cual es similar al encontrado en los péptidos. Se demostró que los análogos de PNA son resistentes a la degradación por enzimas y tienen estabilidad extendida *in vivo* e *in vitro*. Otras modificaciones que se pueden hacer a los oligonucleótidos incluyen cadenas principales de polímeros, cadenas principales cíclicas, cadenas principales acíclicas, cadenas principales tiofosfato-D-ribosa, cadenas principales de triéster, cadenas principales tioato, cadenas principales con puente 2'-5', ácidos nucleicos artificiales, ácidos nucleicos morfolino, el ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicol (GNA), ácido nucleico treosa (TNA), arabinósido, y nucleósido espejo (por ejemplo, beta-L-desoxinucleósido en lugar de beta-D-desoxinucleósido). Ejemplos de compuestos que comprenden nucleótidos LNA se describen en Elmen y otros, (NAR 2005, 33(1):439-447).

Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar usando uno o más nucleótidos invertidos por ejemplo timidina invertida o invertida adenina (ver, por ejemplo, Takei, y otros, 2002, JBC 277(26):23800-06).

Un nucleótido "espejo" es un nucleótido con quiralidad inversa a la de nucleótidos de origen natural o comúnmente empleado, es decir, una imagen de espejo (L- nucleótidos) de la de origen natural (D- nucleótidos). El nucleótido puede ser un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido y comprenden además al menos un azúcar, base y o modificación de la cadena principal. La Patente de Estados Unidos núm. 6,602,858 describe catalizadores de ácido nucleico que comprenden al menos una sustitución de L- nucleótidos .

Aunque los inhibidores de la presente invención son preferentemente moléculas de ARNip, otros inhibidores contemplados que se usan en los métodos de la invención para inhibir un gen pro-apoptótico y para tratar las enfermedades y afecciones descritas en la presente descripción son *entre otros* anticuerpos, preferentemente anticuerpos neutralizantes o fragmentos de estos, que incluyen anticuerpos de cadena sencilla, oligonucleótidos antisentido, moléculas de ARN o ADN antisentido, ribozimas, proteínas, polipéptidos y péptidos que incluyen peptidomiméticos y negativos dominantes, y vectores de expresión que expresan además todo lo anterior. Inhibidores adicionales pueden ser moléculas químicas pequeñas, que generalmente tienen un peso molecular de menos de 2000 daltons, con mayor preferencia menos de 1000 daltons, aun con mayor preferencia menos de 500 daltons. Estos inhibidores pueden actuar como sigue: pequeñas moléculas pueden afectar la expresión y/o actividad; anticuerpos pueden afectar la actividad; todo tipo de antisentido pueden afectar la expresión de genes pro-apoptóticos; y polipéptidos dominantes negativos peptidomiméticos pueden afectar a la actividad; vectores de expresión pueden ser usados *entre otros* para el suministro de polipéptidos dominante-negativos o antisentido o anticuerpos.

#### Anticuerpos

El término "anticuerpo" se refiere al anticuerpo IgG, IgM, IgD, IgA, e IgE, *entre otros*. La definición incluye anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales. Este término se refiere a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión al antígeno, por ejemplo, anticuerpos sin la porción Fc, anticuerpos de cadena sencilla, minianticuerpos, fragmentos que consisten esencialmente sólo de la variable, dominio del anticuerpo de unión al antígeno, etc. El término "anticuerpo" puede referirse además a anticuerpos contra secuencias de polinucleótidos obtenidas por la vacunación de ADNc. El término abarca además fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse selectivamente con su antígeno o receptor y se ejemplifican como sigue, *entre otros*:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo que se puede producir por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera y una porción de la cadena pesada;

(2) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab unidos entre sí por dos enlaces disulfuro;

(3) Fv, definido como un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y

(4) anticuerpos de cadena sencilla (SCA), definido como una molécula genéticamente modificada que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

### Moléculas antisentido

Por el término "antisentido" (AS) o "fragmento antisentido" se entiende un fragmento de polinucleótido (que comprende ya sea desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o una mezcla de ambos) que tiene actividad inhibidora antisentido, dicha actividad que causa una disminución en la expresión de la copia genómica endógena del gen correspondiente. Un polinucleótido AS es un polinucleótido que comprende los nucleótidos consecutivos que tiene una secuencia de longitud y homología suficiente con una secuencia presente en la secuencia del gen objetivo para permitir la hibridación del AS al gen. Muchas revisiones han cubierto los principales aspectos de la tecnología antisentido (AS) y su enorme potencial terapéutico (Aboul-Fadl, *Curr Med Chem.* 2005.12(19):2193-214; Crooke, *Curr Mol Med.* 2004. 4(5):465-87; Crooke, *Annu Rev Med.* 2004;55:61-95; Vacek y otros, *Cell Mol Life Sci.* 2003. 60(5):825-33; Cho-Chung, *Arch Pharm Res.* 2003. 26(3):183-91. Existen otras revisiones en la química (Crooke, 1995; Uhlmann y otros, 1990), celular (Wagner, 1994. *Nature.* 24;372(6504):333-5) y terapéutica (Hanania, y otros, 1995; Scanlon, y otros, 1995; Gewirtz, 1993) aspectos de esta tecnología. La intervención antisentido en la expresión de genes específicos se puede lograr por el uso de secuencias de oligonucleótidos AS sintéticas (ver, por ejemplo Zhang y otros, *Curr Cancer Drug Targets.* 2005 5(1):43-9.)

Las secuencias de oligonucleótidos AS pueden ser secuencias cortas de ADN, típicamente de 15-30 mer pero pueden ser tan pequeñas como 7 mer (Wagner y otros, 1996 *Nat Biotechnol.* 14(7):840-4), diseñado para complementar un ARNm objetivo de interés y formar un duplex ARN:AS. Esta formación de dúplex puede prevenir el procesamiento, empalme, transporte o traducción del ARNm relevante. Además, ciertas secuencias de nucleótido AS pueden provocar actividad Ribonucleasa H celular cuando se hibridan con su ARNm objetivo, resultando en la degradación del ARNm (Calabretta y otros, 1996 *Semin Oncol.* 23(1):78-87). En ese caso, la Ribonucleasa H escindirá el componente ARN del dúplex y puede potencialmente liberar el AS para hibridarse además con moléculas adicionales del ARN objetivo. Un modo de acción adicional resulta de la acción interacción de AS con el ADN genómico para formar una triple hélice que puede ser transcripcionalmente inactiva.

El segmento objetivo de la secuencia del oligonucleótido antisentido se selecciona tal que la secuencia exhibe características relacionadas con la energía adecuada importantes para la formación de dúplex oligonucleótido con sus moldes complementarios, y muestra un bajo potencial de auto-dimerización o auto-complementación (Anazodo y otros, 1996 *BBRC.* 229(1):305-9). Por ejemplo, el programa informático OLIGO (Programa de Análisis de Cebador Versión 3.4), se puede usar para determinar la temperatura de fusión de la secuencia antisentido, propiedades de la energía libre, y para estimar el potencial de formación de auto-dímero y propiedades de auto-complementaridad. El programa permite la determinación de una estimación cualitativa de estos dos parámetros (formación potencial de auto-dímero y auto-complementaridad) y proporciona una indicación de "sin potencial" o "algún potencial" o "potencial prácticamente completo". Usando este programa los segmentos objetivos se seleccionan generalmente que tienen estimaciones de sin potencial en estos parámetros. Sin embargo, los segmentos se pueden usar que tienen "algún potencial" en una de las categorías. Un equilibrio de los parámetros se usa en la selección como se conoce en la técnica. Además, los oligonucleótidos se seleccionan además según sea necesario de manera que la sustitución del análogo no afecte sustancialmente la función.

Oligonucleótidos antisentido fosforotioato normalmente no muestran toxicidad significativa a concentraciones que son eficaces y exhiben vidas medias farmacodinámicas suficientes en animales. Los fenotipos con pérdida de función inducidos por antisentido relacionadas con el desarrollo celular se muestran para una variedad de diferentes genes, que incluyen la integrina (Galileo y otros, *Neuron.* 1992 9(6):1117-31.) y para la proteína N-myc (Rosolen y otros, 1990 *Prog Clin Biol Res.* 366:29-36). La inhibición por oligonucleótidos antisentido de factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), que tiene propiedades mitogénicas y angiogénicas, suprime 80 % de crecimiento en las células de glioma (Morrison, *JBC* 1991 266(2):728-34) de una manera saturable y específica. Siendo los oligonucleótidos antisentido, hidrofóbicos interactúan bien con las membranas de fosfolípidos (Akhter y otros, *NAR.* 1991, 19:5551-5559). Después de su interacción con la membrana plasmática celular, son activamente ( o pasivamente ) transportados en las células vivas (Loke y otros, *PNAS* 1989, 86(10):3474-8), en un mecanismo saturable predicho para involucrar receptores específicos (Yakubov y otros, *PNAS*, 1989 86(17):6454-58).

## Ribozimas

Una "ribozima" es una molécula de ARN que posee capacidad ARN catalítica (ver Cech Biochem Soc Trans. 2002 Nov;30(Pt 6):1162-6, para revisión) y escinde un sitio específico en un ARN objetivo. De acuerdo con la presente invención, las ribozimas que escinden ARNm se pueden utilizar como inhibidores. Esto puede ser necesario en los casos donde la terapia antisentido se limita por consideraciones estequiométricas (Sarver y otros, 1990, Gene Regulation and Aids, págs. 305-325). Las ribozimas que se pueden usar después se dirigirán al gen asociado con una enfermedad de la médula ósea. El número de moléculas de ARN que se escinden por una ribozima es mayor que el número predicho por estequiometría (Hampel y Tritz, Biochem. 1989, 28(12):4929-33; Uhlenbeck, Nature. 1987 328(6131):596-600).

Las ribozimas catalizan la escisión del enlace fosfodiéster del ARN. Varias familias estructurales de ribozima se han identificado que incluyen intrones del Grupo I, Ribonucleasa P, ribozima del virus de la hepatitis delta, ribozimas de cabeza de martillo y ribozima de horquilla derivada originalmente de la cadena negativa del ARN satélite del virus de la mancha anular del tabaco (sTRSV) (Sullivan, 1994; Patente de Estados Unidos núm. 5,225,347). Las últimas dos familias se derivan de viroides y virusoides, en la que se cree que la ribozima separa monómeros a partir de oligómeros creados durante la replicación en círculo rodante (Symons, 1989 y 1992. Los motivos de ribozimas de cabeza de martillo y de horquilla se adaptan más comúnmente para la trans-escisión de ARNm para la terapia génica (Sullivan, 1994). Generalmente la ribozima tiene una longitud de aproximadamente 30-100 nucleótidos. El suministro de ribozimas es similar a esos de los fragmentos AS y/o moléculas de ARNip.

### Tamizaje de compuestos de inactivación de genes pro-apoptóticos:

Algunos de los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden usar en un ensayo de tamizaje para identificar y aislar compuestos que modulan la actividad de un gen pro-apoptótico, particularmente los compuestos que modulan un trastorno acompañado por un nivel elevado de los genes pro-apoptóticos CASP2 de la invención. Los compuestos que se tamizan comprenden *entre otros* sustancias tales como pequeñas moléculas químicas y oligonucleótidos antisentido.

La actividad inhibidora de los compuestos de la presente invención en los genes pro-apoptóticos o la unión de los compuestos de la presente invención a los genes pro-apoptóticos se puede usar para determinar la interacción de un compuesto adicional con el polipéptido pro-apoptótico, por ejemplo, si el compuesto adicional compite con los oligonucleótidos de la presente invención para la inhibición de un gen pro-apoptótico, o si los compuestos adicionales rescatan dicha inhibición. La inhibición o activación se pueden probar por varios medios, tales como, *entre otros*, ensayando para el producto la actividad del polipéptido pro-apoptótico o el desplazamiento del compuesto de unión del polipéptido pro-apoptótico en ensayos de competición radiactivos o fluorescentes.

La presente invención se ilustra en detalle más abajo con referencia a ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

La cita de cualquier documento en la presente no se debe pretender como una admisión de que tal documento sea técnica anterior pertinente o material considerado para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración acerca del contenido o una fecha de cualquier documento se basa en la información disponible por el solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión acerca de la exactitud de dicha declaración.

## EJEMPLOS

### Métodos generales en biología molecular

Las técnicas estándar de biología molecular conocidas en la técnica y que no se describen específicamente fueron generalmente las de Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989), y las de Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) y las de Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Nueva York (1988), y las de Watson y otros, Recombinant DNA, Scientific American Books, Nueva York y las de Birren y otros (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998) y la metodología que se expone en las patentes de Estados Unidos 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo generalmente como en PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990). PCR in situ (en la célula) en combinación con la Citometría de Flujo se puede usar para la detección de células que contienen ADN específico y las secuencias de ARNm (Testoni y otros, 1996, Blood 87:3822.) Métodos para preparar RT-PCR son bien conocidos además en la técnica.

**EJEMPLO 1: Pruebas in vitro de los compuestos ARNip para genes pro-apoptóticos**

## 1. General

5 Aproximadamente  $1.5 \times 10^5$  células de prueba (células HeLa o células 293T de ARNip que se dirigen al gen humano y células NRK52 o células NMuMG de ARNip que se dirigen al gen de rata/ratón) se sembraron por pocillo en placa de 6 pozos (70-80 % de confluencia).

10 Después de 24h las células se transfectaron con oligómeros ARNip usando reactivo Lipofectamina™ 2000 (Invitrogene) a una concentración final de 500 pM, 5 nM, 20 nM o 40 nM. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> por 72 h.

15 Como control positivo para la transfección de las células se usaron oligos ARNip etiquetados con PTEN-Cy3. Como control negativo para la actividad ARNip se usaron oligos GFP ARNip.

Aproximadamente 72h después de la transfección las células se cosecharon y se extrajo el ARN de las células. La eficacia de la transfección se probó por microscopía fluorescente.

20 Los ARNip usados en los experimentos in vitro descritos en el Ejemplo 1 fueron 19-mers o 23 -mers, que tienen ribonucleótidos alternativos modificados tanto en las cadenas antisentido y en sentido del compuesto. Para 19-mers, la modificación fue tal que un grupo 2'-O-metilo (Me) estaba presente en el primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, onceavo, decimotercer, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno nucleótidos de la cadena antisentido, con lo cual una modificación muy similar, es decir, un grupo 2'-O-Me, estaba presente en el segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo nucleótidos de la cadena sentido. Estos compuestos ARNip

25 particulares se terminaron romos además y no se fosforilaron en los extremos, sin embargo, experimentos comparativos han demostrado que los ARNip fosforilados en los terminales 3' tienen actividad similar.

## Resultados:

30 El porcentaje de inhibición de la expresión génica usando los ARNip específicos se determinó usando el análisis de qPCR del gen objetivo en células que expresan el gen endógeno. Los datos de las Tablas C1 y C2 más abajo demuestran el porcentaje de expresión residual del gen objetivo en las células después del tratamiento con las moléculas de ARNip específicas (Tablas C1: compuestos ARNip 19-mer; Tabla C2: compuestos ARNip 23-mer). Generalmente, los ARNip que tienen secuencias específicas que se seleccionaron para la prueba in vitro fueron específicos tanto para genes humanos

35 como rata/conejo. Resultados similares de reducción de la expresión de genes específicos se obtienen con otros ARNip, cuyas secuencias se enumeran en la Tabla B.

Tabla C1: Porcentaje de caída de la expresión del gen humano objetivo en las células usando moléculas de ARNip 19 -mer.

| Gen objetivo | Línea celular* | ARNip. probado                               | Secuencia                                                               | % de control** |
|--------------|----------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------|
| CASP2        | HeLa-          | CASP2_1<br>sec. con núms. de ident.: 133-134 | Sentido:<br>GCACUCCUGAAUUUUUAUCA<br>Antisentido:<br>UGAUAAAAUUCAGGAGUGC | , 812          |
| CASP2        | HeLa-          | CASP2_2<br>sec. con núms. de ident.: 135-136 | Sentido:<br>GCACAGGAAAUGCAAGAGA<br>Antisentido:<br>UCUCUUGCAUUUCCUGUGC  | 25,38          |
| CASP2        | HeLa-          | CASP2_3<br>sec. con núms. de ident.: 137-138 | Sentido:<br>GGGCUUGUGAUUAUGCACGU<br>Antisentido:<br>ACGUGCAUAUCACAAGCCC | 22,39          |

| Gen objetivo                                                                                                                                                                              | Línea celular* | ARNip. probado                               | Secuencia                                                             | % de control** |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------|
| CASP2                                                                                                                                                                                     | HeLa-          | CASP2_4<br>sec. con núms. de ident.: 139-140 | Sentido:<br>GCCAGAAUGUGGAACUCCU<br>Antisentido:<br>AGGAGUUCACAUUCUGGC | , 1811         |
| * línea celular usada en el ensayo, ** % de control en pruebas separadas usando la concentración 20 nM de moléculas de ARNip. Todas las secuencias se presentan en una orientación 5'-3'. |                |                                              |                                                                       |                |

Tabla C2: Porcentaje de caída de la expresión del gen humano objetivo en las células usando moléculas de ARNip 23 mer.

| Gen objetivo                                                                                                                                                                                | Línea celular usada para el análisis | ARNip. probado                               | Secuencia                                                                       | % de control ** |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| CASP2                                                                                                                                                                                       | HeLa-                                | CASP2_1-1<br>sec. con núm. de ident. 267-268 | Sentido:<br>CCUUGCACUCCUGAAUUUUUAUCA<br>Antisentido:<br>UGAUAAAAUUCAGGAGUGCAAGG | 16              |
| CASP2                                                                                                                                                                                       | HeLa-                                | CASP2_1-2<br>sec. con núm. de ident. 269-270 | Sentido:<br>CUUGCACUCCUGAAUUUUUAUCAA<br>Antisentido:<br>UUGAUAAAAUUCAGGAGUGCAAG | 23              |
| CASP2                                                                                                                                                                                       | HeLa-                                | CASP2_1-3<br>sec. con núm. de ident. 271-272 | Sentido:<br>UUGCACUCCUGAAUUUUUAUCAA<br>Antisentido:<br>UUUGAUAAAAUUCAGGAGUGCAA  | 7               |
| CASP2                                                                                                                                                                                       | HeLa-                                | CASP2_1-4<br>sec. con núm. de ident. 273-274 | Sentido:<br>UGCACUCCUGAAUUUUUAUCAAAC<br>Antisentido:<br>GUUUGAUAAAAUUCAGGAGUGCA | 30              |
| CASP2                                                                                                                                                                                       | HeLa-                                | CASP2_1-5<br>sec. con núm. de ident. 275-276 | Sentido:<br>GCACUCCUGAAUUUUUAUCAAACA<br>Antisentido:<br>UGUUUGAUAAAAUUCAGGAGUGC | 10              |
| * línea celular usada en el ensayo, ** % de control en pruebas separadas usando la concentración 20 nM de moléculas de ARNip. Todas las secuencias se presentaron en una orientación 5'-3'. |                                      |                                              |                                                                                 |                 |

**EJEMPLO 2 : sistemas modelo de insuficiencia renal aguda (ARF)**

5

El ARF es un síndrome clínico caracterizado por el rápido deterioro de la función renal que se produce dentro de días. Sin estar atados por la teoría la lesión renal aguda puede ser el resultado de la lesión renal por isquemia-reperusión tales como la lesión renal por isquemia-reperusión en pacientes sometidos a cirugía, tales como la cirugía cardíaca importante. La característica principal de ARF es un declive brusco en la velocidad de filtración glomerular (GFR), resultando en la retención de desechos nitrogenados (urea, creatinina) Estudios recientes, apoyan que la apoptosis en los tejidos renales es prominente en la mayoría de los casos humanos de ARF. El sitio principal de la muerte celular apoptótica es la nefrona

10

distal. Durante la fase inicial de la lesión isquémica, la pérdida de la integridad del citoesqueleto de actina conduce al aplanamiento del epitelio, con pérdida del borde en cepillo, pérdida de células contactos focales, y posterior separación de la célula del sustrato subyacente.

- 5 La prueba de un compuesto activo ARNip se realizó usando un modelo animal de ARF inducida por isquemia-reperusión.

Protección contra la ARF inducida por isquemia-reperusión usando compuestos específicos Rac1, TP53BP2 y Casp2 ARNip.

- 10 La lesión por isquemia-reperusión se indujo en ratas después de 45 minutos de restringir la arteria renal bilateral y la liberación subsiguiente de la pinza para permitir 24 horas de reperusión. Una dosis de 12 mg/kg de los siguientes compuestos ARNip se inyectó en la vena yugular de los animales experimentales individuales 30 minutos antes y 4 horas después de la pinza. La progresión de la ARF se supervisó por la medición de los niveles de creatinina en suero (línea base) y 24 h después de la cirugía.

- 15 Rac1\_2: Secuencia sentido: GAGUCCUGCAUCAUUUGAA, sec. con núm. de ident.: 213; Secuencia antisentido: UUCAAAUGAUGCAGGACUC, sec. con núm. de ident.: 214.

- 20 TP53BP2\_2: Secuencia sentido: CACCCAGAGAACAUAUUUUU, sec. con núm. de ident.: 99; Secuencia antisentido: AAUAAAUGUUCUCUGGGUG, sec. con núm. de ident.: 100.

Casp2\_4: Secuencia sentido: GCCAGAAUGUGGAACUCCU, sec. con núm. de ident.: 139; Secuencia antisentido: AGGAGUCCACAUUCUGGC, sec. con núm. de ident.: 140.

- 25 Al final del experimento, las ratas se perfundieron a través de una línea permanente femoral con PBS caliente seguido de paraformaldehído al 4%. Los riñones izquierdos se retiraron quirúrgicamente y se almacenaron en 4% de paraformaldehído para el análisis histológico posterior. La insuficiencia renal aguda se define frecuentemente como un aumento agudo de los niveles de creatinina en suero a partir de la línea base. Un aumento de al menos 0,5 mg por dl o 44,2  $\mu$ mol por l de creatinina en suero se considera como una indicación para la insuficiencia renal aguda. La creatinina en suero se midió a tiempo cero antes de la cirugía y a las 24 horas después de la cirugía de la ARF. Las Tablas D1- D3 más abajo demuestran los resultados obtenidos en el modelo ARF en ratas. Como se revela a partir de los resultados, los compuestos RAC 1, TP53BP2 y Casp2 ARNip redujeron los niveles de creatinina después de la ARF inducida por isquemia -reperusión en un modelo experimental en ratas.

- 35 Tabla D1: Tratamiento con Rac1\_2 ARNip (sec. con núms. de ident. : 213 - 214 ) (para propósitos comparativos)

Los valores representan los niveles de creatinina [en mg/dl] antes de (línea base) y 24 horas después de la ARF inducida por isquemia-reperusión en el grupo de placebo (PBS), y en ratas tratadas con RAC1\_2 ARNip, 30 min antes de la lesión isquémica (-30') y en las ratas tratadas con cRAC1\_2 ARNip, 4 horas después de la lesión isquémica (+4 h) .

- 40

Tabla D1:

| Animal   | Niveles de creatinina línea base | Niveles de creatinina con PBS 24h post lesión isquémica | Niveles de creatinina con RAC1_2 ARNip. (- 30') | Niveles de creatinina con RAC1_2 ARNip. (+4h) |
|----------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1        | 0.2                              | 2.4                                                     | 1.4                                             | 1.3                                           |
| 2        | 0.3                              | 2.7                                                     | 1.2                                             | 1.2                                           |
| 3        | 0.3                              | 2.7                                                     | 1.7                                             | 1.1                                           |
| 4        | 0.3                              | 2.2                                                     | 1.8                                             | 1.5                                           |
| 5        | 0.3                              | 2.4                                                     | 1.8                                             | 1.5                                           |
| 6        | 0.3                              | 2.5                                                     | 2.0                                             | 1.6                                           |
| Promedio | 0.3                              | 2.5                                                     | 1.7                                             | 1.4                                           |

Tabla D2 : Tratamiento con TP53BP2\_2 ARNip (sec. con núms. de ident.: 99-100). Los valores representan los niveles de creatinina 24 horas después de la ARF inducida por isquemia-reperusión en el grupo de placebo (PBS), en ratas tratadas con GFP ARNip no relevante 4 horas después de la lesión isquémica (GFP ARNip (+4 h), en ratas tratadas con TP53BP2\_2

- 45

ARNip , 30min antes de la lesión isquémica (ARNip TP53BP2\_2 (-30')) y en ratas tratadas con TP53BP2\_2 ARNip , 4 horas después de la lesión isquémica (TP53BP2\_2 ARNip (+4 h). para propósitos comparativos)

Tabla D2 :

| Animal        | Niveles de creatinina con PBS 24h post lesión isquémica | Niveles de creatinina con GFP ARNip. (+4h) | Niveles de creatinina con TP53BP2_2 ARNip. (-30') | Niveles de creatinina con TP53BP2_2 ARNip. (+4h) |
|---------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1             | 3.5                                                     | 3.10                                       | 2.20                                              | 1.80                                             |
| 2             | 4.10                                                    | 2.80                                       | 2.20                                              | 1.90                                             |
| 3             | 4.20                                                    | 3.20                                       | 2.50                                              | 1.1                                              |
| 4             | 3.30                                                    |                                            | 2.30                                              | 1.40                                             |
| 5             |                                                         |                                            | 2.40                                              |                                                  |
| 6             |                                                         |                                            | 2.20                                              |                                                  |
| Promedio      | 3.78                                                    | 3.03                                       | 2.30                                              | 1.55                                             |
| Desv.estándar | 0.44                                                    | 0.21                                       | 0.13                                              | 0.37                                             |

Tabla D3: Tratamiento con Casp2\_4 ARNip (sec. con núm. de ident.: 139-140). Los valores representan los niveles de creatinina antes de (línea base) y 24 horas después de la ARF inducida por isquemia-reperfusión en el grupo de placebo (PBS), en ratas tratadas con Casp2\_4 ARNip 30min antes de la lesión isquémica (-30') y en ratas tratadas con Casp2\_4 ARNip 4 horas después de la lesión isquémica (+4 h)

Tabla D3 :

| Animal        | Niveles de creatinina línea base | Niveles de creatinina con PBS 24h post lesión isquémica | Niveles de creatinina con Casp2_4 ARNip. (-30') | Niveles de creatinina con Casp2_4 ARNip. (+4h) |
|---------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1             | 0.30                             | 2.40                                                    | 1.10                                            | 1.30                                           |
| 2             | 0.30                             | 3.80                                                    | 1.00                                            | 0.90                                           |
| 3             | 0.10                             | 2.70                                                    | 1.70                                            | 1.40                                           |
| 4             | 0.20                             | 2.40                                                    | 1.90                                            | 1.00                                           |
| 5             | 0.10                             | 3.40                                                    | 0.90                                            | 1.30                                           |
| 6             | 0.20                             | 2.40                                                    | 1.20                                            | 1.10                                           |
| Promedio      | 0.20                             | 2.85                                                    | 1.30                                            | 1.17                                           |
| Desv.estándar | 0.09                             | 0.61                                                    | 0.40                                            | 0.20                                           |

Resultados similares se obtuvieron después de la administración de otros compuestos de ARNip a partir de la Tabla B, particularmente los ARNip dirigidos a genes particulares TP53BP2, LRDD, CYBA, ATF3, CASP2, HRK, CIQBP, BNIP3, MAPK8, MAPK14, RAC1, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, CD38, STEAP4, BMP2, CX43, TYROBP, CTGF, y SPP1.

### EJEMPLO 3 : sistemas modelo de lesión por isquemia / reperfusión después de un trasplante de pulmón en ratas

La prueba de los inhibidores activos de la invención (tal como, ARNip) para tratar o prevenir la lesión por isquemia/reperfusión o lesión hipóxica después de un trasplante de pulmón se realiza en uno o más de los modelos animales experimentales, por ejemplo como se describe por Mizobuchi y otros.,(2004. J. Heart Lung Transplant, 23:889-93); Huang, y otros, (1995. J. Heart Lung Transplant. 14: S49); Matsumura, y otros, (1995. Transplantation 59: 1509-1517); Wilkes, y otros, (1999. Transplantation 67:890-896); Naka, y otros, (1996. Circulation Research,79: 773-783).

El ARNip con CASP2 se prueban en estos modelos animales, que muestran que estos compuestos ARNip tratan y/o previenen la lesión por isquemia -reperfusión después de un trasplante de pulmón y así se pueden usar junto con la cirugía de trasplante.



**EJEMPLO 4. Generación de secuencias de compuestos activos ARNip para los genes pro-apoptóticos y la producción de los ARNip.**

Usando algoritmos registrados y la secuencia conocida de los genes pro-apoptóticos, se generaron las secuencias de muchos ARNip potenciales. Adicionalmente al algoritmo, algunas de las secuencias de oligómeros de 23-mer se generaron por extensión 5' y/o 3' de las secuencias de 19 -mer. Las secuencias que se han generado usando este método son totalmente complementarias a la secuencia de ARNm correspondiente.

Los ARNip se proporcionan para los genes pro-apoptóticos CASP2. Para cada gen existe una lista separada de secuencias de ARNip 19 mer, 21-mer y 23-mer, que se priorizan en función de su puntuación en el algoritmo registrado como las mejores secuencias para dirigir la expresión de genes humanos.

En la Tabla B de la presente 19-mers, 21 -mers y 23-mers se refieren a oligómeros de 19 , 21 y 23 ácidos ribonucleicos de longitud.

TABLA B5: CASP2 19-mers:

500 ARNips numerados 1 a 500

Secuencias de cadenas sentido de los ARNip 1 a 500 son las sec. con núm. de ident. 2071 a 2570 respectivamente;

Secuencias de cadenas antisentido correspondientes de los ARNip 1 a 500 son las sec. con núm. de ident. 2571 a 3070 respectivamente.

TABLA B30: CASP2 21-mers:

500 ARNips numerados 1 a 500

Secuencias de cadenas sentido de los ARNip 1 a 500 son las sec. con núm. de ident. 16953 a 17452 respectivamente;

Secuencias de cadenas antisentido correspondientes de los ARNip 1 a 500 son las sec. con núm. de ident. 17453 a 17952 respectivamente.

TABLA B55: CASP2 23-mers:

1588 ARNips numerados 1 a 1588

Las secuencias de cadena sentidos de los ARNip 1 a 1588 son sec. con núm. de ident. 36651 a 38238 respectivamente;

Secuencias de cadenas antisentido correspondientes de los ARNip 1 a 1588 son sec. con núm. de ident. 38239 a 39826 respectivamente.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto ARN de doble cadena que tiene la estructura:



en donde cada N y N' es un ribonucleótido que puede ser modificado o no modificado en su residuo azúcar;  
 en donde cada uno de (N), y (N')<sub>y</sub> es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N'  
 por un enlace covalente;  
 en donde cada uno de x e y es un entero entre 19 y 40;  
 en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es 1-5 nucleótidos consecutivos  
 unidos covalentemente en el extremo 3' de la cadena en la que está presente, y en donde la secuencia de (N)<sub>x</sub>  
 comprende sec. con núm. de ident.: 140 y la secuencia de (N')<sub>y</sub> comprende sec. con núm. de ident.: 139.

2. Un compuesto ARN de doble cadena que tiene la estructura:

|                           |                                                     |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|
| 5' AGGAGUCCACAUUCUGGC 3'  | (cadena antisentido) (sec. con núm. de ident.: 140) |
| 3' UCCUCAAGGUGUAAGACCG 5' | (cadena sentido) (sec. con núm. de ident.:139)      |

en donde cada A, C, G, y U es un ribonucleótido que puede ser modificado o no modificado en su residuo azúcar; y  
 en donde cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido por un enlace covalente.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde el enlace covalente que une cada ribonucleótido consecutivo es un enlace fosfodiéster.
4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $x = y$  y preferentemente  $x=y= 19$ .
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde al menos un ribonucleótido comprende una modificación en su residuo azúcar.
6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde la modificación comprende una modificación en la posición 2', dicha modificación comprende preferentemente la presencia de un grupo amino, un fluoro, un alcoxi o un alquilo.
7. El compuesto de la reivindicación 6, en donde la modificación comprende la presencia de un grupo alcoxi que es un grupo metoxi (2'-O-metilo).
8. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde alternar los ribonucleótidos en la cadena antisentido y/o la cadena sentido se modifican en sus residuos azúcar.
9. El compuesto de la reivindicación 8, en donde cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de la cadena antisentido está modificado en su residuo azúcar, y cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de la cadena sentido no está modificado en su residuo azúcar.
10. El compuesto de la reivindicación 9, en donde la cadena antisentido y la cadena sentido no están fosforiladas en su terminal 3' y terminal 5' o en donde la cadena antisentido y la cadena sentido son fosforiladas en su terminal 3'.
11. El compuesto de la reivindicación 7, en donde un grupo 2'-O-metilo está presente en el primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, oncenno, decimotercer, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno nucleótido de la cadena antisentido, y en donde un grupo 2'-O-metilo está presente en el segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, duodécimo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo nucleótidos de la cadena sentido.
12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para usar en terapia.

- 14.** Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para usar en el tratamiento de una lesión por isquemia-reperfusión, en donde la lesión por isquemia-reperfusión es insuficiencia renal aguda (ARF).