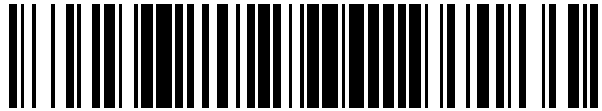


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 997**

21 Número de solicitud: 201531328

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7105** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**18.09.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.08.2017**

Fecha de concesión:

**11.05.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**21.05.2018**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (90.0%)  
Avenida de los Reyes Católicos, 2  
28040 MADRID (Madrid) ES y  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (10.0%)**

72 Inventor/es:

**FRESNO ESCUDERO, Manuel;  
ORTIZ ARDÚAN, Alberto y  
SANCHEZ NIÑO, María Dolores**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **USO DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA LA FABRICACIÓN DE UN  
MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO Y/O LA PREVENCIÓN DEL DAÑO RENAL AGUDO**

57 Resumen:

Uso de una composición farmacéutica que comprende unas secuencias de ARN que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% respecto a las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del daño renal agudo (AKI) mediante la inhibición de MAP3K14. Mediante la inhibición de MAP3K14, se disminuye la inflamación mediante al menos la regulación de la secreción de citoquinas y se preserva la función renal mediante al menos la inhibición de la muerte celular por apoptosis.

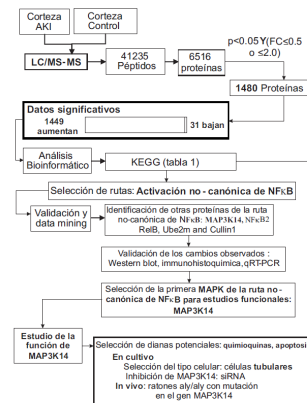


Fig. 1

ES 2 627 997 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

**USO DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA LA FABRICACIÓN DE UN  
MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO Y/O LA PREVENCIÓN DEL DAÑO RENAL  
AGUDO**

5

**DESCRIPCIÓN**

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

10 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del daño renal agudo por compuestos inhibidores de MAP3K14. En concreto, la composición farmacéutica comprende secuencias de ARN de interferencia.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

15

La incidencia del daño renal agudo (también denominado fallo renal agudo, fracaso renal agudo, insuficiencia renal aguda y en inglés acute kidney injury (AKI)) se ha incrementado en los últimos años (Lameire NH, Bagga A, Cruz D, De MJ, Endre Z, Kellum JA, Liu KD, Mehta RL, Pannu N, Van BW, y Vanholder R (2013) Acute kidney injury: an increasing global concern. *Lancet*, 382, 170-179). Sin embargo, actualmente no existe una terapia fiable en la prevención de la progresión hacia el fallo renal agudo o que acelere la recuperación de la función renal (Bellomo R, Kellum JA, and Ronco C (2012) Acute kidney injury. *Lancet*, 380, 756-766; Fliser D, Laville M, Covic A, Fouque D, Vanholder R, Juillard L, y Van BW (2012) A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) clinical practice guidelines on acute kidney injury: part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 27, 4263-4272). Por consiguiente, se necesitan biomarcadores fiables y nuevas aproximaciones terapéuticas (Vanmassenhove J, Vanholder R, Nagler E, y Van BW (2013) Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*, 28, 254-273). El fallo renal agudo se caracteriza por la inflamación del riñón y la muerte de las células tubulares (Akca A, Nguyen Q, y Edelstein CL (2009) Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm*, 2009, 137072; Hotta K, Sho M, Yamato I, Shimada K, Harada H, Akahori T, Nakamura S, Konishi N, Yagita H, Nonomura K, y Nakajima Y (2011) Direct targeting of fibroblast growth factor-inducible 14 protein protects against renal ischemia reperfusion injury. *Kidney Int*, 79, 179-188; Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM, y Morales AI (2011) An

20  
25  
30  
35

integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol*, 41, 803-821; Wen X, Murugan R, Peng Z, y Kellum JA (2010) Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective. *Contrib Nephrol*, 165, 39-45; Xu C, Chang A, Hack BK, Eadon MT, Alper SL, y Cunningham PN (2013) TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. *Kidney Int.*) Sin embargo, dada la complejidad y redundancia del proceso, es poco probable que centrarse en una única molécula inflamatoria aporte la clase de beneficio que sea clínicamente relevante. Así, se ha centrado la atención en vías de señalización superiores que pueden regular la expresión coordinada de un panel o array de moléculas inflamatorias. La proteómica es una herramienta potente a la hora de ampliar el conocimiento de vías de señalización relevantes y factores claves en la enfermedad. La cromatografía líquida/espectrometría de masas LC-MS/MS identificó cerca de 2000 proteínas en el corte renal de modelos murinos (Zhao Y, Denner L, Haidacher SJ, LeJeune WS, y Tilton RG (2008) Comprehensive analysis of the mouse renal cortex using two-dimensional HPLC - tandem mass spectrometry. *Proteome Sci*, 6, 15). Sin embargo, sus aplicaciones para el estudio del daño renal agudo han estado centradas en el análisis de biofluidos como la orina o en el estudio del metaboloma más que en el estudio del proteoma tisular (Beger RD, Holland RD, Sun J, Schnackenberg LK, Moore PC, Dent CL, Devarajan P, y Portilla D (2008) Metabonomics of acute kidney injury in children after cardiac surgery. *Pediatr Nephrol*, 23, 977-984; Liu Y, Yan S, Ji C, Dai W, Hu W, Zhang W, y Mei C (2012) Metabolomic changes and protective effect of (L)-carnitine in rat kidney ischemia/reperfusion injury. *Kidney Blood Press Res*, 35, 373-381; Prasain JK, Arabshahi A, Taub PR, Sweeney S, Moore R, Sharer JD, y Barnes S (2013) Simultaneous quantification of F2-isoprostanes and prostaglandins in human urine by liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 913-914, 161-168; Zgoda-Pols JR, Chowdhury S, Wirth M, Milburn MV, Alexander DC, y Alton KB (2011) Metabolomics analysis reveals elevation of 3-indoxyl sulfate in plasma and brain during chemically-induced acute kidney injury in mice: investigation of nicotinic acid receptor agonists. *Toxicol Appl Pharmacol*, 255, 48-56).

MAP3K14 (del inglés, Mitogen-Activated Protein kinase kinase kinase 14) es también conocida como quinasa inductora de NF- $\kappa$ B o NIK (del inglés, NF- $\kappa$ B Inducing Kinase). Esta quinasa participa en la activación no-canónica de NF- $\kappa$ B. La activación no-canónica de NF- $\kappa$ B conlleva la activación de MAP3K14, el procesado proteosomal de la subunidad p100 de NF $\kappa$ B a p52 y la traslocación nuclear de los complejos p52/RelB (Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, y Ortiz A (2010) NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 21, 1254-1262; Sun SC (2012) The

noncanonical NF-kappaB pathway. *Immunol Rev*, 246, 125-140). Sin embargo, las funciones de MAP3K14 no se limitan a la activación no-canónica de NFκB. MAP3k14, también llamada MAP quinasa quinasa quinasa o MAP3K 14 (del inglés, Mitogen Activated Kinase Kinase Kinase)” es una serina/treonina quinasa con múltiples posibles dianas proteicas a las cuales fosforila. La consecuencia mejor caracterizada de la activación de MAP3K14 es la activación de la vía no canónica del factor de transcripción NFκB. De hecho, MAP3K14 fue descrita como una quinasa que activa NF-kB, y de ahí la denominación alternativa NF-kB-inducing kinase (NIK). No obstante se han descrito otras dianas de MAP3K14, cuya fosforilación explicaría al menos algunas acciones de NIK. Por ejemplo, MAP3K14, a través de la fosforilación del factor de transcripción CREB causa hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en la obesidad al aumentar la acción del glucagón ((Shen et al. *Nat Med*. 2012 Jun;18(6):943-9). En otro ejemplo, MAP3K14 aumentó la expresión de la proteína ARC/NOL3, proteína represora de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas o también llamada proteína nucleolar 3 (del inglés, Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain o Nucleolar Protein 3) (Mack et al. *Br J Haematol*. 2014 Nov;167(3):376-84). En este sentido es altamente probable que desconozcamos otras dianas de MAP3K14

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se han realizado experimentos, en concreto, experimentos de proteómica, bioinformática, western blot e inmunohistoquímica, que han permitido demostrar que existe una activación de MAP3K14 en un modelo experimental celular de daño renal agudo. Estos experimentos también han demostrado que existe una regulación positiva de varias proteínas de la activación no-canónica de NFκB.

La deficiencia in vivo de la actividad de MAP3K14 protege frente al daño renal agudo, disminuye la inflamación y preserva la función renal.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende unas secuencias de ARN que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% respecto a las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del daño renal agudo (AKI) mediante la inhibición de MAP3K14.

El primer aspecto de la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende unas secuencias de ARN que tienen una identidad de secuencia de al menos un

80% respecto a las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 para su uso en el tratamiento y/o la prevención del daño renal agudo (AKI) mediante la inhibición de MAP3K14.

5 El primer aspecto de la invención también se refiere a un método de tratamiento y/o de prevención del daño renal agudo (AKI) mediante la inhibición de MAP3K14 que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende unas secuencias de ARN que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% respecto a las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

10

El primer aspecto de la invención se refiere el tratamiento y/o la prevención del daño renal agudo mediante la inhibición de MAP3K14 en humanos.

15 En el primer aspecto de la invención, las secuencias de ARN son secuencias "siRNA", término conocido en el estado de la técnica, que proviene del término "*small interfering RNA*" y hace referencia a un ARN pequeño de interferencia.

20 En la presente solicitud, el porcentaje de "identidad" en una secuencia se calcula comparando las secuencias y obteniendo la proporción de nucleótidos idénticos entre estas secuencias que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los algoritmos de comparación de secuencias FASTA, NCBI BLAST, WU-BLAST, GGSEARCH y GLSEARCH.

25 Las secuencias de ARN con una identidad de al menos un 80% respecto a las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 tendrán las mismas propiedades que las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

30 La identidad de secuencia puede ser de al menos un 80, 82, 84, 86, 88, 90, 82, 94, 95, 96 o 98 % de identidad.

30

En una realización del primer aspecto de la invención, la identidad de secuencia es de al menos un 90%.

35 En otra realización del primer aspecto de la invención, la identidad de secuencia es de al menos un 95%.

En otra realización del primer aspecto de la invención, la identidad es del 100 % y las secuencias de ARN son las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

- 5 En la presente solicitud, el término “inhibición” se refiere a reducir, disminuir, bloquear o incluso eliminar, como por ejemplo “inhibir la actividad de MAP3K14”, por ejemplo, inhibir la producción de MAP3K14.

10 En una realización del primer aspecto de la invención, mediante la inhibición de MAP3K14, se disminuye la inflamación mediante al menos la regulación de la secreción de citoquinas y se preserva la función renal mediante al menos la inhibición de la muerte celular por apoptosis.

15 En una realización del primer aspecto de la invención, la composición farmacéutica consiste en las secuencias de ARN que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80%, un 90% o un 95% respecto a las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

20 En otra realización del primer aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término “excipientes” hace referencia a compuestos que estabilizan y favorecen la absorción de los principios activos, colorantes, endulzantes, saborizantes, protectores frente al aire y/o humedad, aglutinantes, etc.

25 La composición farmacéutica puede ser formulada con excipientes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro tipo de portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con técnicas convencionales en la práctica farmacéutica.

30 La composición farmacéutica puede ser administrada por si sola o en combinación con otros principios activos.

La composición farmacéutica puede ser administrada en dosis simples o múltiples.

35 La composición farmacéutica del primer aspecto de la invención puede ser administrada por cualquier vía de administración (por ejemplo, oral, sublingual, perioral, parenteral,

intraperitoneal, intramuscular, intranasal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, subcutánea, tópica, etc.) para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida.

- 5 La composición farmacéutica puede ser formulada para proporcionar la liberación controlada del ingrediente activo como por ejemplo liberación sostenida o prolongada de acuerdo con métodos que son bien conocidos en la técnica.

#### TEXTO LIBRE DE LA LISTA DE SECUENCIAS

10

A continuación se aporta una traducción del texto libre en inglés que aparece en la lista de secuencias.

SEQ ID NO: 1. ARN pequeño de interferencia 1 para MAP3K14

15 SEQ ID NO: 2. ARN pequeño de interferencia 2 para MAP3K14

SEQ ID NO: 3. ARN pequeño de interferencia 3 para MAP3K14

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 **Figura 1. Aproximaciones proteómicas y bioinformáticas.** La proteómica de LC/MS-MS del cortex renal de 6 muestras de daño renal agudo (**AKI**) o 6 muestras control identificó 41235 péptidos que pertenecían a 6516 proteínas exclusivas, de las cuales 1480 estaban expresadas de manera diferencial. Un análisis informático de este conjunto de datos identificó diversos procesos y funciones proteicas enriquecidas en proteínas
- 25 sobreexpresadas en el daño renal agudo. La activación de NFκB fue encontrada en la intersección o cruce de diversos de estos procesos incluyendo MAPK, proteólisis mediada por ubiquitinación, citoquinas, NFκB y apoptosis. Desde que la activación canónica de NFκB en daño renal ha sido estudiada en profundidad, se ha centrado el análisis en la activación no-canónica de NFκB y se han validado cambios en la expresión de los componentes de las
- 30 vías de señalización identificadas por proteómica. Para estudios funcionales se han usado células diana clave en el daño renal agudo, las células tubulares, para explorar la función de MAP3K14 en procesos conocidos por su implicación en la patogénesis del fallo renal agudo y que fueron identificados como sobrerrepresentados en la proteómica de muestras de daño renal agudo de la base de datos KEGG, como son las citoquinas y la apoptosis. Los
- 35 hallazgos se comprobaron in vivo en un modelo de fracaso renal agudo.

**Figura 2. Mapa de la vía de señalización de NFκB y ubiquitinación.** El mapa muestra la integración generada por la base de datos de KEGG de la vía de señalización de NFκB y la ubiquitinación del proteasoma. TWEAK, un conocido activador de la vía de señalización no-canónica de NFκB fue añadido manualmente. La activación no-canónica de NFκB se obtiene por un limitado set de ligandos extracelulares y requiere la activación de MAP3K14. MAP3K14 induce la fosforilación de NFκB2 p100 mediada por IκB kinase-α (IKK-α). Entonces NFκB2 p100 es ubiquitinado y procesado por el proteasoma para activar NFκB2 p52. Los heterodímeros de NFκB2 p52/RelB migran al núcleo a continuación para regular la transcripción. Rojo: sobreexpresión >2, Naranja: sobreexpresión >1 and <2 (p<0.05), Gris: identificado en la muestra, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

**Figuras 3A, 3B, 3C. Expresión incrementada en riñón de ARN mensajeros y proteínas de MAP3K14, RelB y NFκB2 en daño renal agudo (AKI) experimental por sobredosis de ácido fólico.** **Figura 3A)** Niveles ARNm (ARN mensajero) de MAP3K14 \*p<0.009 vs control. **Figura 3B)** Niveles proteicos de MAP3K14 \*p<0.005 vs control. **Figura 3C)** Inmunohistoquímica de MAP3K14. La expresión incrementada MAP3K14 se localizó en las células tubulares en muestras de daño renal agudo de ratones silvestres.

**Figuras 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F. Expresión incrementada de RelB y NFκB2 en riñón y evidencia de la activación no –canónica de NFκB en daño renal agudo (AKI) experimental por sobredosis de ácido fólico.** Los niveles de ARNm fueron determinados por RT-PCR cuantitativa (A;C) y los niveles proteicos por Western blot (B;D;E). **Figura 4A)** Niveles de ARNm de MAP3K14 \*p<0.009 vs control. **Figura 4B)** Niveles proteicos de MAP3K14 \*p<0.005 vs control. **Figura 4C)** Niveles de ARNm de RelB \*p<0.009 vs control. **Figura 4D)** Niveles proteicos de RelB \*p<0.03 vs control. **Figura 4E)** Cuantificación proteica de NFκB2 p100 y p52, \*p<0.03 y \*\*p<0.05 vs control. NFκB2 p100 es procesado a NFκB p52 por el proteasoma. N= 6 animales por grupo. **Figura 4F)** Actividad nuclear de NFκB2 p52 y RelB en su unión al ADN en daño renal experimental. Se usó un ELISA de unión a ADN para cuantificar la actividad de unión a ADN de NFκB2 p52 y RelB en núcleos obtenidos de riñones a las 24h de la inducción de daño renal agudo o la administración del vehículo control.

**Figura 5. Inmunohistoquímica renal en riñón humano control y con daño renal agudo (AKI).** Nótese aumento de expresión de MAP3K14 en el fracaso renal agudo

35

**Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6E, 6F, 6G, 6H. Ratones deficientes en MAP3K14 son resistentes a la inducción experimental de daño renal agudo (AKI). Figura 6A)** Creatinina sérica. \* $p < 0.015$  vs ratones heterocigóticos. **Figura 6B)** Urea sérica. \* $p < 0.0001$  vs ratones heterocigóticos. C) NF $\kappa$ B2 p100 y p52 Western blot y **Figura 6D)** mARN. \* $p < 0.004$  vs control inyectado con vehículo, \*\* $p < 0.01$  vs ratones heterocigóticos para daño renal agudo. **Figura 6E)** Disminución de niveles de mARN de MCP-1 de riñón. **Figura 6F)** Expresión de RANTES y **Figura 6G)** CXCL10 en ratones deficientes para MAP3K14 con daño renal agudo comparado con ratones heterocigóticos. \* $p < 0.0001$  vs ratones heterocigóticos con daño renal agudo. **Figura 6H)** Expresión de ARNm de CCL21. Media  $\pm$ SD de 6 ratones por grupo.

**Figuras 7A, 7B. Ratones deficientes para MAP3K14 están protegidos de la activación tubular no-canónica de NF $\kappa$ B en el daño renal agudo (AKI).** Inmunohistoquímica de **Figura 7A)** RelB y **Figura 7B)** NF $\kappa$ B2 p100/52. La proteína nuclear p52 se observa en los túbulos renales de ratones heterocigóticos para daño renal agudo (flechas) mientras que no se observa tinción nuclear de dicha proteína en ratones deficientes para MAP3K14 con daño renal agudo. La Inmunohistoquímica no discrimina entre NF $\kappa$ B2 p100 y NF $\kappa$ B2 p52. Sin embargo, el Western blot mostrado en la figura 6.C muestra la presencia de la proteína activa de NF $\kappa$ B2, p52, en el fracaso renal agudo de ratones heterocigotos. Imágenes representativas de 6 animales por grupo. Aumento original x40. Detalle x1000. \* $p < 0.02$  vs control.

**Figuras 8A, 8B. Ratones deficientes para MAP3K14 están protegidos de la inflamación y de la muerte de células tubulares en el daño renal agudo (AKI). Figura 8A)** Inmunohistoquímica del antígeno F4/80. La infiltración de macrófagos es menor en ratones deficientes para MAP3K14. Aumento original x400. Detalle x1000. Imágenes representativas de 6 animales por grupo.\*  $p < 0.05$ . **Figura 8B)** El análisis de la técnica de TUNEL para ADN fragmentado, característico de la apoptosis, fue menor en ratones deficientes para MAP3K14 con daño renal agudo comparados con ratones heterocigotos control. Aumento original x20. Detalle X60. .\*  $p < 0.05$ .

**Figuras 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F. Caracterización funcional de las acciones de MAP3K14 en células proximales tubulares cultivadas: Expresión de CXCL10. Figura 9A)** El silenciamiento de MAP3K14 mediado por siRNA en células tubulares proximales suprime la

expresión de la proteína MAP3K14. Western blot representativo. **Figura 9B)** El silenciamiento de MAP3K14 mediado por siRNA en células tubulares proximales suprime la expresión de ARNm de MAP3K14. **Figura 9C)** El silenciamiento de MAP3K14 mediado por siRNA previene el incremento en los niveles de ARNm de CXCL10 inducidos a las 24h por el estimulador de la vía de señalización no-canónica de NFκB, TWEAK (100 ng/ml). qRT-PCR. \*p<0.005 vs control, \*\*p<0.005 vs TWEAK y aleatorio. **Figura 9D)** El silenciamiento de MAP3K14 mediado por siRNA previene el incremento en el sobrenadante de las células en cultivo de la citoquina CXCL10 inducida por exposición durante 24h a 100 ng/ml TWEAK (ELISA) \*p<0.001 vs control, \*\*p<0.01 vs TWEAK y aleatorio. **Figura 9E)** El silenciamiento de MAP3K14 mediado por siRNA previene el incremento en los niveles de ARNm de MCP1 inducidos por TWEAK. qRT-PCR. \*p<0.0001 vs control. **Figura 9F)** El silenciamiento de MAP3K14 mediado por siRNA previene el incremento de los niveles de ARNm de RANTES inducido por TWEAK. qRT-PCR. \*p<0.002 vs aleatorio, \*\*p<0.003 vs TWEAK y aleatorio. Las células fueron tratadas con siRNA aleatorio o siRNA contra MAP3K14 previamente a la adición de 100 ng/ml TWEAK durante 24h. Media ±SD de 3 experimentos independientes.

**Figura 10. Caracterización funcional de acciones de MAP3K14 en células proximales tubulares cultivadas: regulación de los niveles de ARNm de MCP1 a tiempos cortos.** Células tratadas con siRNA aleatorio o siRNA contra MAP3K14 antes de la adición de 100 ng/ml TWEAK por 3h. \*p<0.0001 vs aleatorio, \*\*p<0.007 vs MAP3K14 siRNA solo.

**Figuras 11A, 11B. Caracterización funcional de las acciones de MAP3K14 en células proximales tubulares cultivadas: muerte celular. Figura 11A)** El silenciamiento de MAP3K14 mediado por siRNA disminuye la apoptosis espontánea inducida por la privación de suero en las células tubulares. Diagramas representativos de contenido de ADN celular obtenidos por citometría de flujo. Las células hipodiploides consistentes con la apoptosis se indican con una barra horizontal **Figura 11B)** Cuantificación de células apoptóticas. \*p<0.05 vs control.

#### MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

**El análisis proteómico bioinformático de tejidos de riñón identifica una sobreexpresión de MAP3K14 y de los componentes de la vía no-canónica de NFκB en el daño renal agudo**

El daño renal agudo se caracteriza por un incremento en la creatina sérica ( $0.53 \pm 0.25$  vs  $0.1 \pm 0.0$  mg/dl a las 24h,  $p < 0.05$ ), muerte de células tubulares e inflamación intersticial (Husi *et al.*, 2013). Como se ha descrito previamente, se realizó la proteómica con análisis focal de

5 datos en muestras de cortes de riñón control y de daño renal agudo a las 24h para investigar vías de señalización potenciales implicadas en daño renal agudo (Husi H, Sanchez-Nino MD, Delles C, Mullen W, Vlahou A, Ortiz A, y Mischak H (2013) A combinatorial approach of Proteomics and Systems Biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI):

10 involvement of NMDA receptor GRIN1 in murine AKI. *BMC Syst Biol*, 7, 110). El análisis por LC-MS/MS identificó 41235 péptidos en los cortes de riñón que se correspondían con 6516 proteínas únicas, no redundantes (**Figura 1**) (Husi H, Sanchez-Nino MD, Delles C, Mullen W, Vlahou A, Ortiz A, y Mischak H (2013) A combinatorial approach of Proteomics and Systems Biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI): involvement of

15 NMDA receptor GRIN1 in murine AKI. *BMC Syst Biol*, 7, 110). El presente estudio representa un nuevo análisis complementario de este conjunto de datos generado previamente. El análisis de la vía de señalización por la base de datos de KEGG identificó el enriquecimiento de diversas vías de señalización basadas en la sobreexpresión de proteínas clave en las muestras de daño renal agudo (Tabla 1). NF $\kappa$ B estaba en la intersección de

20 diversas de estas vías de señalización. La activación de NF $\kappa$ B está regulada por MAPK, requiere la ubiquitinación y procesado o degradación proteosomal, y regula la apoptosis y la secreción de citoquinas. Una aproximación dirigida de Data Mining buscó componentes de la vía de señalización no-canónica de NF $\kappa$ B. Un mapa de la vía de señalización de NF $\kappa$ B generada por la base de datos KEGG (**Figura 2**) resume la expresión de la vía de

25 señalización no-canónica de NF $\kappa$ B y de la ubiquitinación y activación proteosomal de NF $\kappa$ B2 (p100/p52). Se observó la sobreexpresión de MAP3K14, la quinasa apical activadora de la vía de señalización de NF $\kappa$ B (Razani B, Reichardt AD, y Cheng G (2011) Non-canonical NF-kappaB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immunol Rev*, 244, 44-54; Thu YM y Richmond A (2010) NF-kappaB inducing kinase: a key regulator in the

30 immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 213-226), la sobreexpresión de proteínas para la ubiquitinación de NF $\kappa$ B2 p100 y procesado proteosómico para la activación de NF $\kappa$ B2 p52, como Ube2m/Ubc12 (E2) y cullin-1 (E3), y la sobreexpresión de los dos principales componentes de los heterodímeros de NF $\kappa$ B no canónicos implicados en la unión a ADN, NF $\kappa$ B2 y RelB (**Tabla 2**).

Tabla 1. Vías de señalización moduladas en muestras de daño renal agudo identificadas por análisis de vías de señalización usando la base de datos de búsqueda de KEGG. La activación de NF $\kappa$ B está en la intersección de las vías de señalización marcadas en negrita.

Mapa KEGG	Número de dianas	Nombre
mmu04151	46	Vía de señalización PI3k-Akt
mmu04010	29	<b>Vía de señalización MAPK</b>
mmu04910	27	Vía de señalización de la Insulina
mmu04020	22	Vía de señalización del Calcio
mmu04120	21	<b>Proteólisis mediada por ubiquitinación</b>
mmu04062	19	<b>Vía de señalización de citoquinas</b>
mmu04310	17	Vía de señalización Wnt
mmu04630	16	Vía de señalización Jak-STAT
mmu04660	15	Vía de señalización receptores de células T
mmu03320	13	Vía de señalización PPAR
mmu04064	13	<b>Vía de señalización NF<math>\kappa</math>B</b>
mmu04370	11	Vía de señalización VEGF
mmu04912	11	Vía de señalización GmRH
mmu04210	11	<b>Apoptosis</b>
mmu04722	10	Vía de señalización Neurotrofina

Tabla 2. Vía de señalización no-canónica de NF $\kappa$ B y proteínas de ubiquitinación y degradación proteasomal moduladas en daño renal agudo. Los datos representan análisis no sesgado seguido de Data Mining del conjunto de datos significativos.

Nombre	Gen	Cambio en la estructura proteica	Valor p
<b>Vía de señalización no-canónica de NF<math>\kappa</math>B</b>			
Nuclear factor NF $\kappa$ B p100 subunit	Nfkb2	1.46	0.03
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 (NIK)	Map3K14	1000	0.05
Transcription factor RelB	RelB	3.33	0.01
<b>Sistema de ubiquitinación</b>			
Cullin-1	Cull	1000	0.02
NEDD8-xonjugating enzyme Ubc12	Ube2m	3.01	0.01

### **Validación de la activación de la vía de señalización no-canónica de NFκB en daño renal agudo**

5 Los hallazgos proteómicos del incremento en los niveles de MAP3K14, RelB y NFκB2 p100/p52 fueron validados por Western blot e inmunohistoquímica y el mecanismo por el cual este sistema está sobrepresado fue explorado por la evaluación de los niveles de expresión de ARNm. La expresión de ARNm en riñón de MAP3K14, RelB y NFκB2 se incrementó en daño renal agudo, sugiriendo su incremento a nivel transcripcional (**Figuras**  
 10 **3A, 4A, 4C**). El análisis por Western blot confirmó el incremento en riñón de MAP3K14, RelB, NFκB2 p100 y NFκB2 p52 en daño renal agudo (**Figuras 3B, 4B, 4D, 4E**). El análisis por inmunohistoquímica localizó la expresión incrementada de MAP3K14 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células tubulares (**Figura 3C**). Además, se incrementó la actividad de unión a ADN de NFκB2 p52 y RelB en extractos nucleares de riñones con  
 15 daño renal agudo (**Figura 4F**). Por consiguiente, la evidencia del incremento de la activación de MAP3K14 incluye el procesado de NFκB2 p100 a NFκB2 p52 y la traslocación nuclear e incremento en la actividad de unión a ADN del factor de transcripción RelB/NFκB2 p52. El aumento de expresión de MAP3K14 en células tubulares durante el fracaso renal agudo también se observó en el ser humano (**Figura 5**).

20

### **Ratones deficientes para MAP3K14 están protegidos contra el daño renal agudo**

Para confirmar si MAP3K14 juega un papel en el fallo renal agudo, se exploró el efecto de la deficiencia de MAP3K14 en el daño renal agudo experimental. Los ratones Alinfoplasia  
 25 (MAP3K14<sup>aly/aly</sup>), deficientes en MAP3K14 presentan una mutación puntual que causa una sustitución de un aminoácido en el dominio de interacción del extremo carboxi-terminal de MAP3K14.

Los ratones deficientes MAP3K14 están protegidos contra daño renal agudo y ambas  
 30 creatinina sérica y urea presentan en ellos valores más bajos que en ratones heterocigotos control MAP3K14<sup>+/aly</sup> (**Figuras 6A, 6B**). Los riñones de ratones deficientes MAP3K14 presentaban una expresión menor de los niveles proteicos y de ARNm de NFκB2 p100/52 (**Figuras 6C, 6D**).

La expresión total de ARNm de MCP-1 (**Figura 6E**), RANTES (**Figura 6F**) y CXCL10 (**Figura 6G**) se incrementó en ratones heterocigóticos con daño renal agudo y esta expresión fue significativamente menor en ratones deficientes MAP3K14. Los cambios en la expresión de los niveles de ARNm de CCL21a fueron más leves pero siguieron la misma  
 5 tendencia (**Figura 6H**).

La inmunohistoquímica confirmó la ausencia expresión nuclear de RelB (**Fig. 7A**) y NFκB2 p52 en ratones deficientes MAP3K14 con daño renal agudo (**Fig. 7B**), así como la menor infiltración por macrófagos (**Fig. 8A**) y de célula tubulares muertas teñidas con TUNEL (**Fig. 8B**) en ratones deficientes MAP3K14 que en ratones heterocigotos.  
 10

### **Función de MAP3K14 en células tubulares**

Siguiendo los descubrimientos de la sobreexpresión de MAP3K14 y la evidencia de la activación de MAP3K14 (procesado de NFκB2 p100 a p52) en células tubulares in vivo, se exploró la función de MAP3K14 en células epiteliales tubulares murinas cultivadas mediante el silenciamiento por siRNA usando una mezcla de 3 siRNAs (siRNA identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1, siRNA identificado por la secuencia SEQ ID NO: 2 and siRNA identificado por la secuencia SEQ ID NO: 3) (**Figuras 9A, 9B**). Como el análisis de la vía de señalización de la base de datos KEGG identificó la señalización de citoquinas y apoptosis como vías de señalización incrementadas, se exploró las funciones potenciales de MAP3K14 en la regulación de la secreción de citoquinas y muerte celular. Para ello, se hizo uso de TWEAK, la única citoquina caracterizada hasta la fecha que activa la vía de señalización no-canónica de NFκB en células tubulares (Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J, y Ortiz A (2010a) TWEAK activates the non-canonical NFκB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21. *PLoS One*, 5, e8955).  
 15  
 20  
 25

Como citoquinas representativas, se eligieron las dianas canónicas y no canónicas de NFκB así como CXCL10, cuya expresión fue recientemente relacionada con los polimorfismos de MAP3K14 en células linfoblastoides humanas pero que nunca antes había sido previamente relacionado con MAP3K14 (Thair SA, Walley KR, Nakada TA, McConechy MK, Boyd JH, Wellman H, y Russell JA (2011) A single nucleotide polymorphism in NF-kappaB inducing kinase is associated with mortality in septic shock. *J Immunol*, 186, 2321-2328). El silenciamiento de MAP3K14 por siRNAs específicos previno la sobreexpresión inducida por TWEAK de mRNA de CXCL10 (**Figura 9C**) y de los niveles proteicos de CXCL10 (**Figura**  
 30  
 35

**9D)** así como de dianas canónicas de NFκB MCP1 y RANTES (Sanz AB, Justo P, Sanchez-Nino MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M, Jakubowski A, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, y Ortiz A (2008) The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 19, 695-703) (**Figuras 9E, 9F, Figura 10**).

5

La privación de factores de supervivencia del suero es un inductor clásico de apoptosis (Sanchez-Nino *et al.*, 2010). El silenciamiento de MAP3K14 disminuye la apoptosis en cultivos de células tubulares en ausencia de factores de supervivencia (**Figuras 11A, 11B**). En conjunto estos resultados indican un papel de MAP3K14 en la regulación de la muerte celular.

10

## **Materiales y métodos utilizados en los ejemplos**

### **Modelo animal**

15

Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. La nefropatía por sobredosis de ácido fólico es un modelo clásico de fracaso renal agudo que comparte varias características con el fracaso renal agudo humano, incluyendo la muerte celular tubular, la proliferación celular tubular compensatoria, la activación de una respuesta inflamatoria y la eventual progresión a fibrosis leve (Doi K, Okamoto K, Negishi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Toda A, Yokomizo T, Kita Y, Kihara Y, Ishii S, Shimizu T, y Noiri E (2006) Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *Am J Pathol*, 168, 1413-1424; Ortega A, Ramila D, Ardura JA, Esteban V, Ruiz-Ortega M, Barat A, Gazapo R, Bosch RJ, y Esbrit P (2006) Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1594-1603; Sanz AB, Justo P, Sanchez-Nino MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M, Jakubowski A, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, y Ortiz A (2008) The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 19, 695-703). De hecho, la nefropatía por sobredosis de ácido fólico ha sido reportada en los seres humanos (Metz-Kurschel U, Kurschel E, Wagner K, Aulbert E, Graben N, y Philipp T (1990) Folate nephropathy occurring during cytotoxic chemotherapy with high-dose folinic acid and 5-fluorouracil. *Ren Fail*, 12, 93-97). Ratones hembra de la cepa C57 / BL6 (12 a 14 semanas de edad) criados en las instalaciones del IIS-Fundación Jiménez Díaz recibieron una sola inyección intraperitoneal de ácido fólico (Sigma) a una concentración de 250 mg/kg disuelto en 0,3 mol/L de bicarbonato de sodio o vehículo y se sacrificaron 24h o 72h después de la inyección (n = 6 por grupo). Los riñones

35

fueron perfundidos in situ con una solución salina fría. La mitad del riñón y de cada ratón se fijó en formalina tamponada, se embebió en parafina y se utilizó para inmunohistoquímica. La otra mitad del riñón fue instantáneamente congelada en nitrógeno líquido para estudios de ARN y proteínas. La corteza de un riñón obtenido 24 horas después de la inyección de ácido fólico o vehículo se separó cuidadosamente y se congeló para el análisis proteómico.

Los ratones deficientes en MAP3K14 (ratones aly/aly) fueron amablemente donados por Manuel Fresno, CBMSO (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa), Madrid, España, y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos.

10

### **Preparación de la muestra y el análisis de espectrometría de masas**

Las muestras de tejido se pesaron y se extrajeron por el método descrito previamente (Husi H, Sanchez-Nino MD, Delles C, Mullen W, Vlahou A, Ortiz A, y Mischak H (2013) A combinatorial approach of Proteomics and Systems Biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI): involvement of NMDA receptor GRIN1 in murine AKI. *BMC Syst Biol*, 7, 110). Las muestras de tejido se homogeneizaron en tampón SDS-lisis (01:10 muestra para amortiguar ratio) (0,1 M Tris-HCl pH 7,6 suplementado con 4% de SDS y 0,1 M DTT) usando un Ultra-Turrax T 25 (IKA, Staufen, Alemania), se incubaron a 95 °C durante 3 minutos y se clarificaron por centrifugación a 16.000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Una alícuota del sobrenadante fue tomada y colocada en un dispositivo de filtro Micron YM-30 (Millipore, Watford Reino Unido). Se añadió al extracto de proteína 8 M de tampón de urea (UA) y después se centrifugó a 14.000 g durante 15 minutos. A continuación, el extracto de proteína se mezcló suavemente durante 1 minuto con 0,05 M tampón de yodoacetamida (IAA) y se incubó durante otros 20 minutos antes de la centrifugación. Se añadió de nuevo búfer UA y se centrifugó (dos veces). Se añadió tampón de bicarbonato de amonio (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8) (ABC) y se centrifugó (dos veces) antes de incubar durante toda la noche con tripsina. El homogeneizado se centrifugó y se lavó con tampón de ABC antes de la acidificación con ácido fórmico al 10%. Los volúmenes de muestra se ajustaron para que coincida con la concentración final de proteína antes del análisis por LC-MS / MS.

Los extractos de tejido se separaron en un sistema de flujo RSLS nano Dionex último 3000 (Dionex, Camberly Reino Unido). Una muestra se cargó en 0,1% de ácido fórmico y acetonitrilo (98: 2) sobre un Dionex 100 micras x 2 cm, columna C18 trampa nano 5 micras, con una velocidad de flujo de 5µl / min. La elución se realizó en una columna nano Acclaim PepMap C18 75 micras x 50 cm, 2 m, 100 A con un gradiente lineal de disolvente A, ácido

35

fórmico al 0,1% y acetonitrilo (98: 2) en contra de disolvente B, ácido fórmico al 0,1% y acetonitrilo (20:80) a partir de 1% de B durante 5 minutos llegando a 30% en 400 minutos y luego a 50% de B en 480 minutos. La muestra se ioniza en el modo de ion positivo usando un spray Proxeon nano fuente ESI (Thermo Fisher, Hemel, UK) y se analizó en un Velos FTMS Orbitrap (Thermo Finnigan, Bremen, Alemania). La espectrometría de masas (MS) fue operada en un modo dependiente de los datos (top 40) para cambiar entre MS y MS / MS adquisición y los iones padres fueron fragmentados por disociación inducida por colisión (CID). Con los archivos de datos se realizaron búsquedas en contra de una base de datos de ratón no redundante utilizando el programa de análisis SEQUEST (<http://fields.scripps.edu/sequest/>) con la enzima especificada como la tripsina. Se fijó una modificación de carbamidometilación y se seleccionaron la oxidación de metionina y prolina como modificaciones variables. En SEQUEST, sólo se pasan péptidos que mostraron desviación masa de menos de 10 ppm, los datos de péptidos se extrajeron mediante péptidos de alta confianza. Se realizó un análisis de p-valor estadístico usando la prueba de Wilcoxon Mann Whitney.

### **Análisis Bioinformático**

Se ha descrito anteriormente la identificación de proteínas y datos significativos de 1480 entradas con valores de  $p < 0,05$  y cambios de  $> 2$  (Husi H, Sanchez-Nino MD, Delles C, Mullen W, Vlahou A, Ortiz A, y Mischak H (2013) A combinatorial approach of Proteomics and Systems Biology in unravelling the mechanisms of acute kidney injury (AKI): involvement of NMDA receptor GRIN1 in murine AKI. *BMC Syst Biol*, 7, 110). Este conjunto de datos se utilizó para análisis de datos metabólicos y de vías de señalización utilizando la web de recursos KEGG ([www.genome.jp/kegg-bin/](http://www.genome.jp/kegg-bin/)) o con PathVisio ([www.pathvisio.org](http://www.pathvisio.org)). A continuación, la minería de datos enfocada se amplificó a todas las moléculas con un  $p\text{-value} \leq 0.05$ .

### **Células y reactivos**

La línea MCT es una línea de células epiteliales tubulares proximales originadas de la corteza renal de ratones SJL y se han caracterizado ampliamente (Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA, y Neilson EG (1988) Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol*, 107, 1359-1368). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, BioWhittaker) de complementado, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

**Western blot**

Muestras de tejidos y células se homogeneizaron en tampón de lisis (Sanchez-Nino MD, Poveda J, Sanz AB, Mezzano S, Carrasco S, Fernandez-Fernandez B, Burkly LC, Nair V, Kretzler M, Hodgins JB, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J, y Ortiz A (2013) Fn14 in podocytes and proteinuric kidney disease. *Biochim Biophys Acta*, 1832, 2232-2243), a continuación, fueron separadas en 10% o 12% SDS-PAGE en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.), se bloquearon con 5% de leche desnatada en PBS / 0,5% v / v de Tween 20 durante 1 h, y se lavó con PBS / Tween. Anticuerpos primarios fueron policlona anti-p100 / 52 (1: 500, Señalización Celular, Danvers, MA), anti-RelB (1: 500, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-MAP3K14 (1:1000, Señalización Celular), anti-Ciclina D1 (1: 1000, Cell Signaling). Los anticuerpos se diluyeron en 5% de leche en PBS / Tween. Las transferencias se lavaron con PBS / Tween y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa (1: 2000, GE Healthcare / Amersham, Aylesbury, Reino Unido). Después del lavado, los blots fueron revelados con el método de quimioluminiscencia (ECL). Las transferencias fueron luego re-probaron con anti- $\alpha$  tubulina (1: 2000, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y los niveles de expresión se corrigieron por pequeñas diferencias en la carga.

**Reacción inversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

El ARN se aisló por el método del Trizol (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y 1  $\mu$ gr se transcribió de forma inversa con el kit High Capacity ADNc Archive. Se realizó una PCR en tiempo real en un sistema ABI Prism 7500 PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el método DeltaDelta Ct (Sánchez-Nino et al., 2012a). Los niveles de expresión se dan como relaciones a GAPDH. Las sondas fueron compradas en Applied Biosystems, Foster City, CA.

**Inmunohistoquímica**

Se realizaron secciones de 5  $\mu$ m de tejido incluido en parafina y se montaron sobre portaobjetos pretratados con APES al 2% en acetona. Una vez desparafinadas y rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol, las secciones se incubaron 30 minutos en 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:metanol (1:1) para bloquear la peroxidasa endógena. Tras lavar con PBS se incubaron 1 hora en 6% de suero del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario y 4% de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS. A continuación se incubó durante 18 horas a 4°C con el anticuerpo primario disuelto en 1% suero, 4% BSA en PBS. Los anticuerpos primarios fueron: policlona de conejo anti-RelB (1:50, Santa Cruz, CA,

EE.UU), anti- NF $\kappa$ B2 p100/p52 (1:20, Santa Cruz, CA, EE.UU), anti-MAP3K14 (1:100, R&D System), policlonal de rata anti-F4/80 (1:50; Serotec, Oxford, Reino Unido) y anti-Cullin-1 (1:80, Santa Cruz, CA, EE.UU). Tras la incubación con el anticuerpo primario se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con biotina o con peroxidasa (1/200, Amersham) disuelto en 4% BSA-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con biotina se trataron con el complejo ABC-HRPO (DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos a 37 °C. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno DAB (Dako): 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (130:1) durante 5 minutos. Por último, se aplicó a las secciones una tinción de fondo con hematoxilina de Carazzi (Bio-Optica, Milán, Italia), se deshidrataron y montaron en DPX (BDH, Poole, Inglaterra). Los controles negativos incluyeron la incubación con una inmunoglobulina no específica del mismo isotipo que el anticuerpo primario.

La apoptosis fue ensayada por dUTP mediada por desoxinucleotidil-transferasa etiquetado nick-terminal (TUNEL) (In Situ Cell Death Kit de detección; Roche) según las instrucciones del fabricante.

### **Transfección con pequeños ARN de interferencia (siRNA, del inglés small interference RNA)**

Las células se cultivaron en placas de seis pocillos (Costar, Cambridge, MA) y se transfectaron con una mezcla de 20 nmol / mL MAP3K14 siRNA (Santa Cruz, CA, EE.UU.), Opti-MEM I y Lipofectamina 2000 (Invitrogen) (Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Sanchez-Lopez E, Ruiz-Ortega M, Benito-Martin A, Saleem MA, Mathieson PW, Mezzano S, Egido J, y Ortiz A (2012) HSP27/HSPB1 as an adaptive podocyte antiapoptotic protein activated by high glucose and angiotensin II. *Lab Invest*, 92, 32-45). La mezcla contiene 3 siRNAs (siRNA identificado por la secuencia SEQ ID NO: 1, identificado por siRNA secuencia de SEQ ID NO: 2 y siRNA identificado por la secuencia SEQ ID NO: 3). Después de 18 horas, las células se lavaron y se cultivaron durante 6 horas en medio completo durante 24 h antes de la adición del estímulo. Este punto de tiempo fue seleccionado de un curso de tiempo de la disminución de expresión de la proteína MAP3K14 en respuesta a siRNA. Un control negativo siRNA proporcionado por el fabricante no redujo la proteína MAP3K14.

### **Muerte celular, apoptosis y proliferación**

Las células se cultivaron a sub-confluencia en placas de seis pocillos (Costar, Cambridge, MA) y se transfectaron con MAP3K14 siRNA como se ha descrito previamente (Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Izquierdo MC, Jakubowski A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Egido J, y Ortiz A (2009) Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: a role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J Cell Mol Med*, 13, 3329-3342). La apoptosis se evaluó por citometría de flujo del contenido de ADN. Para la evaluación del ciclo celular y la apoptosis, las células adherentes se combinaron con las células desprendidas de forma espontánea, y se tiñeron con 100 mg/ml de yoduro de propidio, 0,05% NP-40, 10 mg/ml de ARNasa A en PBS a 4 ° C durante > 1 hora . Este ensayo permeabiliza las células. La permeabilización permite la entrada de yoduro de propidio en todas las células, vivas o muertas. Las células apoptóticas se caracterizan por un contenido de ADN inferior (células hipodiploides) debido a la fragmentación nuclear. Por lo tanto, este ensayo no se basa en la conocida capacidad del yoduro de propidio para entrar en las células muertas. Se contó el porcentaje de células apoptóticas con contenido de ADN disminuido (hipodiploides), que corresponde a células apoptóticas con el núcleo fragmentado.

### **20 ELISA**

Las células fueron transfectadas con siRNA MAP3K14 y se estimularon con 100 ng TWEAK / ml. CXCL10 murino en los sobrenadantes se determinó por ELISA (BD Pharmingen, San Diego, CA).

25

### **Actividad NFκB**

Se cuantificó usando el Kit TransAM para NFκB RelB y p52 (Active Motif, Carlsbad, CA). Se usaron extractos nucleares de tejido renal.

30

### **Estadística**

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 11.0 software (IBM, NY, EE.UU.). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. La significación estadística

35

a nivel  $p < 0,05$  se evaluó mediante la prueba t de Student para dos grupos de datos y ANOVA para tres de más grupos.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una composición farmacéutica que comprende unas secuencias de ARN que tienen una identidad de secuencia de al menos un 80% respecto a las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención del daño renal agudo (AKI) mediante la inhibición de MAP3K14.  
5
2. Uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde mediante la inhibición de MAP3K14, se disminuye la inflamación mediante al menos la regulación de la secreción de citoquinas y se preserva la función renal mediante al menos la inhibición de la muerte celular por apoptosis.  
10
3. Uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicha identidad de secuencia es de al menos un 90%.
4. Uso de una composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizado por que dicha identidad de secuencia es de al menos un 95%.  
15
5. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dichas secuencias de ARN son las secuencias identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
6. Uso de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que dicha composición farmacéutica comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.  
20

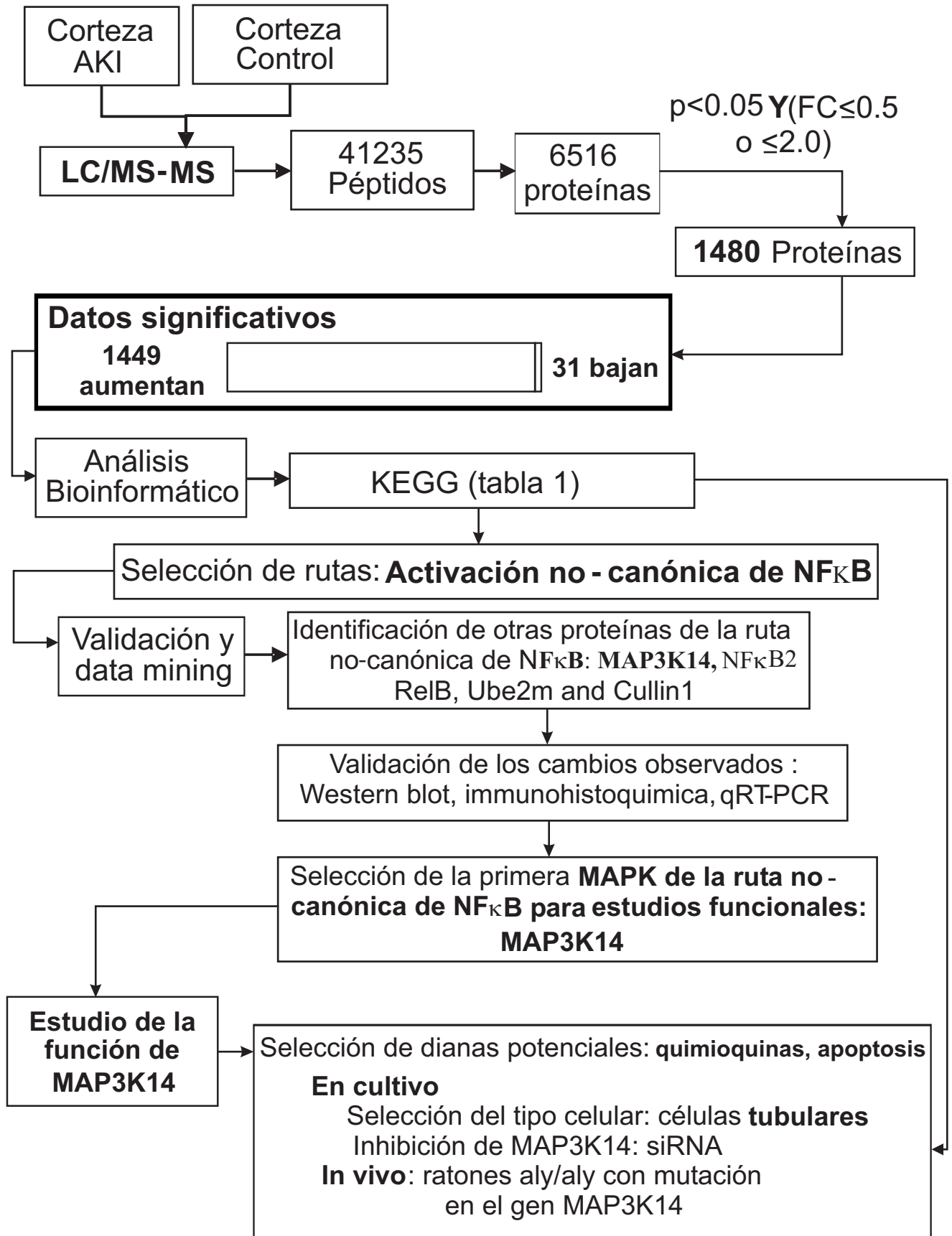


Fig. 1

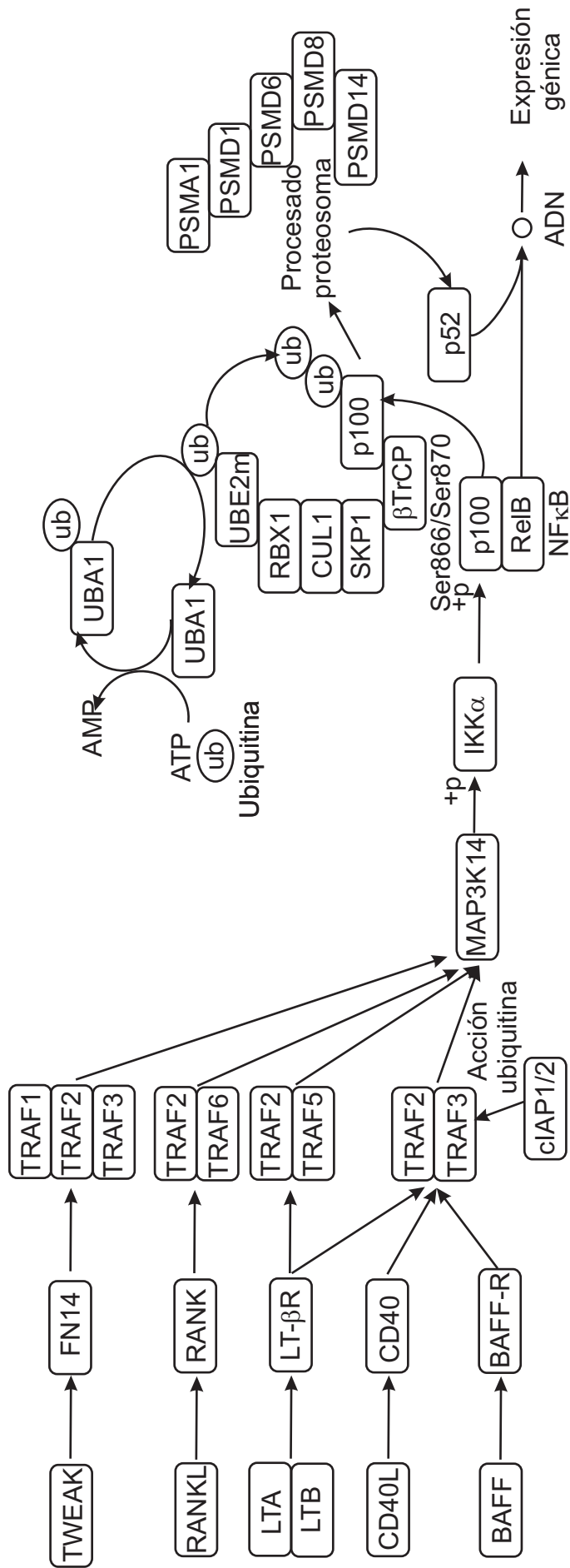


Fig. 2

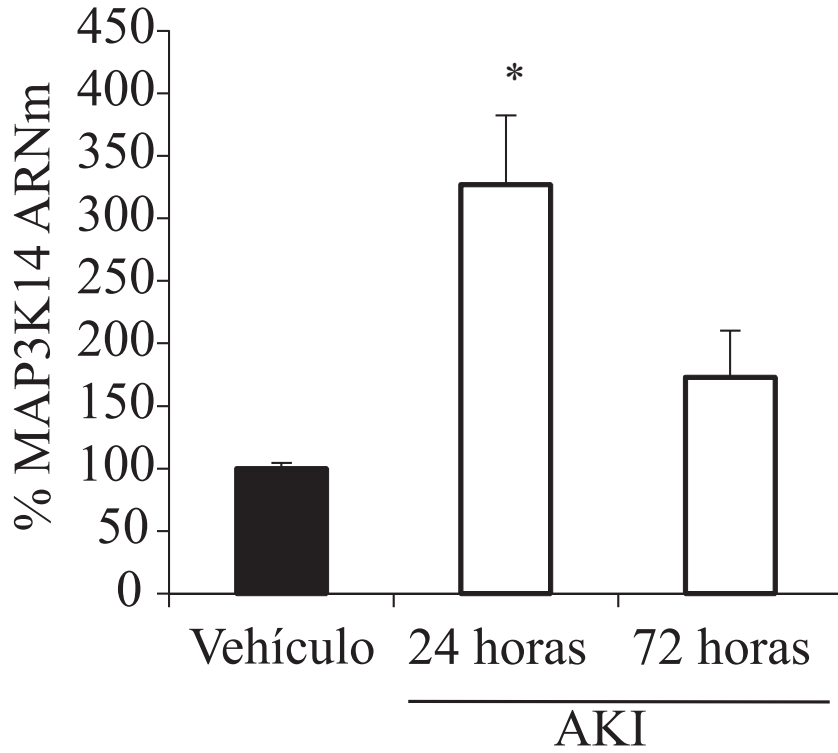


Fig. 3A

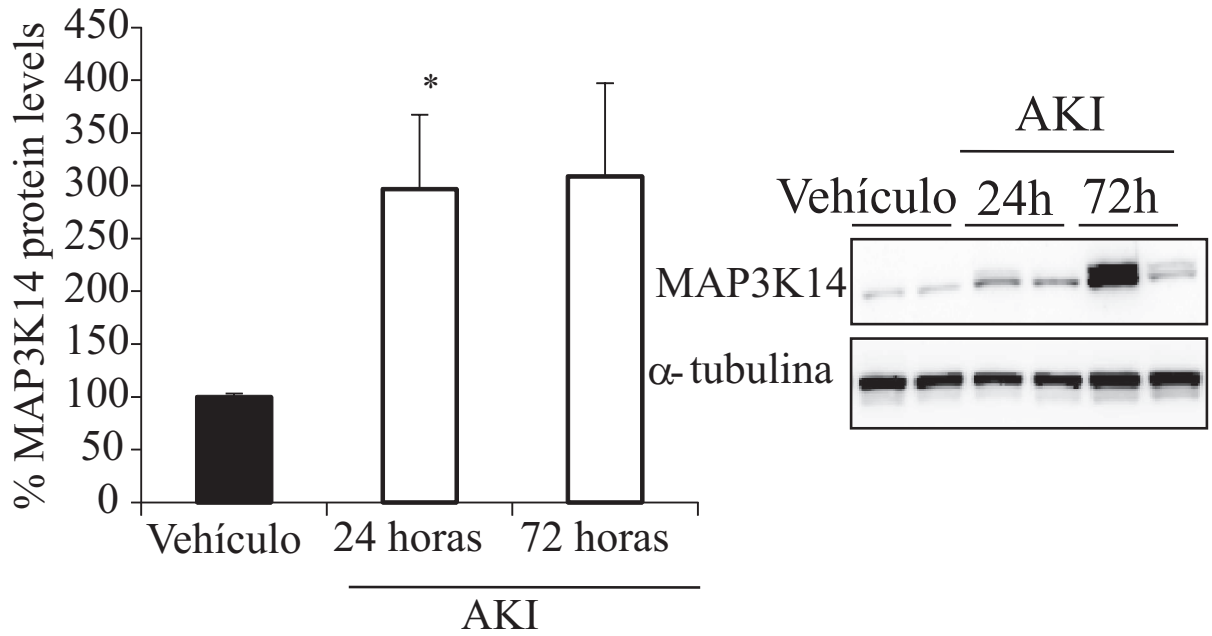
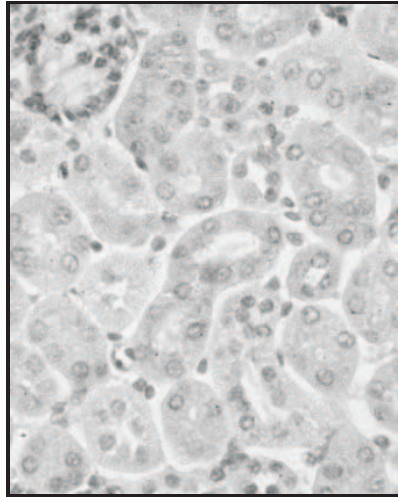


Fig. 3B

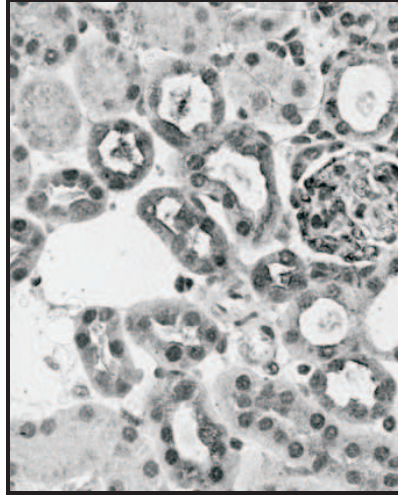
**AKI**

---

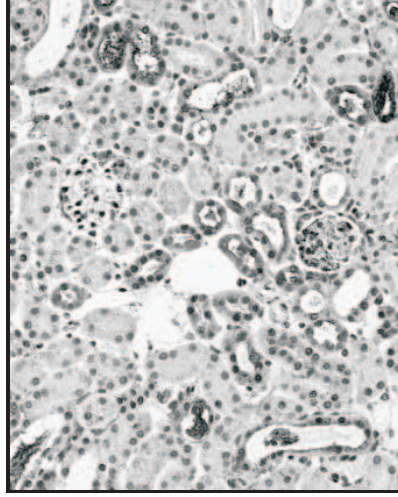
**Control**



**Detalle**



**Vista general**



**MAP3K14**

Fig. 3C

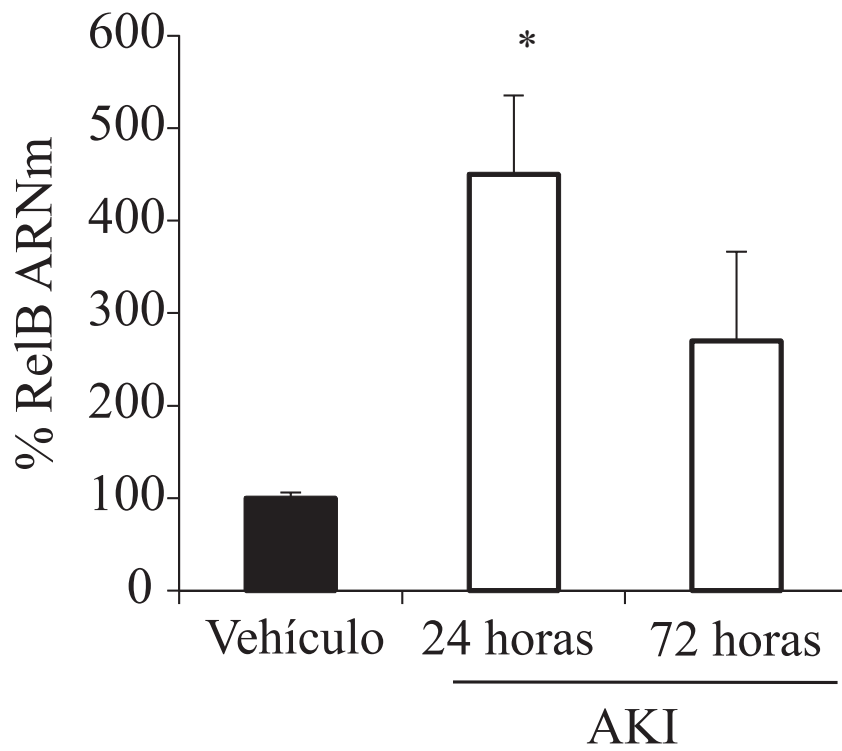


Fig. 4A

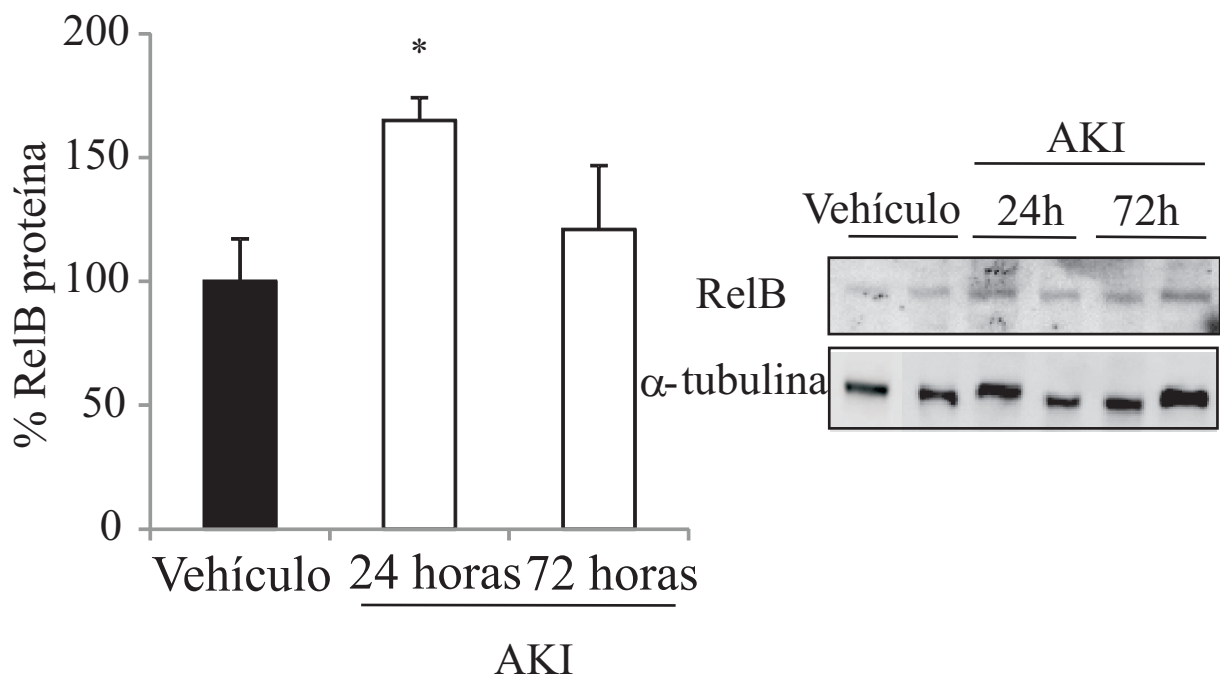


Fig. 4B

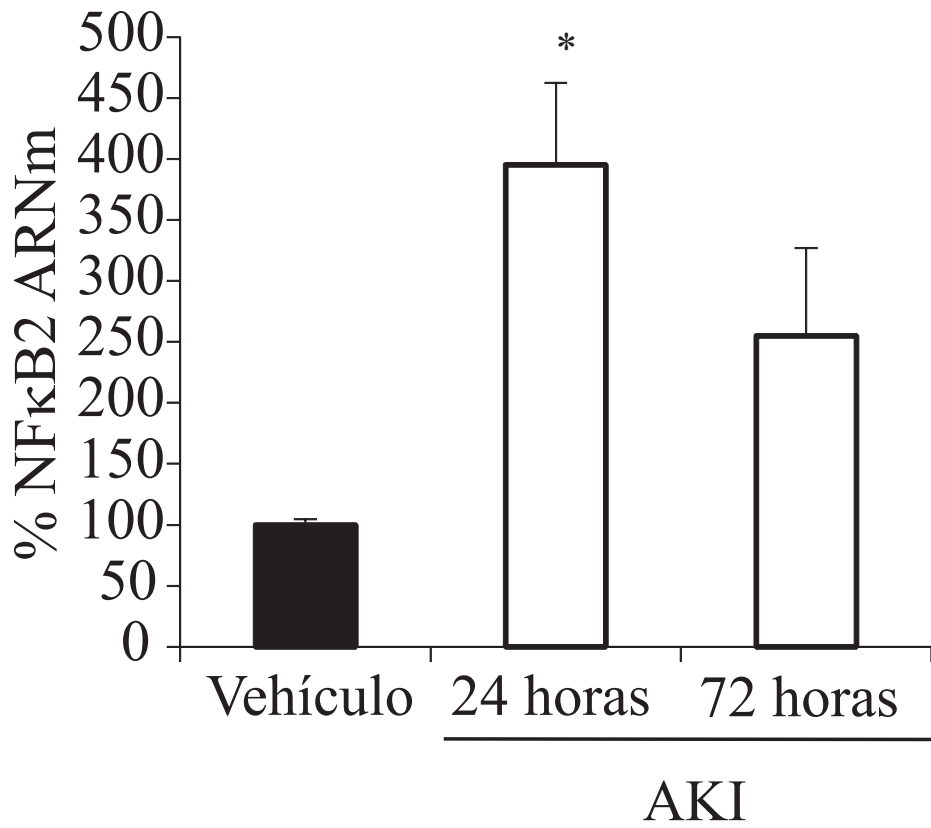


Fig. 4C

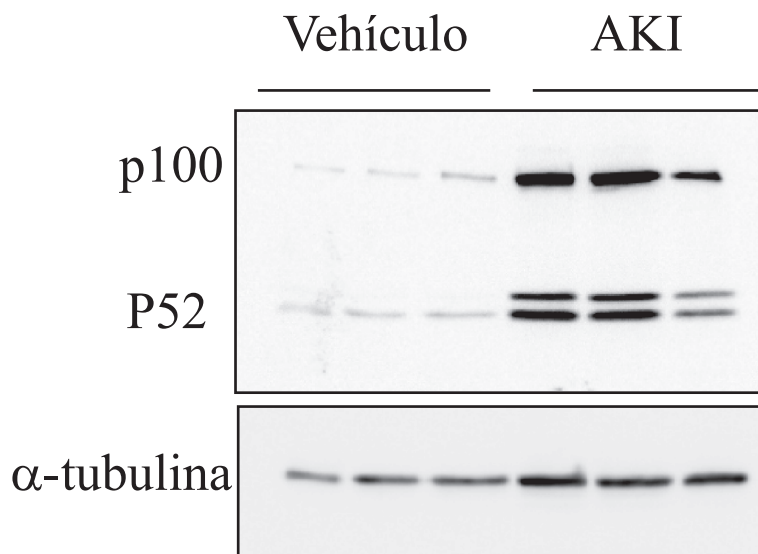


Fig. 4D

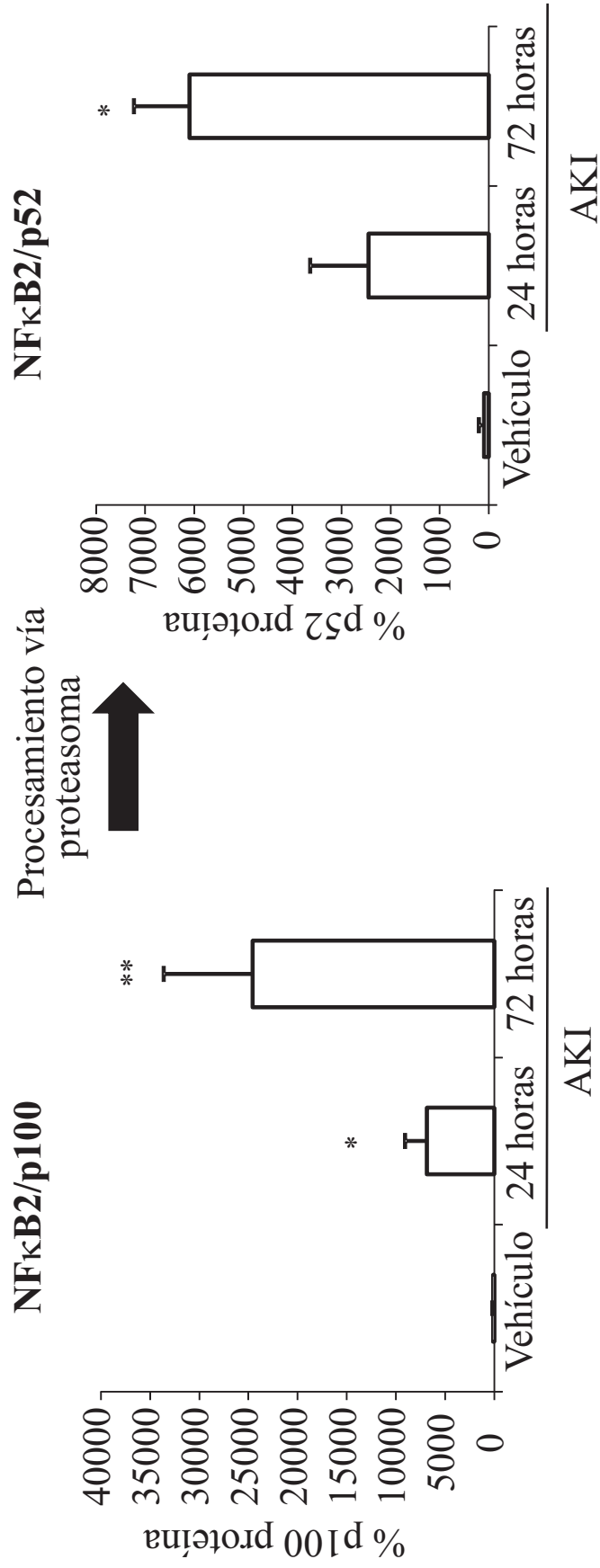


Fig. 4E

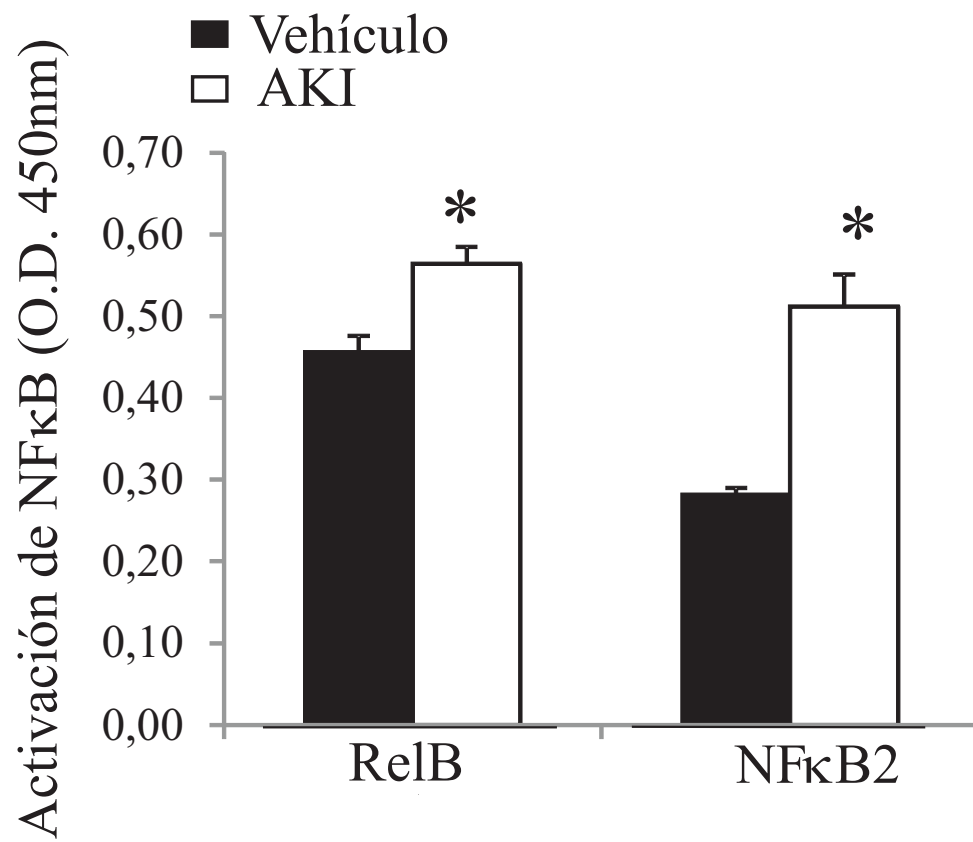
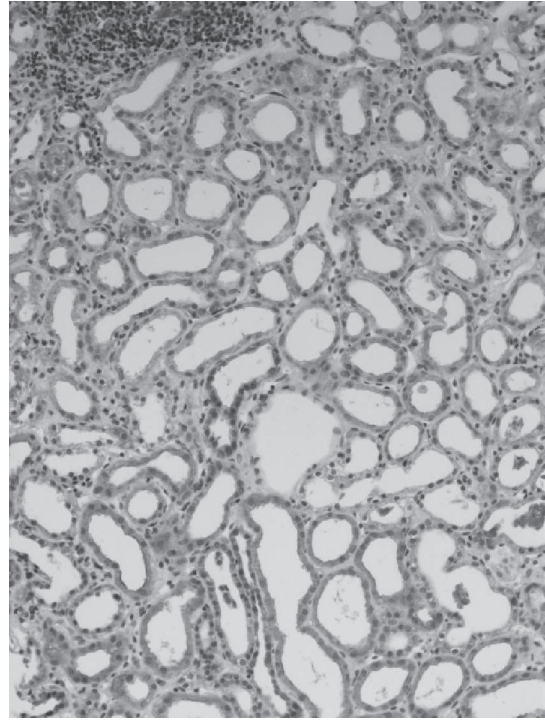
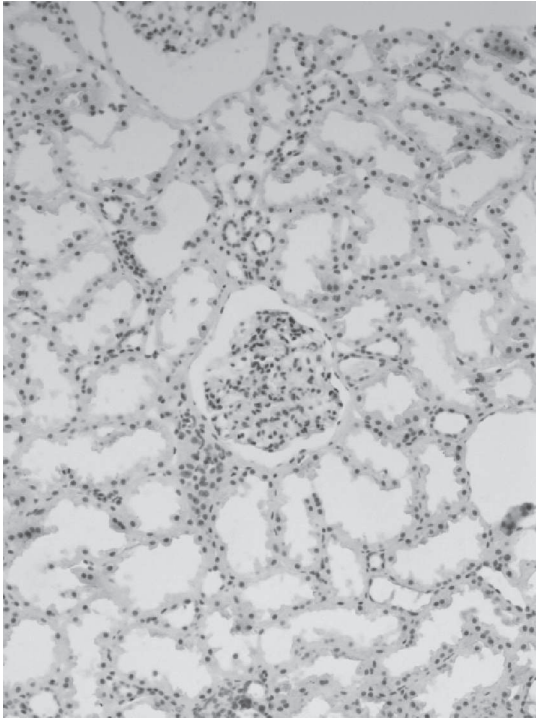
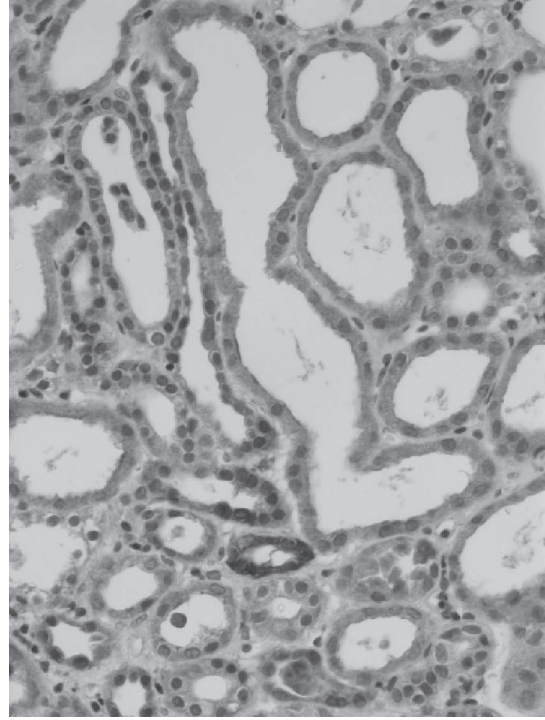
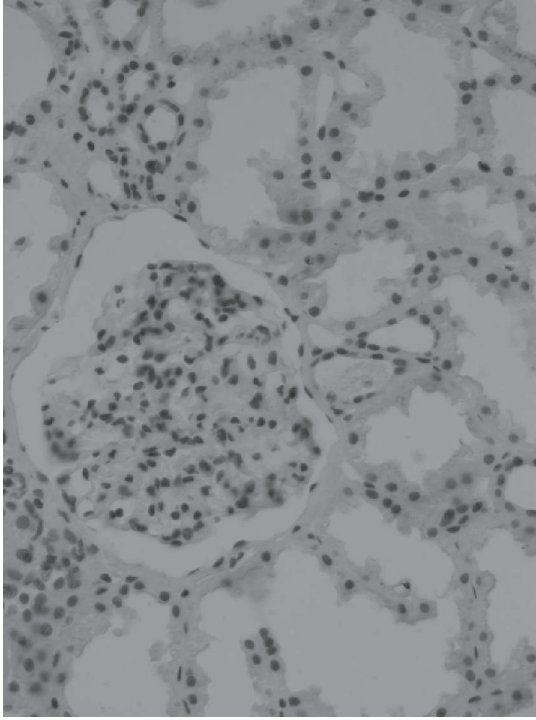


Fig. 4F

Detalle



Control

AKI

Fig. 5

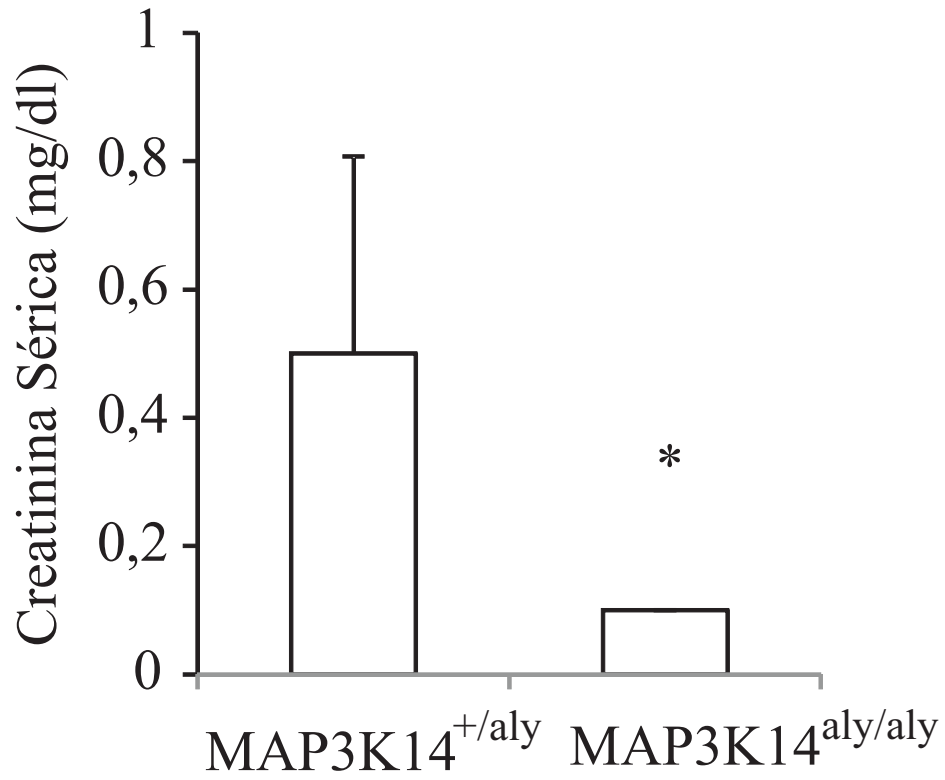


Fig. 6A

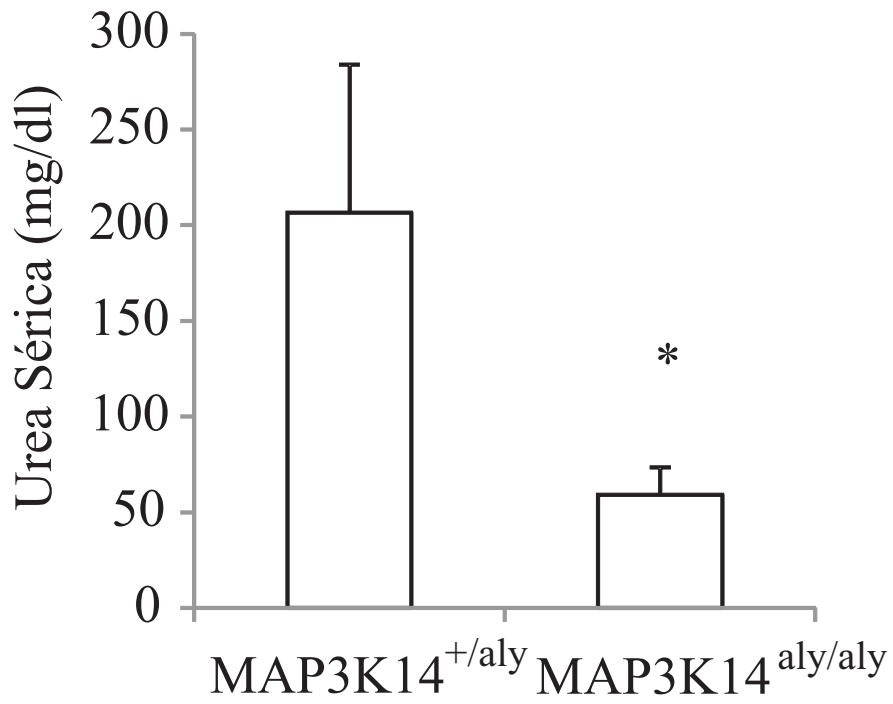


Fig. 6B

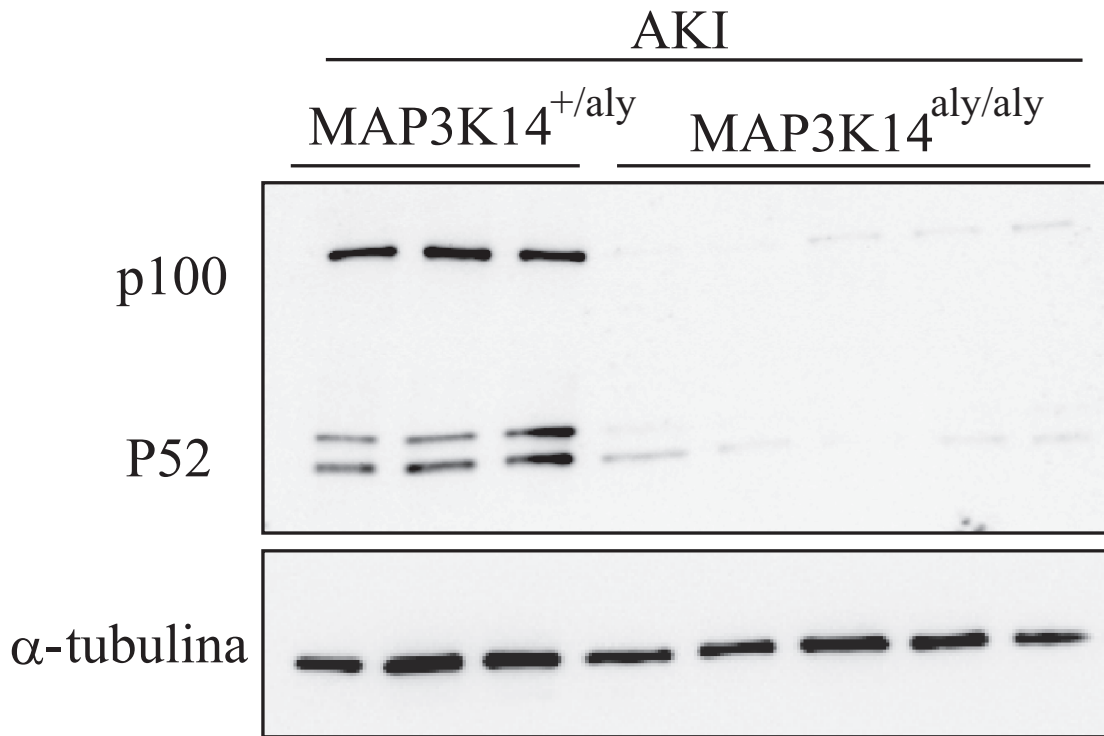


Fig. 6C

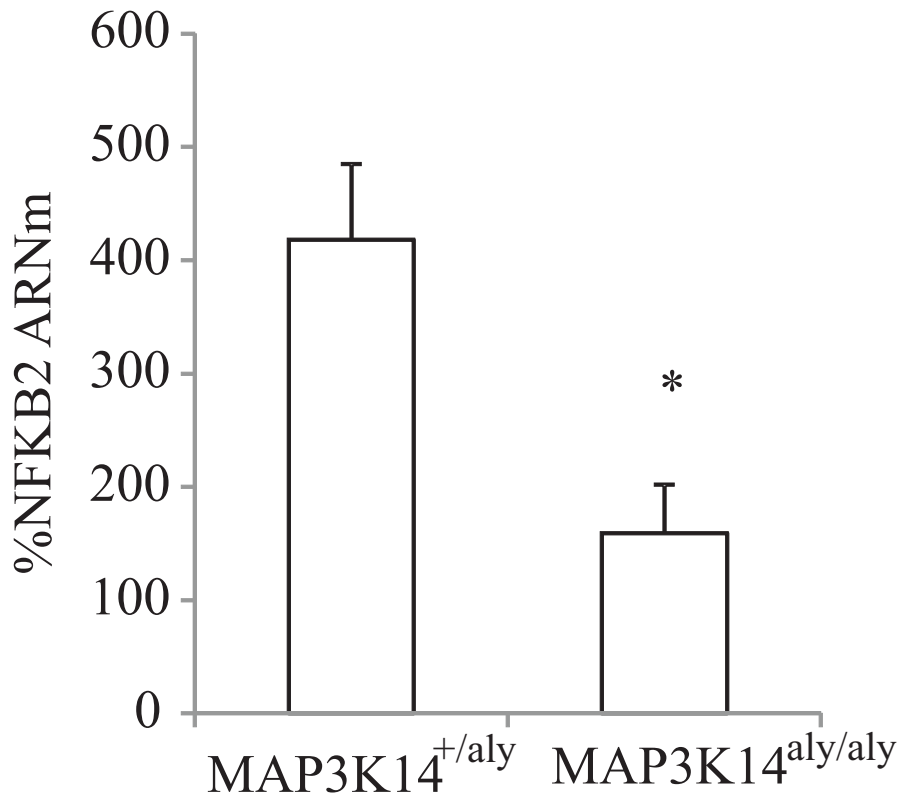


Fig. 6D

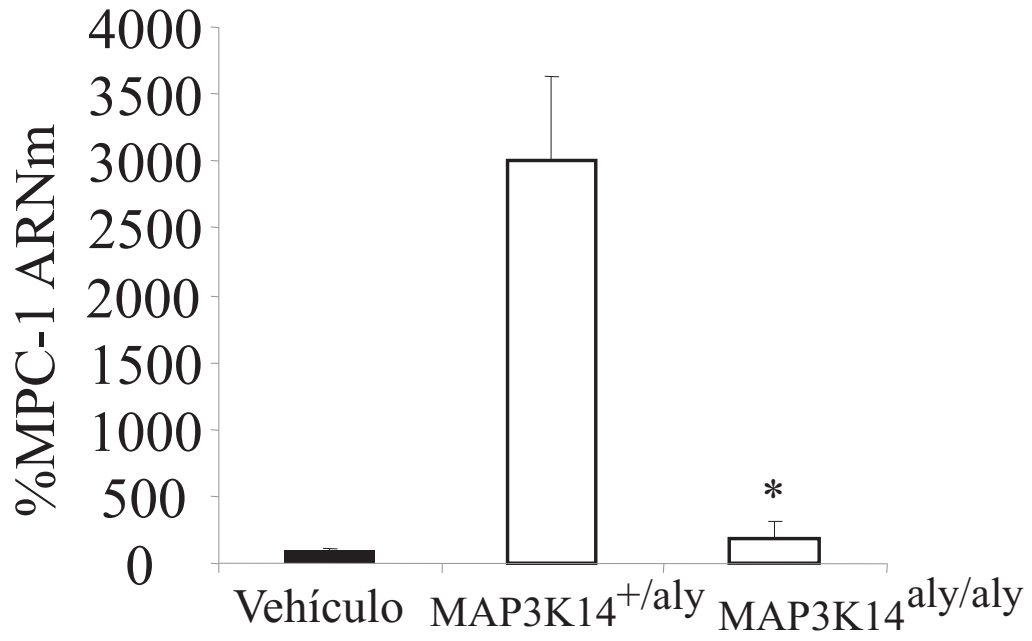


Fig. 6E

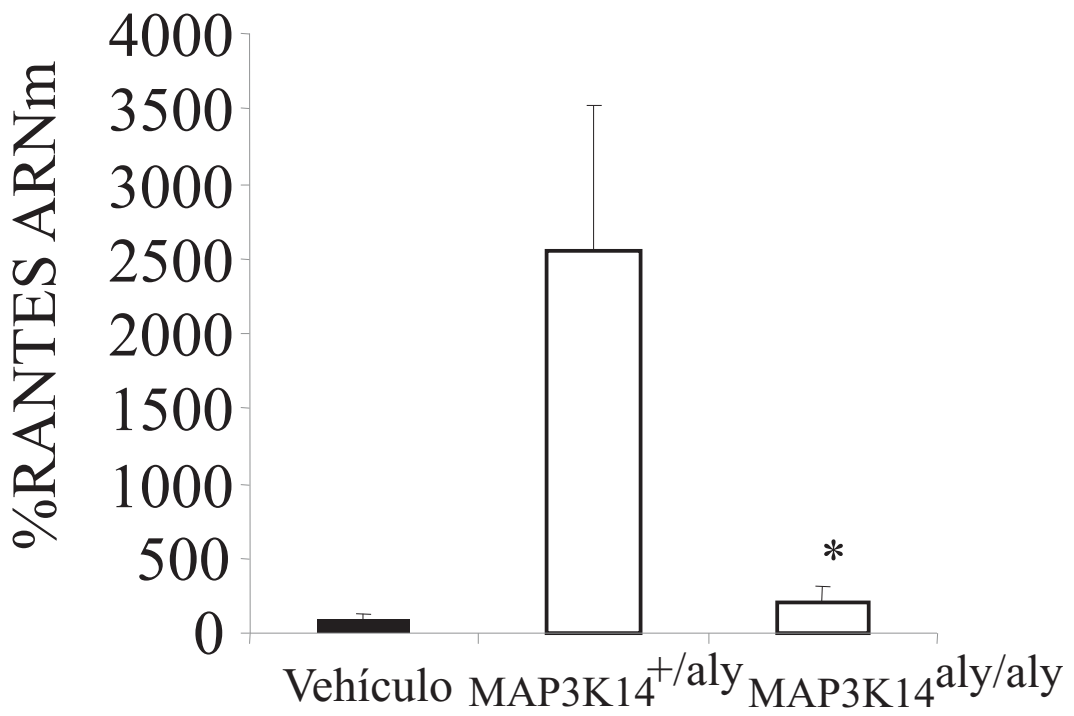


Fig. 6F

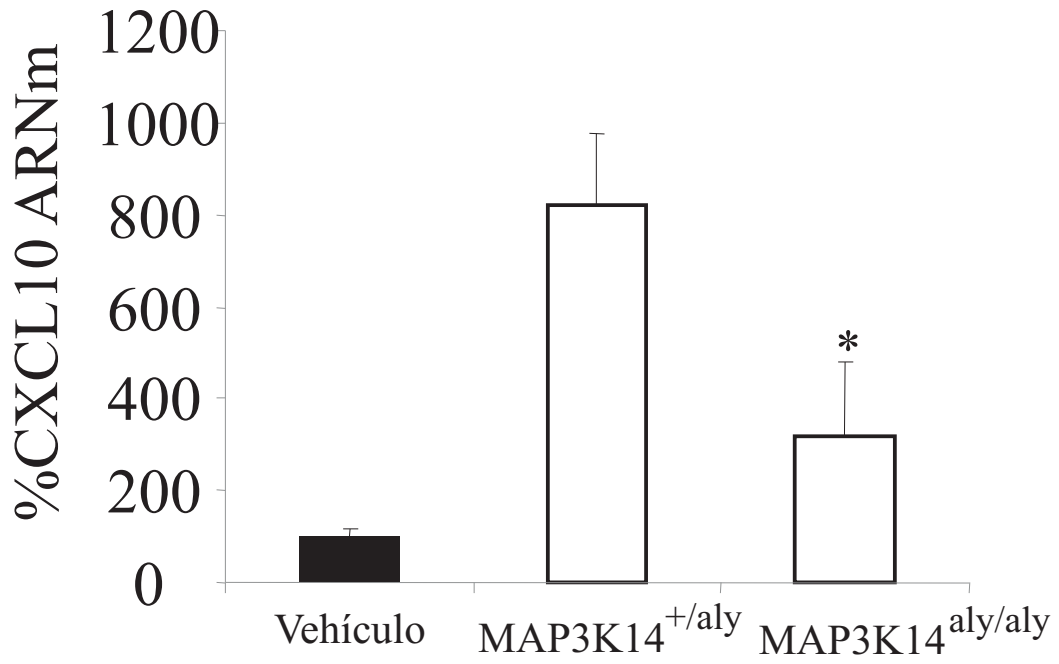


Fig. 6G

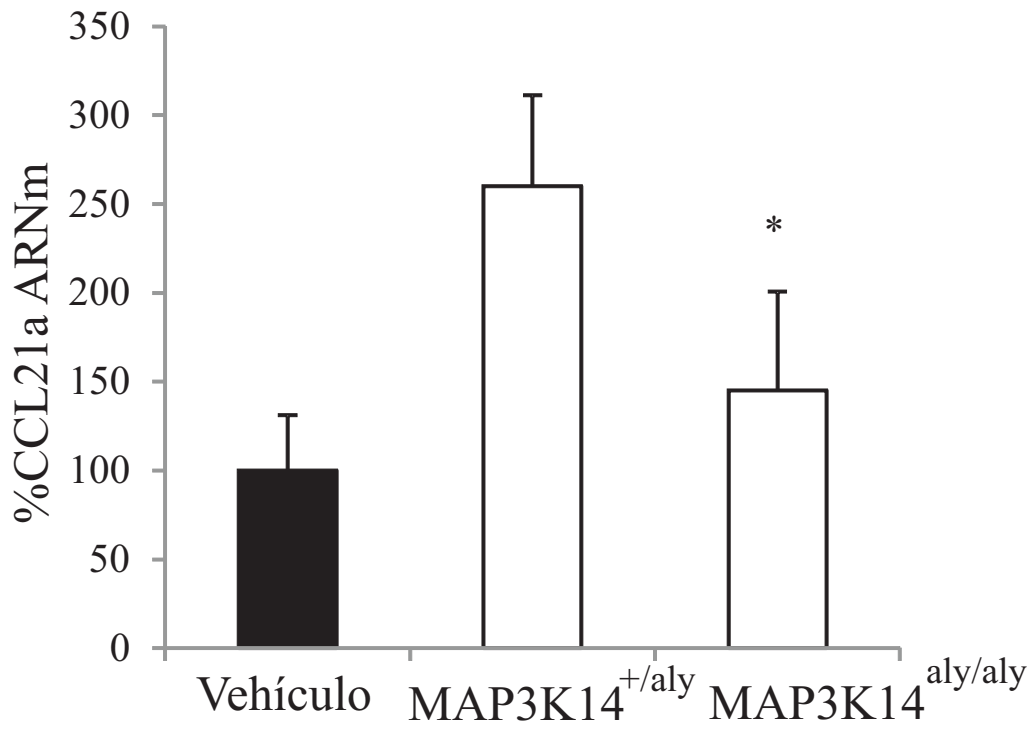
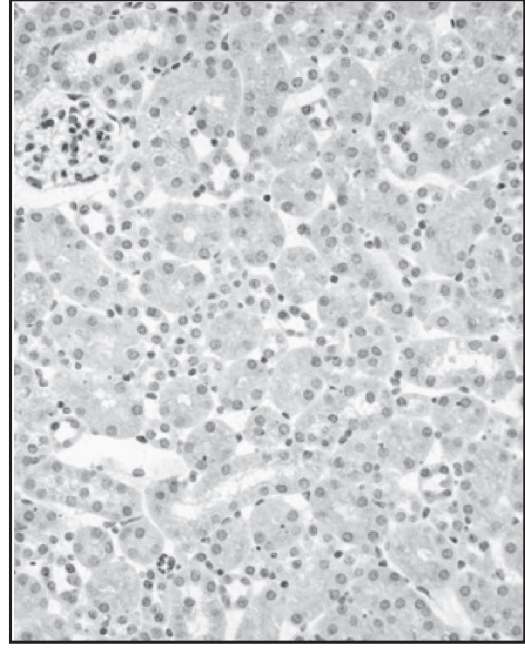
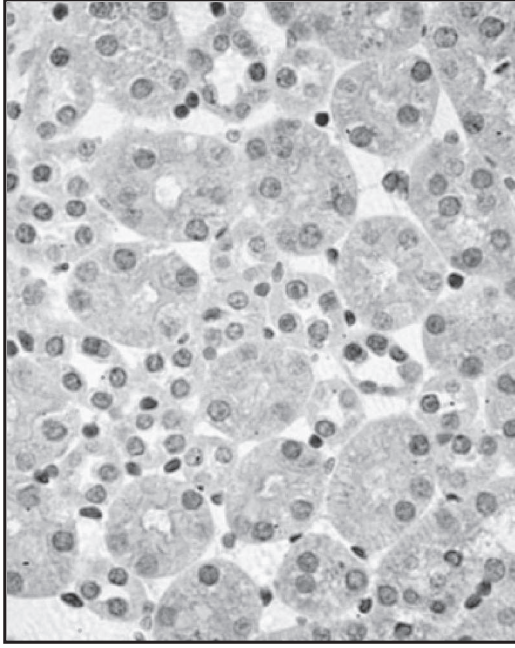


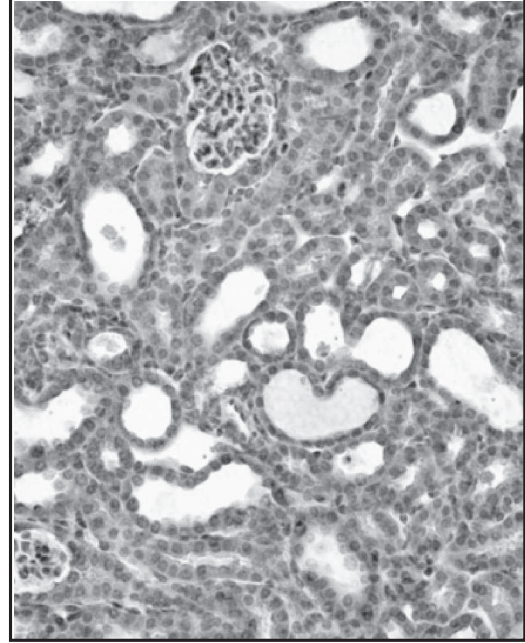
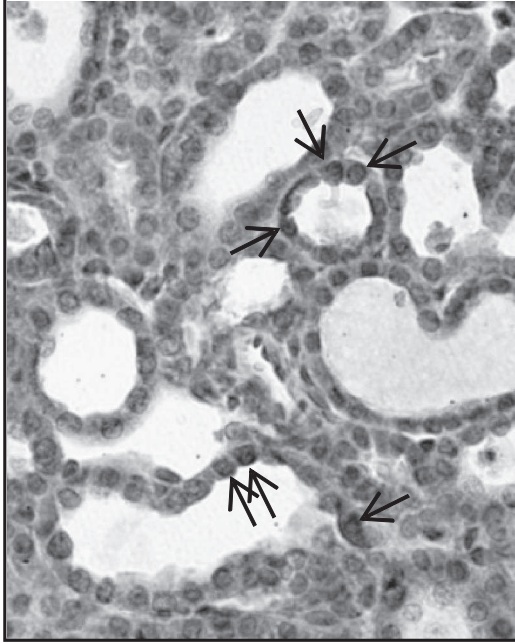
Fig. 6H

**AKI**

**MAP3K14<sup>aly/aly</sup>**



**MAP3K14<sup>+ /aly</sup>**



**ReIB**

**Detalle**

**Vista general**

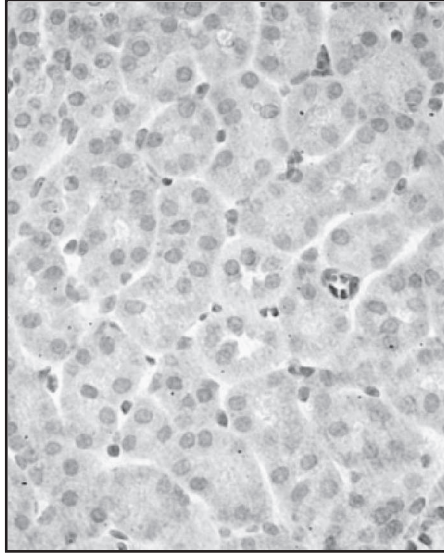
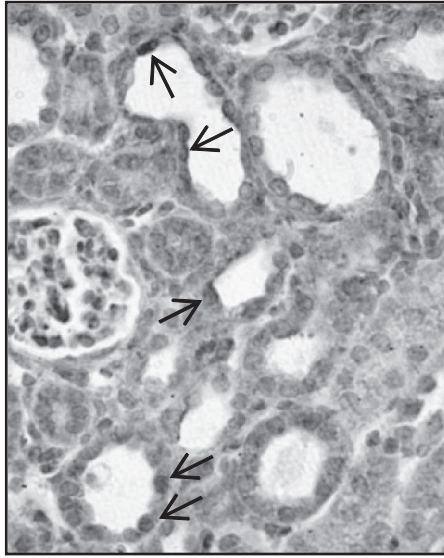
**Fig. 7A**

**AKI**

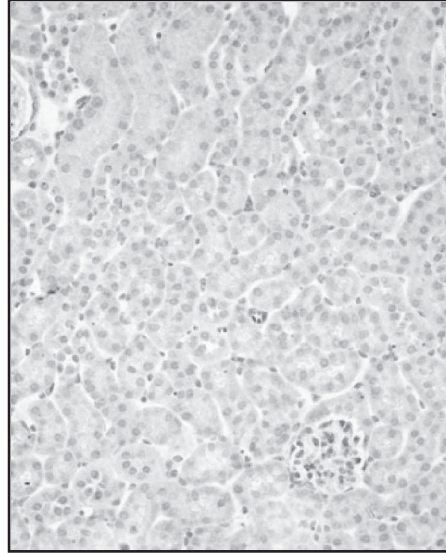
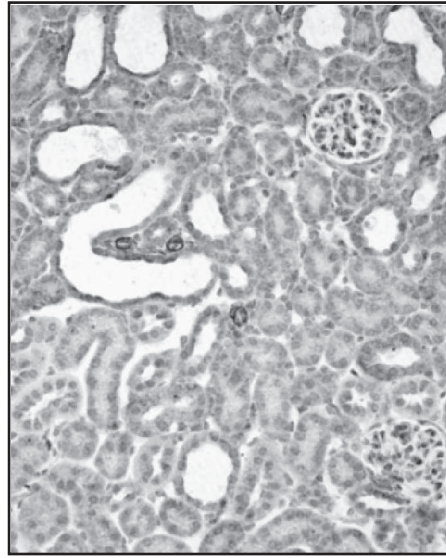
**NF $\kappa$ B2 p100/p52**

**MAP3K14<sup>+/aly</sup>**

**MAP3K14<sup>aly/aly</sup>**



**Detalle**

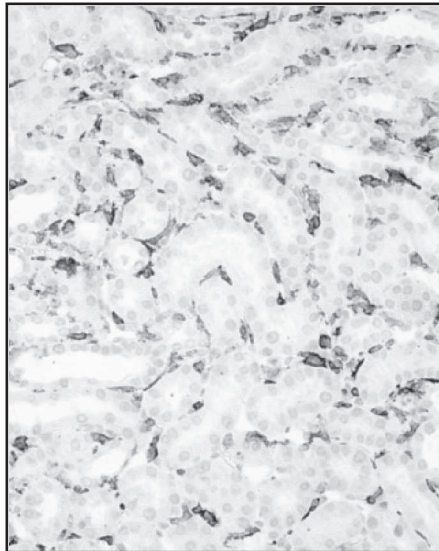


**Vista general**

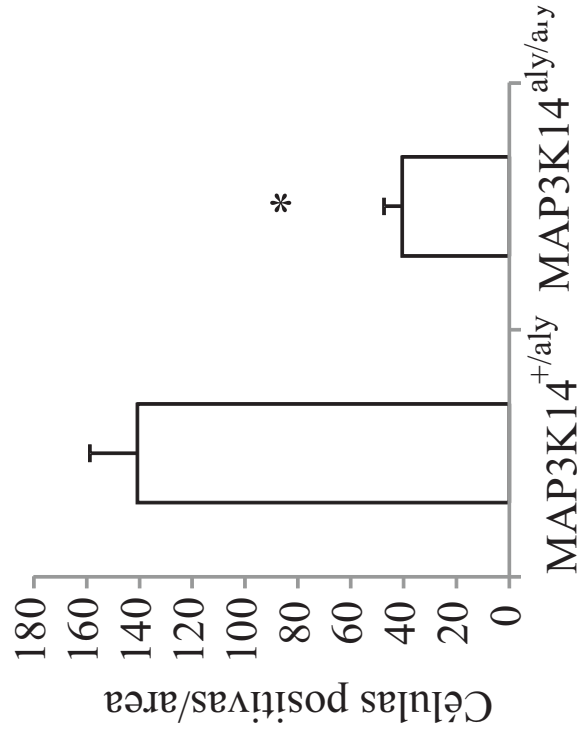
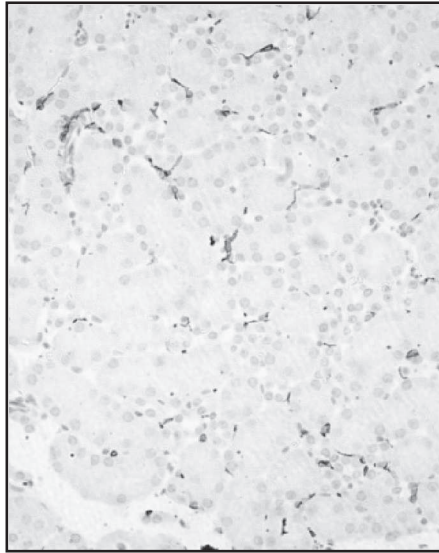
**Fig. 7B**

**AKI**

**MAP3K14<sup>+/-aly</sup>**



**MAP3K14<sup>aly/aly</sup>**



**Fig. 8A**

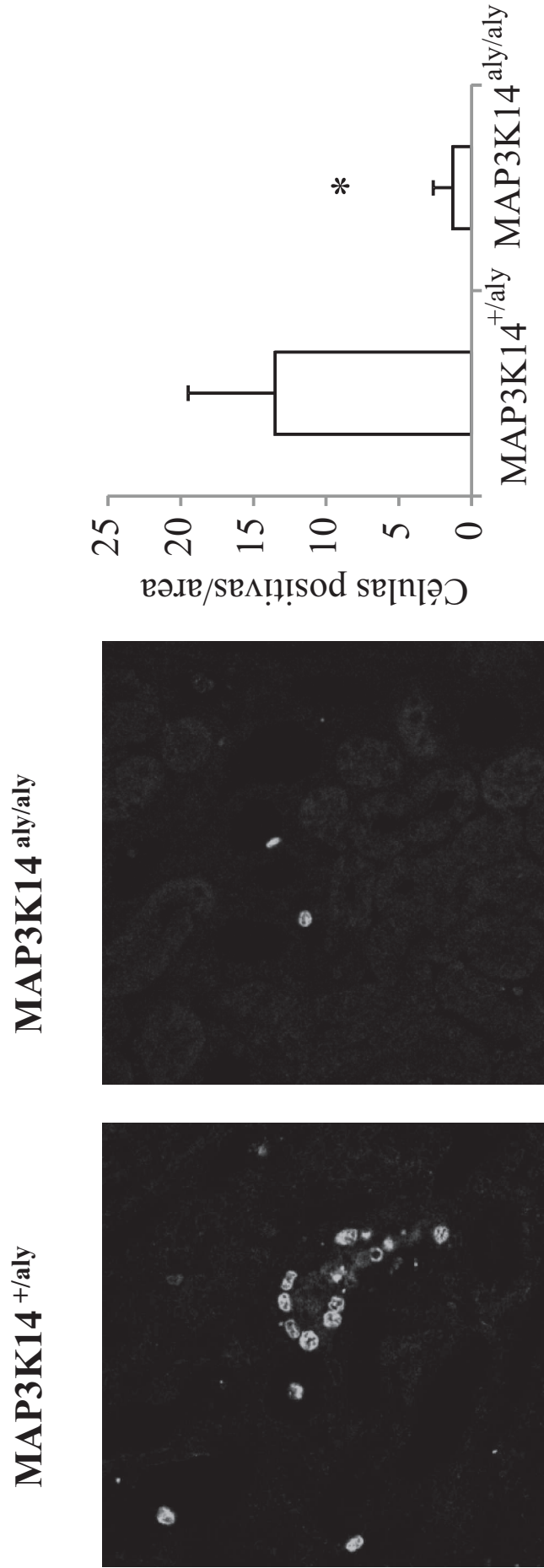


Fig. 8B

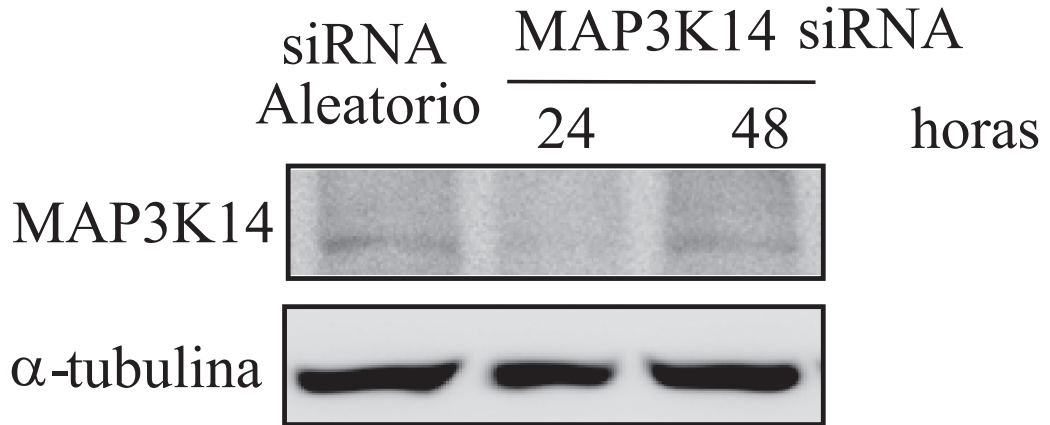


Fig. 9A

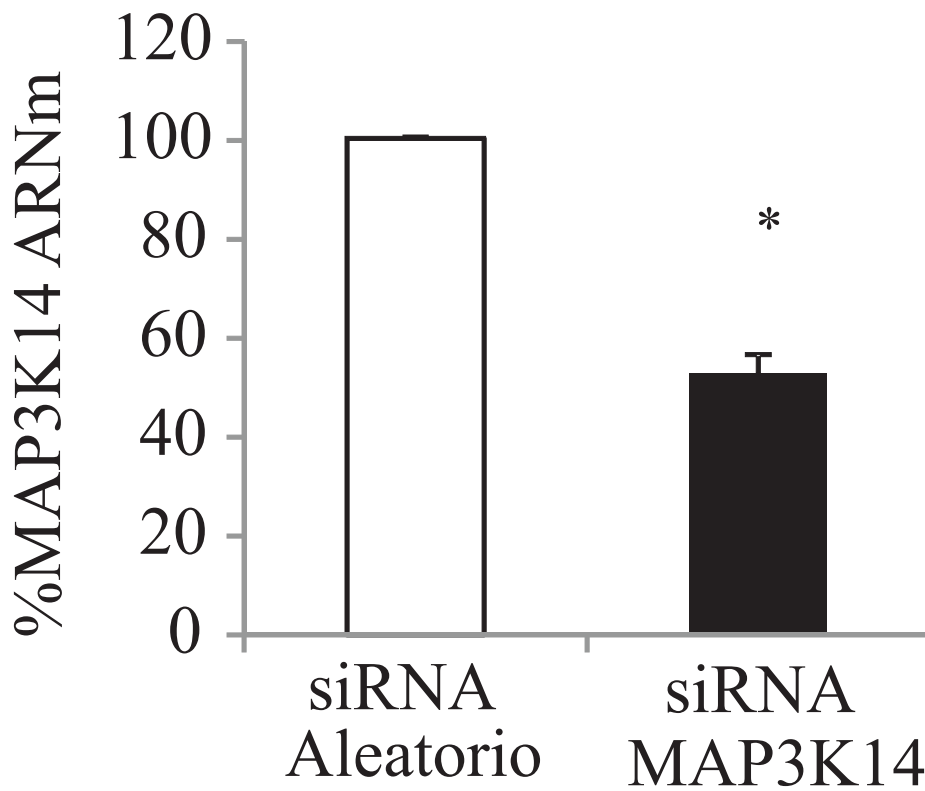


Fig. 9B

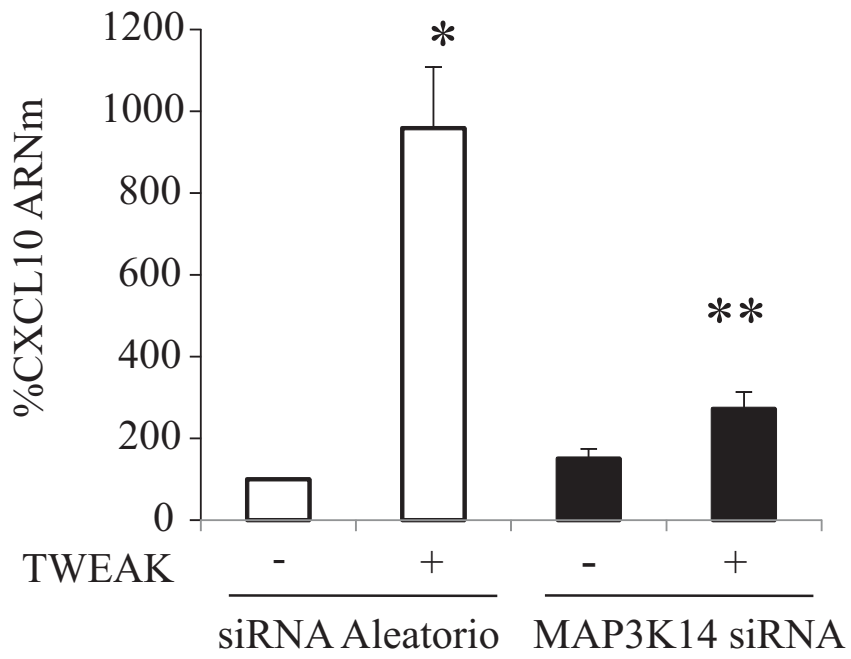


Fig. 9C

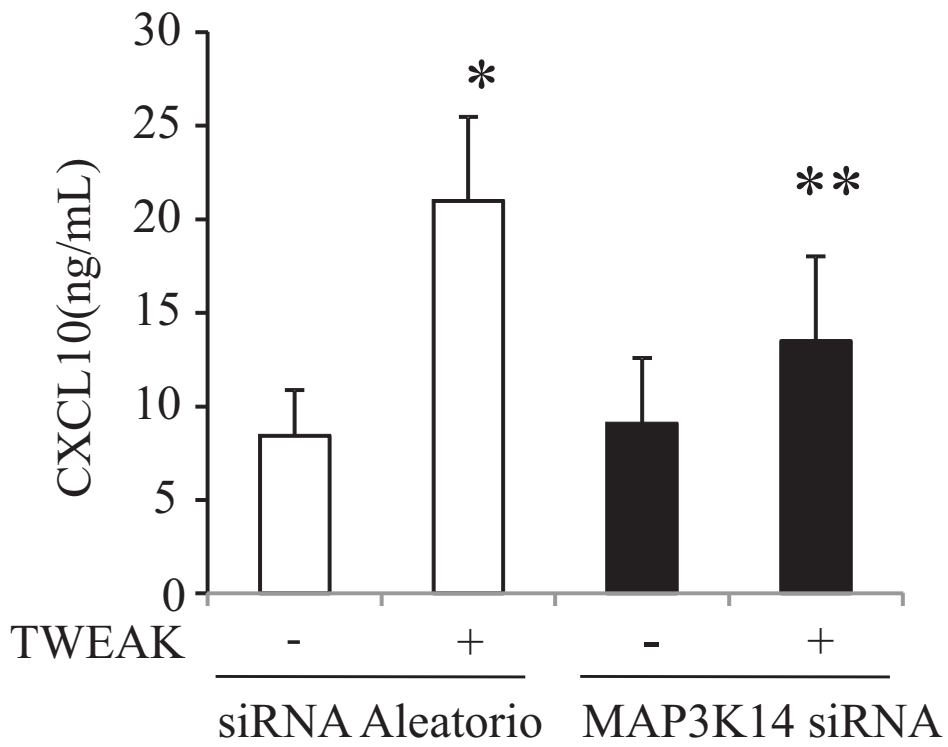


Fig. 9D

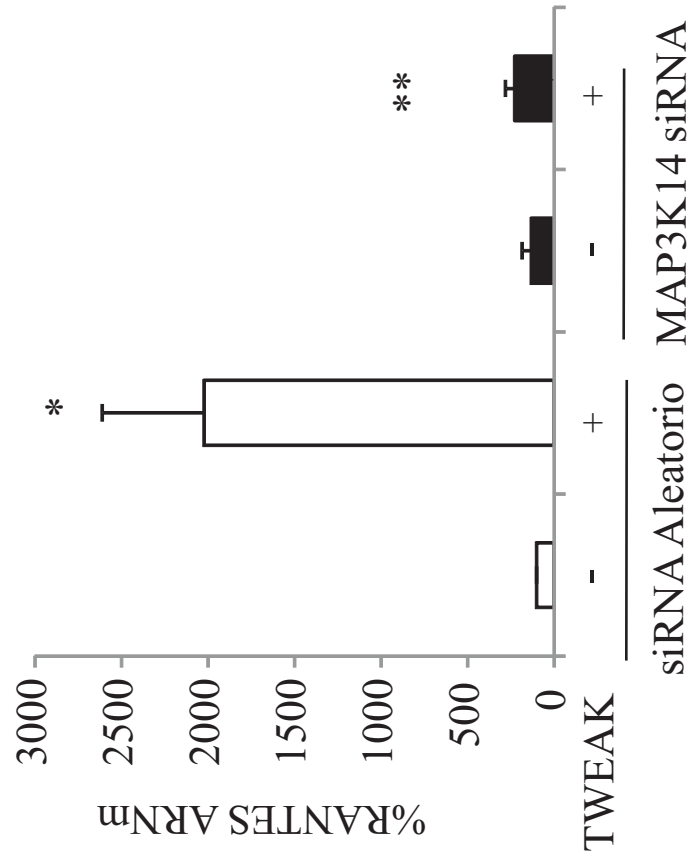


Fig. 9F

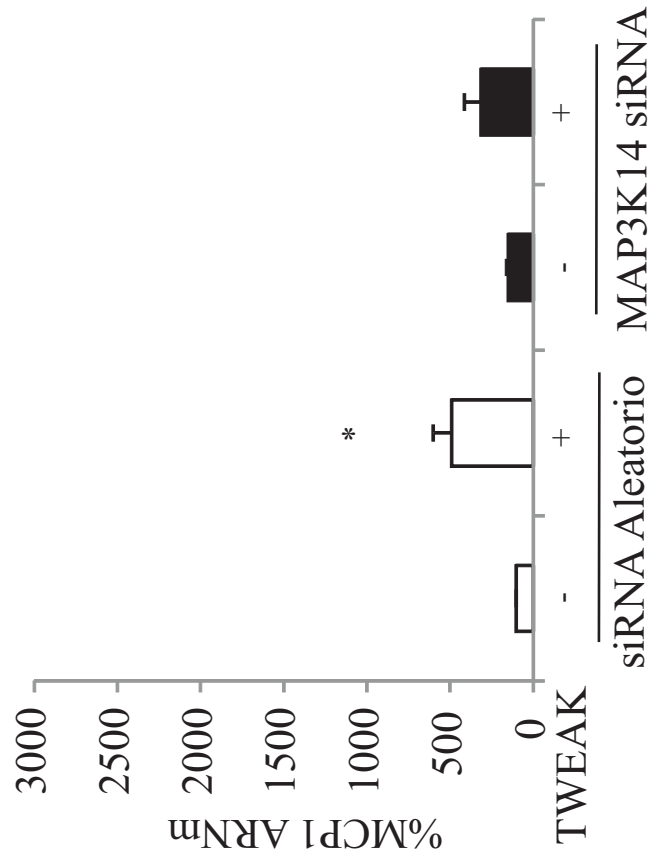


Fig. 9E

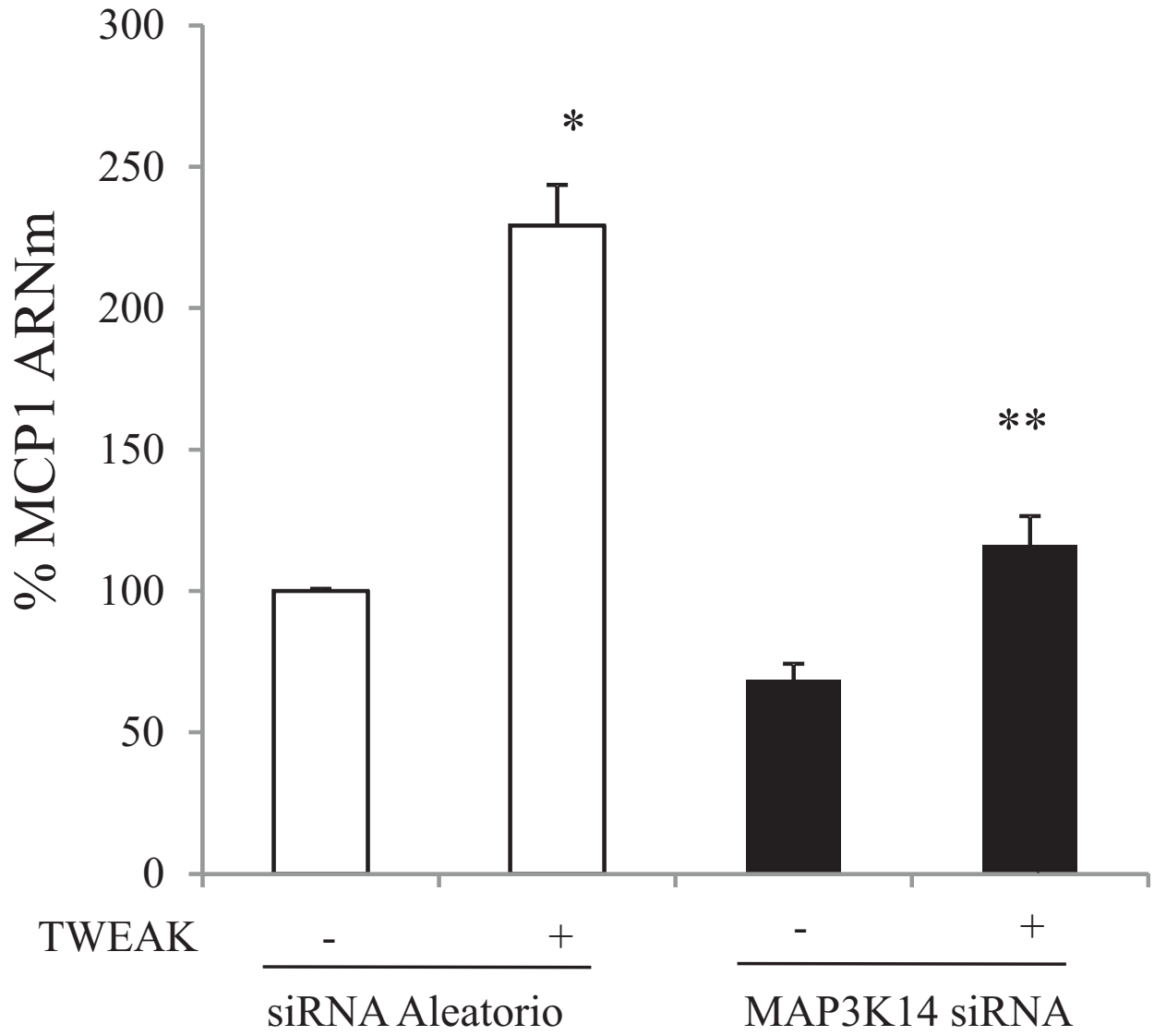
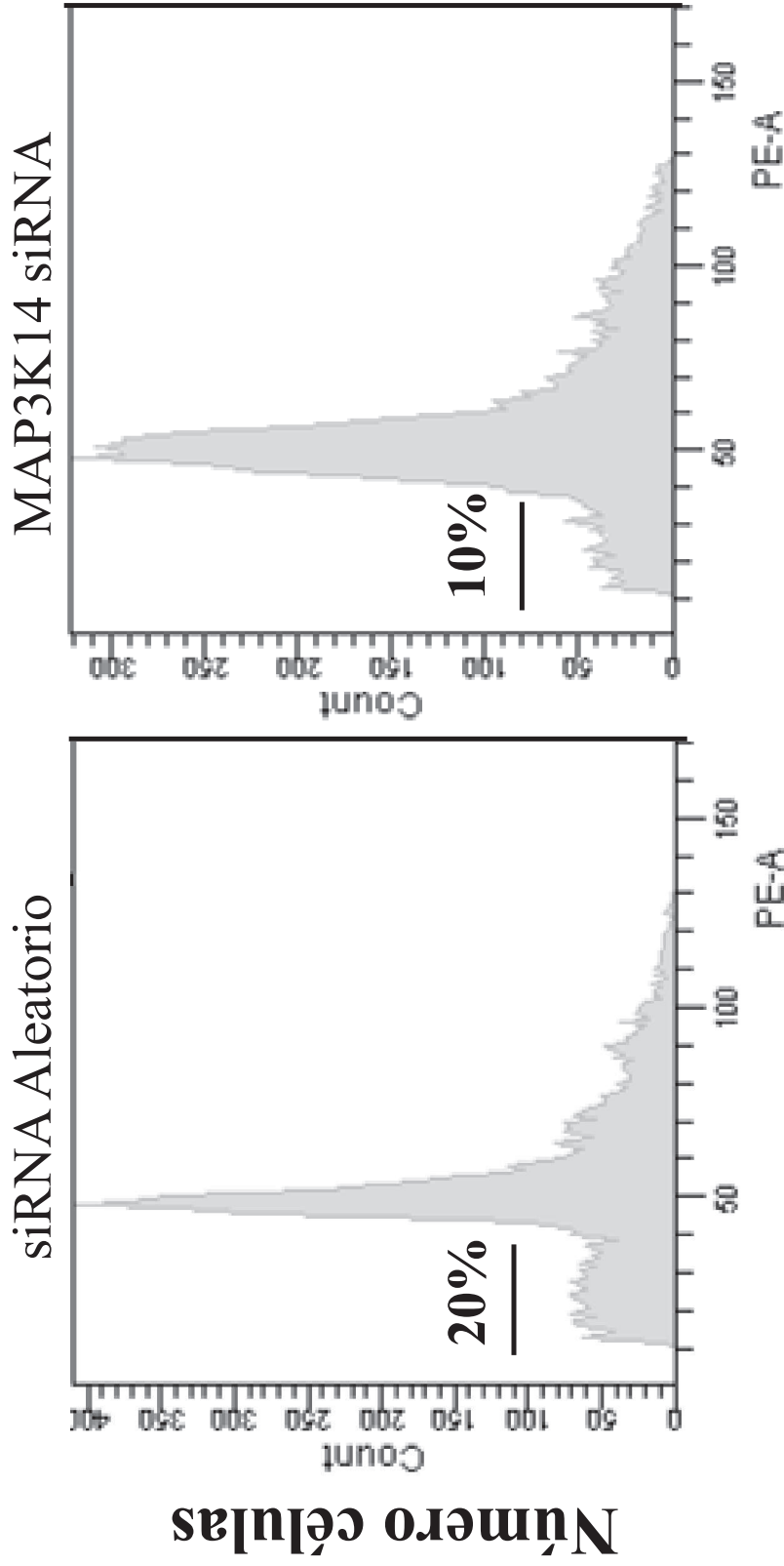


Fig. 10



## Contenido DNA

Fig. 11A

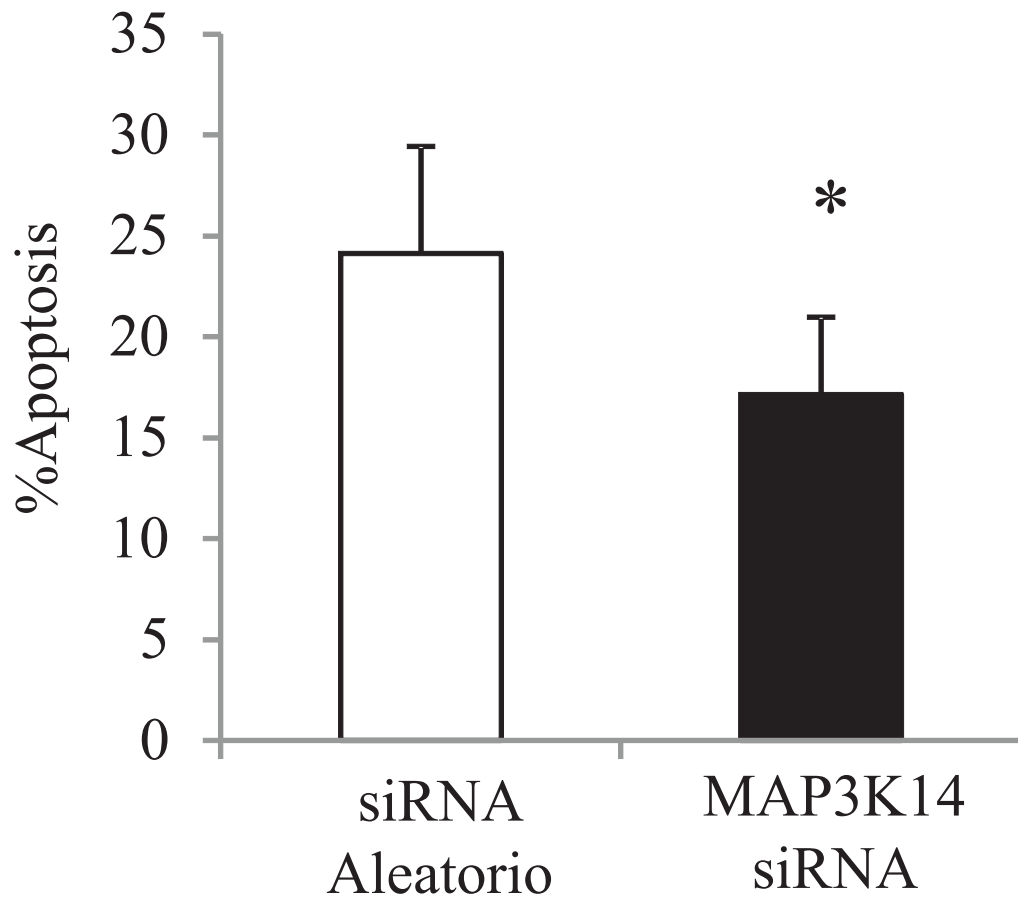


Fig. 11B

Lista de Secuencias

<110> INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA - FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

<120> USO DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA LA FABRICACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO Y/O LA PREVENCIÓN DEL DAÑO RENAL AGUDO

<130> 2015/8438 ES

<160> 3

<170> BISSAP 1.2

<210> 1  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="unassigned RNA"  
 /note="MAP3K14 siRNA 1"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 1  
 cccaggacga augacucuuu gaguu 25

<210> 2  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="unassigned RNA"  
 /note="MAP3K14 siRNA 2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 2  
 cuguccgaag gucacacgac aguuu 25

<210> 3  
 <211> 25  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="unassigned RNA"  
 /note="MAP3K14 siRNA 3"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 3  
 gggagagaua ccucgacacu cucuu 25



- ②① N.º solicitud: 201531328  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.09.2015  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/7105** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YANG, C. et al., 'Fighting against kidney diseases with small interfering RNA: opportunities and challenges', JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, 2015, Vol. 13, Páginas 39, ISSN: 1479-5876 (electronic), doi: 10.1186/s12967-015-0387, EPub: 01-02- 2015, todo el documento.	1-6
A	WO 2010144336 A2 (QUARK PHARMACEUTICALS INC.) 16-12-2010, Todo el documento.	1-6
A	KR 20090002560 A (KIM JIN SEOK) 09-01-2009, Resumen [en línea] [Recuperado el 07/02/2017]. Recuperado de: EPODOC/EPO Database	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
20.02.2017

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/4

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

A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.02.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Yang, C. et al., <i>J. Transl. Med.</i> , (2015), 13: 39.	01-02- 2015
D02	WO 2010144336 A2 (QUARK PHARMACEUTICALS INC.)	16.12.2010
D03	KR 20090002560 A (KIM JIN SEOK)	09.01.2009

En D01-D02 se describe el uso de ARNsi como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades renales. En D03 se describen ARNsi específicos del gen MAP3K14 (NIK) para el tratamiento de una enfermedad hepática.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. El objeto de la reivindicación 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2-6 comprenden características técnicas que cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva con respecto al estado de la técnica anterior, representado por los documentos D01-D03.

En D01-D02 se analiza el uso de ARNsi para el tratamiento de diferentes enfermedades renales, en particular, el daño renal agudo (AKI) y la enfermedad renal crónica (CKD) basado en la inhibición específica de genes relacionados con dichas patologías. Sin embargo, ninguno de los ARNsi descritos está diseñado para reconocer específicamente al ARNm del gen MAP3K14 (NIK) concernido en el objeto reivindicado en la solicitud (cf. D01: 'siRNA therapeutic efficacy'. D02: Tabla 1. Reivindicaciones).

En D03 se divulga el uso terapéutico de ARNsi para el tratamiento de la enfermedad hepática causada por la infección de HBV basado en la inhibición específica del gen MAP3K14 (NIK) (cf. D03: Resumen).

Por consiguiente, en el estado de la técnica más próximo no se ha divulgado el uso de ninguna composición farmacéutica con las características técnicas referidas en las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del daño renal agudo (AKI). Además, dicho uso no se deduce de una manera obvia del estado de la técnica pertinente (cf. D01-D03).

Por todo ello, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-6 es nuevo e inventivo (Art. 4.1., Art. 6.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).