



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 862 185**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2015 E 18183735 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021 EP 3444349**

⑭ Título: **Métodos y composiciones para evitar la lesión por isquemia-reperfusión en órganos**

⑩ Prioridad:

29.05.2014 US 201462004239 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.10.2021

⑬ Titular/es:

QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
7999 Gateway Boulevard, Suite 310
Newark, CA 94560, US

⑭ Inventor/es:

SQUIERS, ELIZABETH C.;
ERLICH, SHAI;
ROTHENSTEIN, DANIEL;
SHARON, NIR;
ODENHEIMER, DANIEL J. y
FEINSTEIN, ELENA

⑭ Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 862 185 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

Métodos y composiciones para evitar la lesión por isquemia-reperfusión en órganos

Campo de la invención

La invención se refiere a la prevención de lesión por isquemia-reperfusión (IRI) en riñones con riesgo de IRI en sujetos de 35 años o más, en órganos naturales *in vivo*. Otros ejemplos divulgados en este documento se relacionan con la prevención de IRI en reimplantes y en trasplantes de riñones de donantes de 35 años de edad o más. Los ejemplos adicionales incluyen la profilaxis de la función retardada del injerto (DGF, por sus siglas en inglés) y la reducción de la frecuencia, cantidad y duración de diálisis en los receptores de trasplantes de riñón de donantes fallecidos. La invención implica poner en contacto el órgano *in vivo* con un inhibidor de p53 temporal. Además, se divulan inhibidores de p53 de ARNcd temporales novedosos.

Antecedentes de la invención

Lesión por isquemia-reperfusión

La lesión por isquemia-reperfusión (IRI) es un daño celular provocado a un tejido u órgano cuando el suministro de sangre regresa al tejido después de un período de isquemia. La ausencia de oxígeno en sangre y nutrientes durante el período isquémico genera una afección en la cual la restauración de la circulación produce daño oxidativo, que incluye disfunción celular, apoptosis y necrosis.

La IRI puede tener lugar en cualquier tejido corporal como resultado de, entre otros, cirugía, heridas, traumatismo, obstrucciones, implantes y trasplantes.

Función retardada del injerto

La función retardada del injerto (DGF) es un factor de riesgo importante para afectar negativamente el resultado de trasplantes de órganos, incluido el trasplante renal como el trasplante renal de donantes fallecidos (DDRT, por sus siglas en inglés), particularmente en un receptor de riñón de un donante con criterios ampliados (ECD, por sus siglas en inglés) o de un donante con criterios estándar (SCD, por sus siglas en inglés) con fase de isquemia fría prolongada.

El análisis de más de 138.000 casos en la base de datos del Registro de trasplante renal de UNOS reveló que la supervivencia del injerto a largo plazo (>10 años) ha permanecido sin cambios a pesar de las mejoras en los índices de rechazo agudo a corto plazo (Takada M, et ál.; *Transplantation*. 15 dic 1997; 64(11):1520-5.). Uno de los principales factores que contribuyen a peores resultados a largo plazo, que incluye la escasa supervivencia del injerto identificada en esta revisión retrospectiva, fue DGF. La UNOS define la DGF como la necesidad de diálisis dentro de los primeros siete días luego del trasplante. La etiología de DGF no se comprende por completo pero, sin dudas, es multifactorial, donde la IRI al injerto generada directamente a partir del trasplante cumple una función central. IRI es un proceso independiente del antígeno que es un factor de riesgo fundamental para el desarrollo de disfunción crónica del aloinjerto, como se demostró en modelos animales (Goes N, et ál., *Transplantation*. 1995 27;59(4):565-72; Kusaka M, et ál., *Transplantation*. 1999 67(9):1255-61; Takada M, et ál.; *Transplantation*. 1997 64(11):1520-5). Las afecciones isquémicas provocadas por un menor flujo sanguíneo local en los riñones durante el almacenamiento en frío antes del trasplante seguido de estrés oxidativo después de la restauración del suministro sanguíneo después del trasplante inician una cadena de eventos que pueden conllevar lesión tubular aguda. La disfunción celular tubular renal y la muerte celular apoptótica son los rasgos distintivos de este proceso (Oberbauer R, et ál. *J Am Soc Nephrol*. 1999 10(9):2006-13; Giral-Classe M, et ál. *Kidney Int*. 1998 54(3):972-8).

Debido a la creciente disparidad entre la cantidad de personas esperando trasplante y de órganos de donantes disponibles, ha aumentado el uso de riñones de donantes con criterios ampliados (ECD) (Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN), Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR). 2008 OPTN/Informe anual de SRTR: Datos de trasplante 1998-2007 [Internet]. Richmond (VA): Health Resources and Services Administration's Division of Transplantation (HRSA)/EUA Department of Health & Human Services; 7 oct 2009 [citado abr 2010]).

Las patentes estadounidenses números 6,593,353; 6,982,277; 7,008,956 y 7,012,087 se refieren a la inhibición temporal de p53 para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades y trastornos.

La publicación de solicitud de patente estadounidense número 2006/0069056 al cesionario de la presente solicitud se refiere a moléculas de p53 interferentes cortas y métodos de uso.

La patente estadounidense número 7,910,566 y 8,148,342 al cesionario de la presente solicitud se refiere a métodos para tratar la lesión aguda del riñón (AKI, por sus siglas en inglés) y disfunción renal aguda (ARF, por sus siglas en inglés), respectivamente, con moléculas de p53 interferentes cortas.

El documento WO 2010/144336 otorgada al cesionario de la presente solicitud se refiere a un método para tratar a un sujeto con enfermedad crónica del riñón (CKD, por sus siglas en inglés) generada por exposición a una lesión renal recurrente con un inhibidor de p53.

El documento US 2009/0105173 A1 se refiere a un compuesto de cadena doble, preferiblemente un oligorribonucleótido, que regula por disminución la expresión de un gen p53 humano.

La publicación de solicitud de patente estadounidense número US 2010/0222409 y la patente europea número EP 2170403 otorgada al cesionario de la presente solicitud se refieren a un método para reducir la función retardada del injerto (DGF) en un receptor de trasplante de riñón de un donante fallecido usando un compuesto de ARN de cadena doble para regular por disminución la expresión de un gen p53.

La solicitud de patente PCT número PCT/US2013/059349, otorgada al cesionario de la presente solicitud, proporciona compuestos de ácido nucleico de cadena doble modificados para regular por disminución la expresión de un gen p53.

Sigue existiendo una necesidad no satisfecha de un método de prevención o atenuación de lesión por isquemia-reperfusión en órganos naturales y de donantes.

Compendio de la invención

La presente divulgación se basa, parcialmente, en el hallazgo sorprendente y clínicamente significativo de que los receptores de riñones de donantes fallecidos de 35 años de edad o más, en donde los receptores son tratados con un inhibidor de p53 temporal, muestran una mejora superior en el resultado clínico en comparación con los receptores de riñones de donantes fallecidos más jóvenes y con los pacientes no tratados. Los inventores de la presente, además, han descubierto que los inhibidores temporales del gen p53 son más eficaces para proporcionar profilaxis de DGF en un riñón de más de 30 años de edad (por ejemplo, más de alrededor de 35 años de edad, o más de alrededor de 40, 45 o 50 años de edad) y que incluyen riñones tanto de donantes con criterios ampliados (ECD) como de donantes con criterios estándar (SCD). De manera adicional, el tratamiento de receptores de riñones de donantes fallecidos con un inhibidor de p53 temporal genera la reducción de la cantidad y duración de diálisis postransplante en comparación con los receptores no tratados.

Las realizaciones de la invención se describen en la memoria descriptiva que figura más adelante y en las reivindicaciones adjuntas.

El asunto objeto de la presente invención es un inhibidor temporal de un gen p53 para uso en la profilaxis de lesión por isquemia-reperfusión (IRI) en un riñón en riesgo de IRI, de acuerdo con la reivindicación 1. La profilaxis de IRI proporciona profilaxis de la lesión renal aguda (AKI). El inhibidor temporal es para administrar a un sujeto de 35 años o más que posee el riñón con riesgo de IRI, en el que el riñón con riesgo es un órgano natural del sujeto y nunca se ha extraído del cuerpo del sujeto. Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones particulares de las mismas.

De acuerdo con una realización específica de acuerdo con la presente invención, el inhibidor es un ácido ribonucleico interferente pequeño (ARNip) sintético que tiene la estructura:

5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3' (cadena antisentido) (SEQ ID NO: 37)

3' ACUUCCCACUUUAAGAG 5' (cadena en sentido) (SEQ ID NO: 36)

en donde cada uno de A, C, U y G es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une al próximo ribonucleótido mediante un enlace covalente; y

en donde los ribonucleótidos alternados tanto en la cadena antisentido como en la cadena en sentido son ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-metilo y un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo está presente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la cadena antisentido y un ribonucleótido no modificado está presente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la cadena en sentido.

De acuerdo con las otras realizaciones específicas de acuerdo con la presente invención, el inhibidor es un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) seleccionado de:

| Compuesto de ARNdc | En sentido (N')y | Antisentido (N)x |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| TPS3_13_S2275 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> CU <u>A</u> CU-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuU <u>CC</u> <u>A</u> U <u>AG</u> GU <u>U</u> G-C3;C3-pi |
| TP53_13_S2276 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> CU <u>A</u> CU-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuU <u>CC</u> <u>A</u> U <u>AG</u> GU <u>U</u> G-C3;C3-pi |
| TP53_13_52277 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> cuacu-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuU <u>CC</u> <u>A</u> U <u>AG</u> GU <u>U</u> G-C3;C3-pi |
| TP53_13_S2278 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> cuacu-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuU <u>CC</u> <u>A</u> U <u>AG</u> GU <u>U</u> G-C3;C3-pi |
| TP53_41_S709 | GACUCAGACUGACAUUCUU-dTdT\$ | AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT\$ |

| Compuesto de | En sentido (N')y | Antisentido (N)x |
|---------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|
| ARNdc | 5->3 | 5->3 |
| TP53_41_S2279 | C3-GACUCAGACUGA <u>CAUUCU</u> U-C3-pi | 5'phos-AAGAA <u>UgUCAGUCUGAGUC</u> -C3;C3-pi |
| TP53_41_S2298 | C3-GACUCAGACUGAC <u>Auucuu</u> -C3-pi | 5' phos-AAGAA <u>UgUCAGUCUGAGUC</u> -C3;C3-pi |
| TP53_41_82299 | C3-GACUCAGACUGAC <u>Auucuu</u> -C3-pi | 5' phos-AAGA-AUgUCAGUCUCAGUC-C3-C3-pi |
| TP53_41_S2300 | C3-GACUCAGACUGA <u>CAUUCU</u> U-C3-pi | 5' phos-AAGAAUgUCAGUCUGAGUC.C3;C3-pi |
| TP53_44_S2301 | C3-GGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi | 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3;C3-pi |
| TP53_44_52302 | C3-GGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi | 5' phos-AUCAGUeUGAGUCAGGCC-C3;C3-pi |
| TPS3_44_S2303 | C3-GGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi | 5' phos-AUCAGUcUGACUCACGCC-C3;C3-pi |
| TP53_44_S2304 | C3-GGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi | 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3;C3-pi |

en donde:

A, U, G, C - designa un ribonucleótido no modificado;

A, U, G, C - designa un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo;

5 **a, u, c, g** - designa un nucleótido unido a un nucleótido adyacente (5'>3') mediante un enlace de fosfato internucleotídico 2'-5';

C3 - designa 1,3-Propanodiol, mono(dihidrogenofosfato) también identificado como resto de protección 3-hidroxipropano-1-fosfato [CAS RN: 13507-42-1];

C3C3 - designa un resto de protección que consiste en dos moléculas consecutivas de C3;

dT - designa timidina;

10 dT\$ - designa timidina sin fosfato terminal;

pi - designa 3'- fosfato;

5'-phos - designa 5'- fosfato.

15 En algunos ejemplos del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, el riesgo de IRI en el órgano natural es impuesto por el cese temporal de flujo sanguíneo al órgano o por hipoxia global temporal del órgano. El cese temporal del flujo sanguíneo se debe, por ejemplo, al menos a uno de trombosis, vasoconstricción o presión en los vasos sanguíneos. Como se describe adicionalmente en el presente documento, el cese temporal del flujo sanguíneo puede deberse a la extirpación del órgano del cuerpo de un sujeto con un reimplante posterior.

20 La presente divulgación, en algunos ejemplos, se refiere a un órgano de más de alrededor de 30 o 34 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 35 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 36 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 37 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 38 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 39 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 40 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 41 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 42 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 43 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 44 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 44 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 46 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 47 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 48 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 49 años de edad; o un órgano de más de alrededor de 50 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 30 o 34 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 35 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 36 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 37 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 38 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 39 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 40 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 41 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 42 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 43 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 44 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 46 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 47 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 48 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 49 años de edad; o un órgano de donante de más de alrededor de 50 años de edad; o un donante con criterios ampliados (ECD) fallecido. En el presente documento se divultan además órganos que se han conservado en su totalidad mediante almacenamiento en frío después de ser extirpados del donante y antes del trasplante.

- En algunos ejemplos de la presente divulgación, el riñón de trasplante pertenece a un donante fallecido. De acuerdo con la presente invención, poner en contacto el riñón con el inhibidor temporal comprende administrarle el inhibidor temporal a un sujeto que posee el riñón en riesgo de padecer IRI. De acuerdo con la presente invención, el riñón que presenta riesgo es un órgano natural de un sujeto y nunca se ha extirpado del cuerpo del sujeto. Como se divulga adicionalmente en el presente documento, el órgano en riesgo puede haber sido reimplantado a un sujeto o trasplantado a un sujeto.
- En algunos ejemplos de la presente divulgación, el poner en contacto el órgano con el inhibidor temporal comprende poner en contacto el órgano con el inhibidor temporal ex vivo antes del trasplante o reimplante del órgano a un receptor.
- En algunas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, el sujeto que posee el riñón con riesgo de padecer IRI es de 45 años de edad o más.
- En algunas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, la profilaxis de IRI genera profilaxis de disfunción del órgano asociado con IRI. En algunos ejemplos de la presente divulgación, la profilaxis de IRI genera profilaxis de función retardada del injerto asociada con IRI.
- En algunos ejemplos divulgados aquí, el órgano se selecciona del grupo que consiste en un hígado, un páncreas, un corazón, un pulmón, un intestino, piel, un vaso sanguíneo, un cerebro, una retina, tejido compuesto, un vaso sanguíneo, un oído, una extremidad; o una parte de estos. En algunos ejemplos, el órgano es un pulmón o corazón. De acuerdo con la invención, el órgano es un riñón.
- En diversos ejemplos de la divulgación, el órgano es un injerto de riñón y en el que la profilaxis de IRI genera profilaxis de función retardada del injerto (DGF). La profilaxis de DGF genera reducción de la cantidad, intensidad y duración de soporte dialítico durante al menos los primeros 7 días después del trasplante en un paciente con enfermedad renal de etapa terminal (ESRD, por sus siglas en inglés) dependiente de diálisis que se someta a trasplante renal de un donante fallecido. En algunos ejemplos, la profilaxis de DGF genera al menos uno de intervalo de tiempo más prolongado entre el trasplante y el primer tratamiento con diálisis luego del trasplante, una duración promedio más corta de sesión de diálisis luego del trasplante inicial y un índice de filtración glomerular medido (mGFR) más alto al final del primer mes luego del trasplante.
- En algunos ejemplos de la presente divulgación, la profilaxis de IRI genera la reducción de la cantidad, intensidad y/o duración de soporte dialítico durante los primeros 30 días, primeros 60 días, primeros 120 días y hasta los primeros 180 días luego del trasplante en un paciente con enfermedad renal de etapa terminal (ESRD) dependiente de diálisis que se someta a trasplante renal de un donante fallecido.
- En diversos ejemplos de la presente divulgación, el órgano, por ejemplo un riñón se conserva por completo en almacenamiento en frío luego de la extirpación del donante y antes del implante en el receptor.
- En diversos ejemplos de la presente divulgación, el órgano, por ejemplo un riñón, se conserva mediante perfusión con máquina durante al menos una parte del tiempo luego de la extirpación del donante y antes del implante en el receptor.
- En algunos ejemplos de profilaxis de IRI en un riñón de donante, el método comprende además las etapas de (a) seleccionar a un receptor que posee un riñón de un donante con criterios ampliados, y (b) administrarle al receptor un inhibidor temporal de un gen p53 en una cantidad eficaz para proporcionar profilaxis de DGF en el receptor. En algunos ejemplos, el riñón es de un donante que no es un donante con criterios ampliados fallecido. En ejemplos alternativos, el riñón es de un donante de entre 50 y 59 años de edad (inclusive) que no presenta al menos dos de los siguientes: antecedentes de presión sanguínea alta, nivel de creatinina en suero terminal superior a 1,5 mg/dl, o causa cardiovascular de muerte cerebral. En algunos ejemplos, el riñón es de un donante que no tiene más de 60 años de edad.
- En realizaciones de la presente invención, la profilaxis de IRI proporciona la profilaxis de lesión aguda del riñón (AKI), donde la AKI se produce a partir de al menos una de cirugía cardiovascular, cirugía cardiopulmonar, cirugía renal, obstrucción ureteral aguda, shock, hipoxia global y/o exposición a una nefrotoxina.
- Se divulga aquí además un método de profilaxis de lesión por isquemia-reperfusión (IRI) en un riñón de donante de un donante fallecido, que comprende poner en contacto el riñón con un inhibidor temporal de p53 en una cantidad eficaz para proporcionar profilaxis de IRI en el riñón. Además, se divulga un inhibidor temporal de p53 para su uso en la profilaxis de lesión por isquemia-reperfusión (IRI) en un riñón de donante de un donante fallecido, donde el inhibidor tiene el objetivo de entrar en contacto con el riñón. Además, se divulga el uso de un inhibidor temporal de un gen p53 para la elaboración de un medicamento para proporcionar profilaxis de lesión por isquemia-reperfusión (IRI) en un riñón de donante de un donante fallecido, donde el inhibidor tiene el objetivo de entrar en contacto con el riñón.
- En algunos ejemplos de la presente divulgación, la profilaxis de IRI genera la reducción de la cantidad, intensidad y duración de soporte dialítico durante los primeros 180 días luego del trasplante en un paciente con enfermedad renal de etapa terminal (ESRD) dependiente de diálisis que se someta a trasplante renal de un donante fallecido.
- En algunos ejemplos divulgados aquí, el inhibidor temporal de un gen p53 se selecciona del grupo que consiste en

- una molécula orgánica pequeña, una proteína, un anticuerpo o fragmento de este, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético y una molécula de ácido nucleico; o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de estos. El inhibidor temporal de un gen p53 puede ser una molécula de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en un ácido nucleico antisentido de cadena simple (ANcs), un AN de cadena doble (ANcd), un AN interferente pequeño (ANip), un AN de horquilla pequeña (ANhp), un micro ARN (miARN), un aptámero, y una ribozima, o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de estos. La molécula de ácido nucleico puede modificarse o modificarse por medios químicos. En algunos ejemplos de inhibidores divulgados aquí, la molécula de ácido nucleico es un ANcs o un ANcd, que comprende uno o más de un nucleótido modificado, un nucleótido no modificado, un análogo de nucleótido y un resto no convencional.
- 5 En algunos ejemplos preferidos de los inhibidores divulgados aquí, el ANcd se selecciona del grupo que consiste en un ANcd no modificado o un ANcd modificado por medios químicos; o una sal o profármaco de estos. En algunos ejemplos, el ANcd comprende una cadena antisentido que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que se establece en la Tabla 2 (SEQ ID NOS:21-33, 35, 37). En diversos ejemplos, el ANcd comprende una secuencia de cadena antisentido 5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3' y una secuencia de cadena en sentido 5' 15 GAGAAUAUUUCACCCUCA 3'.
- En algunas realizaciones específicas del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, la molécula de ANcd es un ácido ribonucleico interferente pequeño (ARNip) sintético que tiene la estructura:
- 5'UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3' (cadena antisentido) (SEQ ID NO: 37)
- 3' ACUUCCCACUUUAAGAG 5' (cadena en sentido) (SEQ ID NO: 36)
- 20 en donde cada uno de A, C, U y G es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido mediante un enlace covalente; y
- en donde los ribonucleótidos alternados en la cadena antisentido y la cadena en sentido son ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-metilo y un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo está presente en el extremo 25 5' y en el extremo 3' de la cadena antisentido y un ribonucleótido no modificado está presente en el extremo 5' y en el extremo 3' de la cadena en sentido. El ANcd puede estar fosforilado en el extremo o no fosforilado en uno o más de los extremos 5' y/o extremos 3'. En algunas realizaciones, el ANcd no está fosforilado en los extremos 5' y extremos 3'. La molécula de ANcd se encuentra preferentemente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de sodio.
- 30 En diversas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención divulgadas anteriormente, la profilaxis de lesión por IR proporciona profilaxis de TR cuando el inhibidor temporal de un gen p53 se administra a una dosis de alrededor de 1,0 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg, preferentemente alrededor de 10 mg/kg.
- En algunas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, el inhibidor temporal de un gen p53 se formula como una composición. En algunas realizaciones, el inhibidor temporal se puede administrar como una composición líquida que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 En algunas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, la composición comprende además un resto que se dirige a las células. El resto que se dirige a las células puede unirse covalente o no covalentemente al inhibidor temporal de un gen p53.
- En algunas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, el inhibidor temporal se le administra al receptor como una composición inyectable que comprende un excipiente acuoso farmacológicamente aceptable. El inhibidor temporal se puede administrar mediante inyección intravenosa (IV). La inyección intravenosa (IV) se administra en un único tratamiento, que puede ser una única dosis o múltiples dosis. En algunas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, el tratamiento único es una única dosis o múltiples dosis, preferentemente una única dosis. El tratamiento único es, por ejemplo, una única inyección intravenosa (IVP).
- 40 45 En algunos ejemplos de la presente divulgación, la inyección intravenosa (IV) se administra por vía intraoperatoria luego del autoinjerto/reimplante o reperfusión del aloinjerto/trasplante. La inyección intravenosa (IV) se administra directamente en un puerto proximal de una línea venosa central o mediante una línea periférica.
- El modo de administración y la dosis del inhibidor temporal los determina el médico tratante o el personal del hospital y se decidirá de acuerdo con varios factores que incluyen el órgano, la indicación, el estado de salud general y la edad del sujeto. En algunas realizaciones, el inhibidor temporal se administra por vía sistémica, subcutánea, tópica, mediante inhalación, mediante instilación (pulmones). Según cuál sea el órgano diana, el inhibidor temporal puede conjugarse o formularse, por ejemplo, en liposomas, lipoplejos, micropartículas o nanopartículas.
- 50 55 En algunos ejemplos de la presente divulgación, en donde el receptor recibió un órgano de un donante, al receptor se le administra además una medicación que se selecciona del grupo que consiste en un agente antiviral, un agente antifúngico, un agente antimicrobiano, un agente inmunosupresor, y cualquier combinación de estos. En algunos ejemplos, la medicación es un agente inmunosupresor que es un inhibidor de calcineurina. En varias realizaciones, el

5 agente inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en tacrolimus (TAC), micofenolato mofetil (MMF), ácido micofenólico (MPA), un corticoesteroide, una cicloesporina, una azatioprina, un sirolimus, y cualquier combinación de estos. En algunos ejemplos, el agente inmunosupresor es tacrolimus (TAC). Al receptor se le puede administrar además un agente terapéutico de inducción de anticuerpos, por ejemplo, por vía perioperatoria y antes de la reperfusión del trasplante. En varios ejemplos, el agente terapéutico de inducción de anticuerpos comprende una globulina anti-timocito (ATG, por sus siglas en inglés) policlonal o un anticuerpo monoclonal anti-CD25 (anti-IL-2R).

10 En algunas realizaciones del inhibidor para uso de acuerdo con la presente invención, el inhibidor está presente en un kit que comprende el inhibidor e instrucciones de uso. Por ejemplo, el inhibidor está presente dentro de un recipiente en forma líquida o sólida. El kit puede incluir además un diluyente y/o un medio para administración, por ejemplo, una jeringa.

15 Se divulga además aquí un inhibidor de un gen p53 para su uso en profilaxis de función retardada del injerto en un receptor de un trasplante de riñón, donde el receptor recibió el riñón de un donante con un índice de riesgo de donante de riñón (KDRI, por sus siglas en inglés) de al menos 1,25. Se divulga además aquí el uso de un inhibidor de un gen p53 para la elaboración de un medicamento para proporcionar profilaxis de DGF en un receptor de un trasplante de riñón, donde el receptor recibió el riñón de un donante con un índice de riesgo de donante de riñón (KDRI) de al menos 1,25.

20 En algunos ejemplos, el riñón es de un donante con un KDRI de al menos 1,50, al menos 1,75, al menos 2,0, o incluso al menos 2,5. En algunas realizaciones, el riñón es de un donante con un KDRI en el intervalo de 1,25 a 1,50, 1,5-175, 1,75-2,0, 2,0-2,5 o incluso 2,5-3,0.

25 20 En algunos ejemplos, el riñón es de un donante con un índice de perfil de donante de riñón (KDPI) de al menos 70 %. En algunas realizaciones, el KDPI es superior al 75 %, superior al 80 % o incluso superior al 85 %.

En algunos ejemplos, el riñón de donante fallecido es conservado por completo en almacenamiento en frío luego de la extirpación del donante y antes del implante en el receptor.

25 25 En algunos ejemplos, el riñón de donante fallecido se conserva mediante perfusión con máquina durante al menos una parte del tiempo luego de la extirpación del donante y antes del implante en el receptor.

En algunos ejemplos, los resultados de la profilaxis de la función retardada del injerto comprenden al menos uno de período prolongado hasta primera diálisis luego del trasplante, menor cantidad y duración promedio de diálisis luego del trasplante y mejor índice de filtración glomerular medido (mGFR) durante el primer mes luego del trasplante.

En algunos ejemplos, el donante ECD fallecido tiene al menos alrededor de 60 años de edad.

30 30 En algunos ejemplos, el donante ECD fallecido tiene al menos alrededor de 50 años de edad, donde el donante tiene al menos dos afecciones que se seleccionan del grupo que consiste en antecedentes de hipertensión, nivel de creatinina en suero terminal por encima de alrededor de 1,5 mg/dL y accidente cardiovascular como causa de muerte.

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva, incluidas las definiciones.

40 40 Según se utilizan en la presente, se debe considerar que los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene", y las variantes gramaticales de estos, especifican las características, los números enteros, las etapas o los componentes que se establecen, pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos adicionales de estos. Los términos abarcan los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

Tal como se usan en la presente, los términos "un" y "una" significan "al menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto claramente especifique de otro modo.

45 45 Como se usa en la presente, el término "donante con criterios ampliados (ECD)" se refiere a un donante de riñón de más de 60 años de edad, o un donante entre las edades de 50 y 59 (inclusive) con al menos dos de los siguientes: antecedentes de presión sanguínea alta, nivel de creatinina en suero terminal superior a 1,5 mg/dl, o causa cerebrovascular de muerte cerebral.

50 50 Como se usa en la presente, el "donante con criterios estándar (SCD)" es un donante de menos de 50 años de edad y que padeció muerte cerebral debido a diversas causas. Esto incluiría los donantes menores de 50 años de edad que padecen lesiones traumáticas u otros problemas médicos como apoplejía. Los donantes pediátricos se consideran donantes con criterios estándar; o un donante de entre 50 y 59 (inclusive) años de edad sin dos o más de los siguientes: antecedentes de presión sanguínea alta, nivel de creatinina en suero terminal superior a 1,5 mg/dl, o causa cerebrovascular de muerte cerebral.

Como se usa en la presente, el término "función retardada del injerto (DGF)" se refiere a la necesidad de soporte dialítico dentro de los 7 días luego de la transferencia del riñón, con exclusión de aloinjertos que fallan dentro de las

24 horas luego del trasplante.

Como se usa en la presente, el término "perfil de riesgo de donante de riñón (KDRI)" se refiere al riesgo relativo de falla de injerto de riñón luego del trasplante (en promedio, receptor adulto) de un donante fallecido particular en comparación con el donante medio (50° percentil), como lo define la U.S Organ Procurement and Transplantation Network en http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/Kidney_Proposal_FAQ.pdf

Como se usa en la presente, el término "índice de perfil de donante de riñón (KDPI)" se refiere al riesgo de falla del injerto después del trasplante de riñón, como lo define la U.S Organ Procurement and Transplantation Network en http://optn.transplant.hrsa.gov/ContentDocuments/Kidney_Proposal_FAQ.pdf

Como se usa en la presente, el término "profilaxis" de DGF se refiere a la prevención o reducción de la intensidad y duración de soporte dialítico, que se manifiesta, por ejemplo, como un mayor intervalo de tiempo entre el trasplante y el primer tratamiento con diálisis luego del trasplante, menor duración promedio de la sesión de diálisis inicial luego del trasplante o índice de filtración glomerular medido más alto al final del primer mes luego del trasplante.

Como se usa en la presente, a menos que se especifique de otro modo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto o una molécula (es decir, inhibidor temporal) es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o el manejo de trastornos asociados con una mayor expresión de p53 o retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con trastornos asociados con una mayor expresión de p53.

Como se usa en la presente, a menos que se especifique de otro modo, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto (es decir, inhibidor) es una cantidad suficiente para prevenir, retrasar el inicio o reducir la gravedad de trastornos asociados con una mayor expresión de p53, o uno o más síntomas asociados con trastornos asociados con una mayor expresión de p53 o prevenir o retrasar su recurrencia.

Como se usa en la presente, el término "almacenamiento en frío" se refiere al almacenamiento a una temperatura de alrededor de 0 °C o menos, por ejemplo, almacenamiento en hielo. Dicho almacenamiento reduce el índice de consumo de energía, por ejemplo, por parte del órgano.

Como se usa en la presente, la expresión "perfusión con máquina" se refiere al almacenamiento por debajo de la temperatura corporal normal, junto con circulación impulsada por bomba de una solución de conservación mediante los vasos sanguíneos del riñón. Dicha perfusión ayuda a sostener o reponer las existencias de energía intracelular residual, a la vez que reduce el índice en el que se consumen.

Un "órgano de 35 años de edad o más" se refiere a un órgano corporal como un riñón, un hígado, un páncreas, un corazón, un pulmón, un intestino, piel, un vaso sanguíneo, un cerebro, una retina, tejido compuesto, un vaso sanguíneo, un oído, una extremidad; o una parte de estos, presente en su hospedador natural, reimplantado en su hospedador natural, extraído de un donante, o trasplantado en un receptor, donde la edad se contabiliza desde el nacimiento del hospedador o el donante. De acuerdo con la presente invención, el órgano es un riñón presente en su hospedador natural y que nunca ha sido extraído de su hospedador natural.

Un "método de profilaxis de lesión por isquemia-reperfusión (IRI)" se refiere a prevenir, atenuar o reducir el daño provocado por IRI, por ejemplo, prevenir, atenuar o reducir la muerte celular y/o apoptosis y/o necrosis y/o estrés oxidativo.

Como se usa en la presente, "un órgano que tiene riesgo de padecer IRI" se refiere a un órgano que experimenta cese temporal del flujo sanguíneo o hipoxia global temporal. En un ejemplo no taxativo, un cese temporal del flujo sanguíneo puede deberse a trombosis, vasoconstricción y presión en los vasos sanguíneos por cualquier razón o la extirpación del órgano del cuerpo con posterior reimplante o trasplante. De acuerdo con la presente invención, el órgano es un riñón presente en su hospedador natural y que nunca ha sido extraído de su hospedador natural.

Como se usa en la presente, "función retardada del injerto" o "DGF" se refiere a la disfunción del órgano luego del trasplante del órgano. Al referirse a un trasplante renal, de acuerdo con UNOS, DGF se define como el requisito de diálisis dentro de los primeros 7 días luego del trasplante.

Como se usa en la presente, el término "profilaxis" de DGF, al referirse a un trasplante renal, se refiere a la prevención o reducción de la frecuencia y/o duración de soporte dialítico, que se manifiesta, por ejemplo, como un mayor intervalo de tiempo entre el trasplante y el primer tratamiento con diálisis luego del trasplante, menor duración promedio de la sesión de diálisis inicial luego del trasplante o índice de filtración glomerular medido más alto al final del primer mes luego del trasplante.

50 Inhibidores temporales de p53

Los inhibidores temporales de p53 tienen el objetivo de reducir la expresión o función de un gen p53 durante un período de tiempo suficiente para provocar un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, en un órgano o en un sujeto, sin aumentar el riesgo de crecimiento canceroso. Se divulga un método de inhibición temporal de p53, entre otras cosas, en las patentes estadounidenses números 6,593,353; 6,982,277; 7,008,956 y 7,012,087.

Como se usa en la presente, el término "inhibidor" se refiere a un compuesto, que puede reducir (parcial o completamente) la expresión de un gen o la actividad de un producto de dicho gen (mARN, proteína) hasta un grado suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado. Por ejemplo, se puede reducir la expresión hasta 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o menos que lo que se observa en ausencia de un inhibidor.

5 Preferentemente, el inhibidor es un inhibidor temporal que reduce de forma reversible la expresión o actividad de p53.

Un inhibidor "temporal" de p53 se refiere a una molécula que provoca su efecto durante hasta 24 horas, hasta 36 horas, hasta 48 horas, hasta 72 horas, hasta 96 horas, hasta 120 horas o no más de 120 horas, 7 días, 10 días, 20 días o 30 días.

10 Un inhibidor de un "gen p53" puede ser una molécula orgánica pequeña, una proteína, un anticuerpo o fragmento de este, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético o una molécula de ácido nucleico; o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de estos.

Una molécula orgánica pequeña puede ser, por ejemplo, pifitrina.

15 "Aptámero de ácido nucleico", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana, donde la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia que comprende una secuencia reconocida por la molécula diana, preferentemente *in vivo*. La molécula diana puede ser cualquier molécula de interés. Por ejemplo, el aptámero se puede usar para unirse a un dominio de unión al ligando de una proteína, mediante lo cual se evita la interacción del ligando de origen natural con la proteína.

20 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 enteros o fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión al antígeno, por ejemplo, anticuerpos sin la parte Fc, anticuerpos de cadena simple, minianticuerpos, fragmentos que consisten esencialmente solamente en el dominio de unión al antígeno variable del anticuerpo, etc. El término "anticuerpo" también puede referirse a anticuerpos contra secuencias de polinucleótidos obtenidas mediante vacunación con ADNc. El término también comprende fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse de manera selectiva a sus antígenos, por ejemplo, un producto del gen p53, y se ejemplifican de la siguiente manera, entre otros:

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

30 (2) (Fab')2, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo entero con la enzima pepsina sin reducción posterior; (Fab')2 es un dímero de dos fragmentos Fab que se mantienen unidos mediante dos enlaces disulfuro;

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

35 (4) Anticuerpo de cadena simple (SCA, por sus siglas en inglés), definido como molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada unida mediante un enlazador de polipéptido adecuado como molécula de cadena simple fusionada genéticamente, que incluye un scFv.

Se puede realizar injerto de CDR para modificar determinadas propiedades de la molécula de anticuerpo que incluye afinidad o especificidad. Un ejemplo no taxativo del injerto de CDR se divulga en la patente estadounidense número 5,225,539.

40 Los anticuerpos de dominio simple se aíslan de los anticuerpos de cadena pesada exclusivos de camélidos inmunizados, que incluyen camellos y llamas. Los anticuerpos pequeños son muy fuertes y se unen al antígeno con afinidad alta en estado monomérico. La patente estadounidense 6838254 describe la producción de anticuerpos o fragmentos de estos obtenidos de inmunoglobulinas de cadena pesada de camélidos.

45 Un anticuerpo monoclonal (mAb) es una población sustancialmente homogénea de anticuerpos de un antígeno específico, y es conocido en la técnica. Los anticuerpos monoclonales se obtienen mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

50 Un mAb puede ser de cualquier clase de inmunoglobulinas, inclusive IgG, IgM, IgE, IgA y cualquier subclase de estas. Un hibridoma que produce un mAb se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. Se obtienen titulaciones elevadas de mAb *in vivo*, por ejemplo, donde las células de los hibridomas individuales se inyectan por vía intraperitoneal en ratones Balb/c sensibilizados con pristina para producir fluido ascitis con concentraciones altas de los mAb deseados. Los mAb de isotipo IgM o IgG se pueden purificar de dicho fluido ascitis, o de sobrenadantes de cultivo, usando métodos de cromatografía en columna conocidos por los expertos en la técnica.

"Afinidad de unión específica" significa que el anticuerpo se une a un polipéptido de p53 o fragmento de este con mayor afinidad de lo que se une a otro polipéptido en condiciones similares.

- El término "epítopo" se refiere a la parte de una molécula que puede unirse con un anticuerpo que también puede ser reconocida por dicho anticuerpo. Un "antígeno" es una molécula o una parte de una molécula que puede unirse con un anticuerpo que también puede inducir a un animal a que produzca un anticuerpo que pueda unirse a un epítopo de dicho antígeno. Un antígeno puede tener uno o más de un epítopo. La reacción específica mencionada anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará, de manera muy selectiva, con su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de otros anticuerpos suscitados por otros antígenos.
- 5 Los epítopos o determinantes antigenicos generalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas como cadenas laterales de azúcar o aminoácidos y tienen características estructurales tridimensionales específicas y características de carga específicas.
- 10 El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en humanos. Los expertos en la técnica conocen métodos para humanizar anticuerpos.
- 15 Un mAb o fragmento, quimera o anticuerpo humanizado de este se pueden usar como inhibidor del producto del gen p53, por sí mismos, o se pueden usar para conjugarse con un inhibidor temporal de un gen p53. Cuando se conjuga con un inhibidor temporal de un gen p53, el anticuerpo puede ser útil para dirigirse a un órgano con riesgo de padecer IRI.
- 20 Como se usa en la presente, el término "péptido" se usa en sentido general para referirse a péptidos, proteínas, fragmentos de proteínas y similares. Un experto en la técnica reconocerá que los péptidos divulgados en la presente se pueden sintetizar como miméticos de péptido. Un mimético de péptido o "peptidomimético" es una molécula que imita la actividad biológica de un péptido pero no es completamente peptídico en la naturaleza. El término "peptidomimético", como se usa en la presente, se refiere a una molécula similar a un péptido que presenta la actividad del péptido en el que se basa estructuralmente. Dichos peptidomiméticos incluyen péptidos químicamente modificados, moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos de origen no natural, y péptidos y presentan actividad tal como actividad de diana selectiva del péptido del cual deriva el peptidomimético. Un peptidomimético puede incluir análogos de aminoácidos y puede ser una molécula similar a un péptido que contiene, por ejemplo, un isósteros de enlace amida tal como una modificación retroinversa; enlace amida reducido; enlace metilentioéter o metilensulfóxido; enlace metilenéter; enlace etileno; enlace tioamida; enlace trans-olefina o fluoroolefina; anillo tetrazol 1,5-disustituido; enlace cetometilen o fluorocetometilen u otro isósteros de amida. Un experto en la técnica entiende que estos y otros peptidomiméticos están comprendidos en el significado del término "peptidomimético", como se usa en la presente. Un péptido, proteína o fragmento de estos se pueden usar como inhibidor del producto del gen p53, por sí mismos, o se pueden usar para conjugarse con un inhibidor temporal de un gen p53. Cuando se conjuga con un inhibidor temporal de un gen p53, el péptido puede ser útil para facilitar el suministro del inhibidor a un órgano con riesgo de padecer IRI.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- Como se usa en la presente, una "composición" o "composición terapéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos con otros componentes, tales como portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables. El objetivo de una composición terapéutica es facilitar la administración de un ingrediente activo a un sujeto.
- El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o un diluyente que no causa irritación significativa a un sujeto y no abolir sustancialmente la actividad y las propiedades de los ingredientes activos administrados. En estas frases se incluye un adyuvante. El término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte agregada a una composición terapéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo.
- Las composiciones terapéuticas usadas en la implementación de las indicaciones de la presente se pueden formular usando técnicas conocidas por el experto en la técnica de manera convencional usando uno o más portadores farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, lo que facilita el procesamiento de los ingredientes activos en una composición terapéutica y generalmente incluye la mezcla de una cantidad de los ingredientes activos con los otros componentes. Las técnicas adecuadas se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas útiles en la implementación de las indicaciones de la presente se pueden elaborar mediante uno o más procesos conocidos en la técnica, por ejemplo, procesos de mezcla, combinación, homogeneización, disolución, granulación, emulsificación, encapsulamiento, atrapamiento y liofilización.
- Las composiciones terapéuticas adecuadas para la implementación de las indicaciones de la presente incluyen composiciones que comprenden ingredientes activos en una cantidad eficaz para lograr el objetivo deseado (una cantidad terapéuticamente eficaz). La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, se calcula inicialmente a partir de modelos animales.
- 55 La ley federal requiere que un organismo del gobierno federal apruebe el uso de composiciones farmacéuticas en la terapia de humanos. En Estados Unidos, el cumplimiento es responsabilidad de la Administración de alimentos y fármacos que emite regulaciones apropiadas para garantizar dicha aprobación, detallada en el título 21 del U.S.C., artículos 301-392. Para la mayoría de los países se requiere una aprobación similar. Las regulaciones varían entre

países, pero los procedimientos individuales son conocidos por los expertos en la técnica y las composiciones y los métodos proporcionados en la presente preferentemente cumplen con lo estipulado.

Breve descripción de las figuras

5 Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente con referencia a las figuras adjuntas. La descripción, junto con las figuras, hace que sea evidente para un experto en la técnica la forma en que pueden llevarse a la práctica algunas realizaciones de la invención.

En las figuras:

La Figura 1 es una gráfica que muestran niveles proteicos de activación de p53 inducida por isquemia en riñones de ratas donantes jóvenes y de edad avanzada.

10 Las Figuras 2a y 2b son gráficas lineales que muestran el período de tiempo de valoración secundaria hasta la primera diálisis luego del trasplante en población de mITT(EE) (Figura 2a) y en la capa de ECD/CS (Figura 2b).

La Figura 3 muestra una gráfica de Forest que demuestra el impacto del tratamiento con QPI-1002 en DGF con respecto a la reducción del riesgo en receptores de injerto por tipo de riñón de donante.

Descripción de algunas realizaciones de la invención

15 En la presente se proporcionan compuestos y composiciones que inhiben temporalmente el gen p53, y el uso de dichos compuestos para profilaxis de IRI en órganos, una reducción de la cantidad y duración de diálisis en receptores de trasplante de riñón de donante fallecido y para la prevención de la función retardada del injerto (DGF) en receptores de riñones de donantes con criterios ampliados (ECD).

Inhibidores temporales de p53

20 Los inhibidores temporales de p53 tienen el objetivo de reducir la expresión o función de un gen p53 durante un período de tiempo suficiente para provocar un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, en un órgano o en un sujeto, sin aumentar el riesgo de crecimiento canceroso. Se divulga un método de inhibición temporal de p53, entre otras cosas, en las patentes estadounidenses números 6,593,353; 6,982,277; 7,008,956 y 7,012,087.

25 Como se usa en la presente, el término "inhibidor" se refiere a un compuesto, que puede reducir (parcial o completamente) la expresión de un gen o la actividad de un producto de dicho gen (mARN, proteína) hasta un grado suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado. Por ejemplo, se puede reducir la expresión hasta 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o menos que lo que se observa en ausencia de un inhibidor. Preferentemente, el inhibidor es un inhibidor temporal que reduce de forma reversible la expresión o actividad de p53.

30 Un inhibidor "temporal" de p53 se refiere a una molécula que provoca su efecto durante hasta 24 horas, hasta 36 horas, hasta 48 horas, hasta 72 horas, hasta 96 horas, hasta 120 horas o no más de 30 días.

Un inhibidor de un "gen p53" puede ser una molécula orgánica pequeña, una proteína, un anticuerpo o fragmento de este, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético o una molécula de ácido nucleico; o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de estos.

Una molécula orgánica pequeña puede ser, por ejemplo, pifitrina.

35 Un inhibidor del gen p53 puede ser un "aptámero", que son moléculas de ácido nucleico o péptido que se unen a una molécula diana de proteína específica (ver, por ejemplo, los documentos de patente: Sundaram, et ál., Eu. J. Pharm. Sci. 2013, 48:259-271; WO 1992/014843 patentes estadounidenses números 5,861,254; 5,756,291; 6,376,190).

Los aptámeros se pueden usar para inhibir los genes diana o para dirigirse a otros inhibidores de células u órganos diana específicos (ver, por ejemplo, US 2006/0105975).

40 Los aptámeros pretenden incluir "aptámeros de oligonucleótido tiofosfato", "tioaptámeros" o "TA", que son una clase de ligando que difiere estructuralmente de ARN y ADN que puede unirse a proteínas con afinidad elevada (nM). Los TA también se pueden usar para inhibir los genes diana o como restos diana, por sí mismos.

45 En determinados ejemplos, los compuestos que regulan por disminución o inhiben la expresión del gen p53 son moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas antisentido, ácido nucleico interferente corto (ANic), ARN interferente corto (ARNip), AN de cadena doble (ANcd), micro ARN (miARN) o ARN de horquilla corta (ARNhc)) que se unen a una secuencia de nucleótidos (tal como una secuencia de mARN) o una parte de esta, que codifica p53, por ejemplo, la secuencia que codifica mARN (SEQ ID NO:1-7) para p53 humano, que codifica una o más proteínas o subunidades de proteína. En diversos ejemplos, la molécula de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en compuesto de ANcd no modificado o modificado químicamente, tal como ARNcd, ARNip o ARNh, que regula por disminución la expresión de un gen p53.

En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico es un compuesto de ARN de cadena doble (ARNcd) no modificado y sintético que regula por disminución la expresión de p53.

En algunos ejemplos preferidos, la molécula de ácido nucleico es un compuesto de ARN de cadena doble (ARNcd) modificado químicamente y sintético que regula por disminución la expresión de p53. En determinados ejemplos preferidos, "p53" se refiere al gen p53 humano. En determinados ejemplos preferidos, "gen diana" se refiere al gen p53 humano.

Las moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente y las composiciones proporcionadas en la presente exhiben propiedades beneficiosas, que incluyen al menos una de mayor estabilidad en suero, mejor absorción celular, menor actividad fuera de la diana, menor inmunogenicidad, mejor liberación endosómica, mejor suministro específico al tejido o célula diana y mayor actividad de inactivación/regulación por disminución en comparación con las moléculas de ácido nucleico no modificadas correspondientes.

Compuestos de ácidos nucleicos

En el contexto de la presente divulgación, las expresiones "compuesto de ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refieren a un oligómero (oligonucleótido) o polímero (polinucleótido) de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o una combinación de estos. Este término incluye compuestos que consisten en enlaces internucleósidos covalentes, azúcares y nucleobases de origen natural.

Un "ARNcd" es una molécula de ácido nucleico de cadena doble pequeña que incluye ARN y análogos de ARN. Un "ANcd" es una molécula de ácido nucleico de cadena doble pequeña que incluye ARN, nucleótidos modificados y/o nucleótidos no convencionales. Los términos ARNcd y ANcd se pueden usar de manera indistinta.

El término "ARNcd" se refiere a dos cadenas de ácidos polirribonucleicos antiparalelos que se mantienen unidos mediante emparejamiento de bases. Las dos cadenas pueden tener la misma extensión o extensiones distintas, siempre que haya suficiente homología de secuencia entre las dos cadenas de manera que se forme una estructura de cadena doble con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de complementariedad en toda la extensión. De acuerdo con un ejemplo, no existen excedentes de nucleótidos para la molécula de ARNcd. De acuerdo con otro ejemplo, la molécula de ARNcd comprende excedentes, que se pueden seleccionar de excedentes de nucleótidos, excedentes distintos de nucleótidos o una combinación de estos. De acuerdo con otros ejemplos, las cadenas se encuentran alineadas de manera que haya entre 1-10 bases, preferentemente entre 1-6 bases al menos al final de las cadenas, que no se alinean de manera que ocurra un excedente de 1-10 residuos en uno o ambos extremos del dúplex cuando se hibridan las cadenas.

En algunos ejemplos, el ARNcd en la presente solicitud tiene entre 15 y 100 pb, entre 15 y 50 pb, entre 15 y 40 pb, entre 15 y 30, o entre 15 y 25 pb.

En un ejemplo adicional, los extremos 5' y/o 3' de las cadenas sentido y/o antisentido del ARNcd comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más excedentes de nucleótido. En algunos ejemplos, el ARNcd comprende entre 1-6 excedentes de nucleótido en los extremos 5' y/o 3' de las cadenas sentido y/o antisentido. En otro ejemplo, los extremos del ARNcd son romos.

El término "ARNip" se refiere a ARNcd inhibidor pequeño (generalmente de entre 15-25 pb) que pueda interactuar con la maquinaria de interferencia del ARN (iARN) e inducir la vía de iARN. Comúnmente, ARNip se sintetizan químicamente como 15-25 mer, que comprenden preferentemente una región dúplex de 15-19 pb central con o sin excedentes 3' de 2 bases o más simétricos en los extremos.

Las cadenas de un ARN interferente de cadena doble (por ejemplo, ANip y ARNip) se pueden conectar para formar una estructura de horquilla o tallo-bucle (por ejemplo, ARNh). Por lo tanto, como se mencionó, el agente de silenciamiento de ARN de algunas realizaciones de la invención también puede ser un ARN de horquilla pequeña (ARNh).

El término "ARNh", como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y segunda región de secuencia de complementariedad, donde el grado de complementariedad y la orientación de las regiones son suficientes para que tenga lugar el emparejamiento de bases entre las regiones, donde la primera y segunda región son suficientes para que tenga lugar el emparejamiento de bases entre las regiones, donde la primera y segunda región se unen mediante una región de bucle, donde el bucle se genera a partir de la carencia de emparejamiento de bases entre los nucleótidos (o análogos de nucleótidos) dentro de la región de bucle.

Como se usa en la presente, la expresión "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que comprende al menos una modificación que puede ser una modificación de azúcar, una modificación de nucleobases o una modificación de enlace internucleótido (entre dicho nucleótido y un nucleótido consecutivo) o una combinación de estos. Dichos nucleótidos modificados se prefieren a menudo en comparación con las formas de origen natural debido a propiedades deseables como, por ejemplo, mejor absorción celular, mejor afinidad con una diana de ácido nucleico y mejor estabilidad de nucleobases.

Modificaciones de enlace internucleótido: El enlace internucleósido de origen natural que conforma la estructura principal del ARN y ADN es un enlace de fosfodiéster de 3' a 5'. Los compuestos de ácido nucleico de acuerdo con algunas realizaciones de la invención pueden comprender al menos un enlace internucleótido modificado (de origen no natural). Los enlaces internucleósidos modificados pueden incluir enlaces internucleósidos que conservan un átomo de fósforo y enlaces internucleósidos que no tienen un átomo de fósforo.

5 Los ejemplos no taxativos de enlaces internucleósidos modificados que contienen un átomo de fósforo allí incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros fosfonatos de alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquíleno, fosfonatos de 5'-alquíleno y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, fosfonoacetato (PACE) y tiofosfonoacetato, selenofosfatos y boranofosfatos con enlaces 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de estos y aquellos con polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleótidos son un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'.

10 Los ejemplos no taxativos de enlaces internucleótidos que no incluyen un átomo de fósforo allí incluyen enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo y heteroátomo mixtos, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados parcialmente a partir de la parte azúcar de un nucleósido); restos de siloxano; restos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; enlaces de formacetilo y tioformacetilo; enlaces de metileno formacetilo y tioformacetilo; enlaces de riboacetilo; enlaces que contienen alqueno; enlaces de sulfamato; enlaces de metilenimino y metilenhidracino; enlaces de sulfonato y sulfonamida; enlaces de amida; y otros enlaces con partes de los componentes N, O, S y CH₂ mixtos.

15 Los ejemplos no taxativos de enlaces internucleósidos de heteroátomo incluyen -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (conocido como enlace metileno (metilimino) o MMI), -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (donde el enlace internucleótido de fosfodiéster de origen natural se representa como -O-P(=O)(OH)-O-CH₂-).

20 25 Modificaciones de azúcar: Los restos de azúcar en compuestos de ácido nucleico divulgados en la presente pueden incluir resto de azúcar 2'-hidroxilpentofuranosilo sin modificaciones. De manera alternativa, los compuestos de ácido nucleico de la invención pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos o modificados de otro modo. Una posición preferida para un grupo de sustituyente de azúcar es la posición 2' que no se usa generalmente en el enlace internucleósido 3' a 5' natural. Otras posiciones preferidas son los extremos 3' y 5'. Las posiciones de azúcar 3' están abiertas a modificación cuando el enlace entre dos unidades de azúcar adyacentes es un enlace 2'-5'. Los grupos sustituyentes de azúcar preferidos incluyen: -OH; -F; -O-alquilo, -S-alquilo o -N-alquilo; -O-alquenilo, -S-alquenilo o -N-alquenilo; -O-alquinilo, -S-alquinilo o -N-alquinilo; o -O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C1 a C10 o alquenilo y alquinilo C2 a C10 sustituidos o no sustituidos, alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo (por ejemplo, -propargilo, -propilo, -etinilo, -etenilo y propenilo).

30 35 Los ejemplos no taxativos de modificación de azúcar incluyen metoxi (-O-CH₃), metiltio (-S-CH₃), -OCN, -OCF₃, aminopropoxi (-OCH₂CH₂CH₂NH₂), alilo (-CH₂-CH=CH₂), -O-alilo (-O-CH₂-CH=CH₂), -O[(CH₂)_nO]_mCH₃, -O(CH₂)_nOCH₃, -O(CH₂)_nNH₂, -O(CH₂)_nCH₃, -O(CH₂)_nONH₂ y -O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a alrededor de 10, 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃), 2'-dimetilaminooxietoxi (2'-O(CH₂)₂ON(CH₃O₂), -N-metilacetamida (2'-O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃), -F, -Cl, -Br, -I, -CN, -SOCH₃, -SO₂CH₃, -ONO₂, -NO₂, -N₃, -NH₂, imidazol, 40 carboxilato, tioato, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino y sililo sustituido.

40 Los grupos sustituyentes de azúcar en la posición 2' que se describieron anteriormente pueden incorporarse en la posición arabino (superior) o la posición ribo (inferior). Un ejemplo de modificación de arabino en la posición 2' es 2'-F (el nucleótido modificado con arabino en la posición 2'-F se denomina comúnmente ácido nucleico fluoroarabimo (FANA)).

45 45 De acuerdo con algunos ejemplos, se pueden modificar los restos azúcar, resto azúcar 2'-desoxi-pentofuranosilo.

En algunas realizaciones preferidas, el nucleótido modificado comprende al menos un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo.

50 55 También pueden realizarse modificaciones similares a las que se describieron anteriormente en posiciones distintas a la posición 2' del resto azúcar, particularmente en la posición 3' del azúcar de un nucleósido del extremo 3' o en los nucleótidos unidos en la posición 2'-5' y en la posición 5' de un nucleótido del extremo 5'.

Modificaciones de nucleobase: Los compuestos de ácido nucleico divulgados en la presente pueden comprender nucleobases «no modificadas» o «de origen natural» que incluyen las bases purinas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidinas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). De manera alternativa, los compuestos de ácido nucleico de la invención pueden contener uno o más nucleobases sustituidas o modificadas de otro modo. Los ejemplos no taxativos de las modificaciones de nucleobase incluyen 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil adenina, 6-metil guanina, 2-propil adenina, 2-propil guanina y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 5-propinil uracilo, 5-propinil citosina y otros derivados alquinilo de bases pirimidinas, 6-azo uracilo, 6-azo citosina, 6-azo timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-

- 5 tiouracilo, 8-halo adenina, 8-halo guaninas, 8-amino adenina, 8-amino guanina, 8-tiol adenina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil adenina, 8-tioalquil guanina, 8-hidroxil adenina, 8-hidroxil guanina y otras adeninas y guaninas 8 sustituidas, 5-halo (por ejemplo, 5-bromo) uracilo, 5-halo (por ejemplo, 5-bromo) citosina, 5-trifluorometil uracilo, 5-trifluorometil guanina y otros uracilos y citosinas 5 sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina. Los restos de nucleobases modificadas también pueden incluir aquellos en los cuales la base purina o pirimidina es reemplazada con otros heterociclos, por ejemplo, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-deaza-guanina, 7-deaza-adenina, 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Los ejemplos adicionales incluyen nucleobases que tienen bases no purinilo y no pirimidinilo, tal como 2-aminopiridina, 2-piridona y triazina.
- 10 Análogos de nucleótidos: Los compuestos de ácido nucleico, de acuerdo con algunos ejemplos, pueden comprender uno o más análogos de nucleótidos. La expresión "análogos de nucleótidos", que se denominan de manera alternativa "miméticos de nucleótidos", como se usa en la presente, se refiere a nucleótidos en los que el anillo furanosa o el anillo furanosa y el enlace internucleótido se reemplazan con grupos alternativos. El resto nucleobase (modificado o no modificado) se mantiene.
- 15 15 Los ejemplos no taxativos de análogos de nucleótidos incluyen un ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés), donde la estructura principal del azúcar de un nucleótido se reemplaza con una amida que contiene la estructura principal, en particular una estructura principal de aminoetilglicina; un ácido nucleico morfolino, donde el anillo furanosa se reemplaza con un anillo morfolina; un ácido nucleico ciclohexenilo (CcNA), donde el anillo furanosa se reemplaza con un anillo ciclohexenilo; un ácido nucleico que comprende resto azúcar bicíclico (BNA), tal como "ácidos nucleicos bloqueados" (LNA) donde el grupo 2'-hidroxilo del anillo azúcar ribosilo se une al átomo de carbono en la posición 4' del anillo azúcar, formando así un enlace 2'-C,4'-C-oximetileno para formar el resto azúcar bicíclico, un ácido nucleico puenteado con 2'-O,4'-etileno (ENA) y similares; un ácido nucleico treosa donde el resto azúcar de hidroxilpentofuranosilo se reemplaza con el resto azúcar de treosa; un ácido nucleico de arabinosa (ANA) donde el resto azúcar de ribosa se reemplaza con el resto azúcar de arabinosa; un ácido nucleico no bloqueado (UNA), donde el anillo ribosa se reemplaza con un análogo acíclico, que carece el C2'-C3'; un nucleótido especular donde el anillo D-ribosa típico se reemplaza con un anillo L-ribosa, formando así un nucleótido que es una imagen especular de nucleótido natural y un nucleótido que comprende un enlace en la posición 2'-5', donde el enlace internucleótido 3' a 5' típico se reemplaza con un enlace 2' a 5' (preferentemente un enlace internucleótido basado en fosfato 2'-5'). Se debe enfatizar que los análogos de nucleótidos descritos se pueden modificar adicionalmente como se describió anteriormente para "nucleótido modificado".
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60
- 20 Los ejemplos no taxativos de análogos de nucleótidos incluyen un ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés), donde la estructura principal del azúcar de un nucleótido se reemplaza con una amida que contiene la estructura principal, en particular una estructura principal de aminoetilglicina; un ácido nucleico morfolino, donde el anillo furanosa se reemplaza con un anillo morfolina; un ácido nucleico ciclohexenilo (CcNA), donde el anillo furanosa se reemplaza con un anillo ciclohexenilo; un ácido nucleico que comprende resto azúcar bicíclico (BNA), tal como "ácidos nucleicos bloqueados" (LNA) donde el grupo 2'-hidroxilo del anillo azúcar ribosilo se une al átomo de carbono en la posición 4' del anillo azúcar, formando así un enlace 2'-C,4'-C-oximetileno para formar el resto azúcar bicíclico, un ácido nucleico puenteado con 2'-O,4'-etileno (ENA) y similares; un ácido nucleico treosa donde el resto azúcar de hidroxilpentofuranosilo se reemplaza con el resto azúcar de treosa; un ácido nucleico de arabinosa (ANA) donde el resto azúcar de ribosa se reemplaza con el resto azúcar de arabinosa; un ácido nucleico no bloqueado (UNA), donde el anillo ribosa se reemplaza con un análogo acíclico, que carece el C2'-C3'; un nucleótido especular donde el anillo D-ribosa típico se reemplaza con un anillo L-ribosa, formando así un nucleótido que es una imagen especular de nucleótido natural y un nucleótido que comprende un enlace en la posición 2'-5', donde el enlace internucleótido 3' a 5' típico se reemplaza con un enlace 2' a 5' (preferentemente un enlace internucleótido basado en fosfato 2'-5'). Se debe enfatizar que los análogos de nucleótidos descritos se pueden modificar adicionalmente como se describió anteriormente para "nucleótido modificado".
- 30 El compuesto de ácido nucleico, de acuerdo con algunos ejemplos, puede comprender además al menos un resto no convencional. La expresión "resto no convencional", como se usa en la presente, se refiere a un "nucleótido abásico" o un "análogo de nucleótido abásico". Dicho nucleótido abásico comprende restos azúcar que carecen de una base o tienen otros grupos químicos en lugar de la base en la posición 1'. El nucleótido abásico puede comprender un resto ribosa abásico (modificado o no modificado como se describió anteriormente) o un resto desoxirribosa abásico (modificado o no modificado). De manera adicional, el nucleótido abásico puede ser un nucleótido abásico inverso, por ejemplo, donde una fosforamidita abásica inversa se acopla mediante una amidita 5' (en lugar de amidita 3'), lo que genera un enlace fosfato 5'-5'. La expresión "análogo de nucleótido abásico" comprende cualquier análogo de nucleótido como se definió anteriormente, donde el resto azúcar carece de una base o tiene otros grupos químicos en lugar de la base en la posición 1'.
- 35 40 45 50 55 60
- 35 Modificaciones en el extremo: Las modificaciones se pueden realizar en los grupos fosfato en el extremo. Los ejemplos no taxativos de distintas químicas de estabilización se pueden usar, por ejemplo, para estabilizar el extremo 3' de las secuencias de ácidos nucleicos, que incluyen desoxirribosa invertida [3'-3']; desoxirribonucleótido; 3'-desoxirribonucleótido [5'-3']; ribonucleótido [5'-3']; 3'-O-metil ribonucleótido [5'-3']; 3'-glicerilo; 3'-desoxirribonucleótido [3'-5']; desoxirribonucleótido [3'-3']; desoxirribonucleótido [5'-2'] y didesoxirribonucleótido [5'-3']. Además de las estructuras principales modificadas y no modificadas indicadas, estas estructuras se pueden combinar con distintas modificaciones de enlace internucleótido, modificaciones de azúcar y/o modificaciones de nucleobases, como se describió anteriormente.
- 40 Los compuestos de ácido nucleico de acuerdo con algunos ejemplos divulgados en la presente pueden comprender extremos romos (es decir, los extremos no incluyen ningún nucleótido excedente). De manera alternativa, los compuestos de ácido nucleico pueden comprender al menos un excedente, dichos excedentes se pueden seleccionar del grupo que consiste en excedentes de nucleótidos (por ejemplo, excedentes de nucleótidos de extremo 3') y excedentes no nucleótidos.
- 45 En ejemplos particulares, los compuestos de ANcd modificados químicamente que se dirigen a p53, composiciones y kits que las comprenden y métodos de uso de estas en el tratamiento de una afección o patología que implica apoptosis (muerte celular programada), se divulan en la presente. En ejemplos particulares, la divulgación se refiere al uso de dichos compuestos para profilaxis de función retardada del injerto (DGF) en un receptor de un riñón de un donante con criterios ampliados (ECD) fallecido, que incluye un riñón que se ha conservado completamente en almacenamiento en frío luego de la extirpación del donante y antes del implante en el receptor.
- 50 55 60
- 50 En algunos ejemplos, los compuestos de ácido nucleico que se dirigen y regulan por disminución el gen p53 tienen secuencias de oligonucleótidos (SEQ ID NOS: 8-37). En algunos ejemplos, se usan las sales farmacéuticamente

aceptables de dichos compuestos. En algunos ejemplos de compuestos de ácido nucleico que tienen una estructura de cadena doble, la secuencia de oligonucleótidos de una de las cadenas se selecciona de una de las SEQ ID NOS: 8-20, 34 y 36 y la secuencia de oligonucleótidos de la otra cadena se selecciona de una de las SEQ ID NOS: 21-33, 35 y 37. Por ejemplo, SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:22; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:24; SEQ ID NO:25; SEQ ID NO:26; SEQ ID NO:27; SEQ ID NO:28; SEQ ID NO:29; SEQ ID NO:30; SEQ ID NO:31; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:35; o SEQ ID NO:37.

En algunos ejemplos, los inhibidores de p53 son moléculas de ácido nucleico, o sales farmacéuticamente aceptables de dichas moléculas, que tienen una estructura de cadena doble en la cual (a) la molécula de ácido nucleico es un dúplex que incluye una cadena en sentido y una cadena antisentido complementaria; (b) cada cadena de la molécula de ácido nucleico tiene 19 nucleótidos de longitud; (c) una secuencia de 19 nucleótidos de la cadena antisentido es complementaria con una secuencia consecutiva de un p53 de mamífero que codifica mARN (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1-7) o una parte de esta; y (d) la cadena en sentido y la cadena antisentido se seleccionan de las secuencias de oligonucleótidos que se establecen en la Tabla 1 a continuación (SEQ ID NOS: 8-37).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de cadena en sentido y cadena antisentido seleccionadas para compuestos de ácido nucleico que se dirigen a p53

| SEQ ID | Cadena en sentido (5'>3') | SEQ ID NO | Cadena antisentido (5'>3') |
|--------|---------------------------|-----------|----------------------------|
| 8 | 5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3' | 21 | 5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' |
| 9 | 5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAA 3' | 22 | 5' UUACAUCCCAAACAUCC 3' |
| 10 | 5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3' | 23 | 5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3' |
| 11 | 5' GGGUUGGUAGUUUCUACAA 3' | 24 | 5' UUGUAGAACUACCAACCC 3' |
| 12 | 5' GGGAUGUUUGGGAGAUGUA 3' | 25 | 5' UACAUCCCAAACAUCCC 3' |
| 13 | 5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3' | 26 | 5' UACAAGUCUUGGUGGAUCC 3' |
| 14 | 5' GAGGGAUGUUUGGGAGAUA 3' | 27 | 5' UAUCUCCCAAACAUCCCUC 3' |
| 15 | 5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3' | 28 | 5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3' |
| 16 | 5' GACUCAGACUGACAUUCUU 3' | 29 | 5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3' |
| 17 | 5' GCAUUUGCACCUACCUAA 3' | 30 | 5' UUGAGGUAGGUGCAAUGC 3' |
| 18 | 5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3' | 31 | 5' AUACAUCCCAAACAUCC 3' |
| 19 | 5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3' | 32 | 5' AUCAGUCUGAGUCAGGCC 3' |
| 20 | 5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3' | 33 | 5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' |
| 34 | 5' CCGAGUGGAAGGAAUUUUG 3' | 35 | 5' CAAUUUCCUCCACUCGG 3' |
| 36 | 5' GAGAAUAUUUCACCCUUCA 3' | 37 | 5' UGAAGGGUGAAUAUUCUC 3' |

Todas las posiciones proporcionadas en la Tabla 1 son 5'>3' en la cadena en sentido y en la cadena antisentido.

En otros ejemplos, los inhibidores de p53 son compuestos de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANcd), o sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos, en los cuales (a) la molécula de ácido nucleico es un dúplex que incluye una cadena en sentido y una cadena antisentido complementaria; (b) cada cadena de la molécula de ácido nucleico tiene 19 nucleótidos de longitud; (c) una secuencia de 19 nucleótidos de la cadena antisentido es complementaria con una secuencia consecutiva de un p53 de mamífero que codifica mARN (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1-7) o una parte de esta; y (d) la cadena en sentido y la cadena antisentido comprenden pares de secuencias

5

10

15

20

que se establecen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Pares seleccionados de cadenas sentido y antisentido para generar compuestos de ácido nucleico de cadena doble que se dirigen a p53

| Nombre del Par | SEQ ID NO | Cadena en sentido (5'>3') | SEQ ID NO | Cadena antisentido (5'>3') |
|----------------|-----------|---------------------------|-----------|----------------------------|
| p53_1 | 36 | 5' GAGAAUAUUUCACCCUUCA 3' | 37 | 5' UGAAGGGUGAAUUAUCUC 3' |
| p53_13 | 8 | 5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3' | 21 | 5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' |
| p53_34 | 9 | 5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAA 3' | 22 | 5' UUACAUCUCCCAAACAUCC 3' |
| | 9 | 5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAA 3' | 31 | 5' AUACAUCUCCCAAACAUCC 3' |
| p53_35 | 10 | 5' GACUCAGACUGACAUUCUA 3' | 23 | 5' UAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3' |
| p53_36 | 11 | 5' GGUUGGUAGUUUCUACAA 3' | 24 | 5' UUGUAGAAACUACCAACCC 3' |
| p53_37 | 12 | 5' GGAUGUUUGGGAGAUGUA 3' | 25 | 5' UACAUCCCAAACAUCCC 3' |
| p53_38 | 13 | 5' GGAUCCACCAAGACUUGUA 3' | 26 | 5' UACAAGUCUUGGUGGAUCC 3' |
| p53_39 | 14 | 5' GAGGAUGUUUGGGAGAUA 3' | 27 | 5' UAUCUCCCAAACAUCCCUC 3' |
| p53_40 | 15 | 5' GGGCCUGACUCAGACUGAA 3' | 28 | 5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3' |
| p53_41 | 16 | 5' GACUCAGACUGACAUUCUU 3' | 29 | 5' AAGAAUGUCAGUCUGAGUC 3' |
| p53_42 | 17 | 5' GCAUUUGCACCUACCUAA 3' | 30 | 5' UUGAGGUAGGUGCAAUGC 3' |
| p53_43 | 18 | 5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3' | 31 | 5' AUACAUCUCCCAAACAUCC 3' |
| | 18 | 5' GGAUGUUUGGGAGAUGUAU 3' | 22 | 5' UUACAUCUCCCAAACAUCC 3' |
| p53_44 | 19 | 5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3' | 32 | 5' AUCAGUCUGAGUCAGGCC 3' |
| | 19 | 5' GGGCCUGACUCAGACUGAU 3' | 28 | 5' UUCAGUCUGAGUCAGGCC 3' |
| p53_45 | 20 | 5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3' | 33 | 5' UGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' |
| | 20 | 5' CAGACCUAUGGAAACUACA 3' | 21 | 5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' |

5 Toda las posiciones proporcionadas en la Tabla 2 son 5'>3' en la cadena en sentido y en la cadena antisentido.

En ejemplos preferidos, la cadena en sentido y la cadena antisentido de la molécula de ácido nucleico de cadena

doble se seleccionan del grupo que consiste en una cadena en sentido SEQ ID NO: 36 y una cadena antisentido SEQ ID NO: 37; una cadena en sentido SEQ ID NO: 16 y una cadena antisentido SEQ ID NO: 29; una cadena en sentido SEQ ID NO: 19 y una cadena antisentido SEQ ID NO: 32; y una cadena en sentido SEQ ID NO: 19 y una cadena antisentido SEQ ID NO: 28.

5 QP-1002

QPI-1002 (también denominado "I5NP", número CAS 1231737-88-4) con peso molecular 12.319,75 Dalton (forma protonada), QPI-1002 Sal de sodio: 13.111,10 Dalton (sal de sodio) es un oligonucleótido de ARN de cadena doble (19 pares de bases), sintético, modificado químicamente y resistente a nucleasa, diseñado para inhibir temporalmente la expresión del gen pro-apoptótico, p53, mediante activación de la vía de interferencia de ARN (ARNi). La sal de sodio de QPI-1002 tiene la fórmula molecular: $C_{380}H_{448}O_{262}N_{140}P_{36}Na_{36}$. El dúplex de ARN se protege parcialmente de la degradación de nucleasa usando una modificación en la posición 2' del azúcar de ribosa.

La estructura de QPI-1002 es como se muestra a continuación:

5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3' (cadena antisentido) (SEQ ID NO: 37)

3' ACUUCCCACUUUAUAAGAG 5' (cadena en sentido) (SEQ ID NO: 36)

15 donde cada uno de A, C, U y G es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo está unido al siguiente ribonucleótido mediante un enlace covalente; y donde los ribonucleótidos alternados en la cadena antisentido y la cadena en sentido son ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-metilo y un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo está presente en el extremo 5' y en el extremo 3' de la cadena antisentido y un ribonucleótido no modificado está presente en el extremo 5' y en el extremo 3' de la cadena en sentido. De manera que en la cadena antisentido cada uno del primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, decimoprimer, decimotercero, decimoquinto, decimoséptimo y decimonoveno ribonucleótido sea un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo; y en la cadena en sentido cada uno del segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, decimosegundo, decimocuarto, decimosexto y decimoctavo ribonucleótido sea un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo.

25 La proteína p53 se activa como consecuencia de la lesión tubular renal aguda (isquemia-reperfusión) que puede tener lugar en riñones de donantes trasplantados luego de conservación hipotérmica, particularmente conservación hipotérmica prolongada, tales como períodos de 26 horas o más, y luego de retirar a los pacientes del bypass cardiopulmonar luego de cirugía cardíaca importante, lo que conlleva la inducción de apoptosis/muerte celular programada. La inhibición temporal de la expresión de p53 por parte de QPI-1002 les brinda a las células epiteliales tubulares proximales tiempo para reparar el daño celular y, por lo tanto, evitar la inducción de la apoptosis. Los inventores de la presente han demostrado que el bloqueo temporal de la inducción de apoptosis reduce la gravedad, frecuencia o duración de la lesión por reperfusión luego de isquemia prolongada.

35 La dosis administrada del inhibidor temporal de p53 debe ser eficaz para lograr profilaxis, que incluyen, de modo no taxativo, mejor índice de supervivencia o recuperación más rápida, o mejora, atenuación o prevención de síntomas y otros indicadores que sean seleccionados como medidas adecuadas por los expertos en la técnica. Los compuestos divulgados en la presente se pueden administrar mediante cualquiera de las vías de administración convencionales. Cabe destacar que el compuesto se puede administrar como el compuesto o como la sal farmacéuticamente aceptable y se pueden administrar solos o como ingrediente activo junto con portadores, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos se pueden administrar por vía oral, subcutánea o parenteral que incluye la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal e intranasal, así como intratecal y técnicas de infusión. Los implantes de los compuestos también son útiles. Las formas líquidas se pueden preparar para inyección, el término incluye la administración subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal y otras vías de administración parenteral. Las composiciones líquidas incluyen soluciones acuosas, con y sin cosolventes orgánicos, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones con aceites comestibles, así como vehículos farmacéuticos similares. Además, en determinadas circunstancias, las composiciones para su uso en los tratamientos novedosos de la presente invención se pueden fabricar como aerosoles, para administración intranasal y similares. El paciente tratado es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos, incluidos los humanos. Los portadores, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como portadores de implantes, generalmente se refieren a rellenos o diluyentes sólidos o líquidos no tóxicos e inertes, o material encapsulante que no reacciona con los ingredientes activos de la invención, que incluyen 40 liposomas, glicosaminoglicanos lipídicos y microesferas. Muchos de dichos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

45 La invención se ha descrito de manera ilustrativa, y debe entenderse que la terminología que se ha usado pretende tener un fin ilustrativo y no taxativo.

50 La mención de un documento en la presente no pretende tomarse como admisión de que dicho documento constituye técnica previa pertinente, ni que se considera pertinente en cuanto a la patentabilidad de alguna reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración con respecto al contenido de un documento se basa en la información disponible al solicitante al momento de la presentación y no constituye una admisión en cuanto a la corrección de dicha declaración.

Ejemplos

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, mediante la descripción precedente, utilizar la presente invención en la mayor medida posible. Las siguientes realizaciones específicas preferidas, por lo tanto, deberán interpretarse como meramente ilustrativas, y no restrictivas de la invención reivindicada de forma alguna.

5 Ejemplo 1: Activación de p53 inducida por isquemia-reperfusión en riñones de ratas donantes.

Se recolectaron riñones de ratas (n=4-6) SD jóvenes (3 meses de edad) y de edad avanzada (14 meses de edad) y se sometieron a isquemia fría (CI, por sus siglas en inglés) durante 5 horas. Se procesó un riñón de cada animal para la extracción de proteína, mientras que el segundo riñón se trasplantó en ratas singénicas de 3 meses de edad. Los riñones trasplantados se recolectaron 24 horas luego de la cirugía y el inicio resultante de la lesión por isquemia-reperfusión (IR) y también se procesaron para la extracción de proteína. Se analizaron los extractos de proteína en ELISA para determinar los niveles de expresión de p53.

10 Resultados: En la Figura 1, el eje Y muestra unidades arbitrarias que corresponden a niveles de proteína p53 medidos en ELISA. La Figura 1 muestra que el nivel de proteína p53 aumenta significativamente en riñones trasplantados de ratas de edad más avanzada, en comparación con los riñones de ratas jóvenes (3 meses de edad). Cabe destacar 15 que luego de la activación de p53 que tiene lugar mediante varias modificaciones postraduccionales, sus niveles de estado estacionario aumentan debido a la notoria estabilización de la proteína.

15 Ejemplo 2: Uso de un inhibidor de un gen p53 para profilaxis de lesión por isquemia-reperfusión (IRI) y función retardada del injerto (DGF) en un receptor de trasplante de riñón

20 Un estudio con escalado de dosis, de fase II, multicentro, doble ciego, prospectivo, aleatorizado, controlado con placebo de la actividad clínica de QPI-1002 (dosis IV en bolo único de 10 mg/kg administrada a los 30 minutos después de la reperfusión) para profilaxis de la función retardada del injerto en pacientes dependientes de diálisis ESRD sometidos a trasplante de riñón de donante fallecido, así como la seguridad y PK de QPI-1002 en estos pacientes.

25 Los principales objetivos del estudio fueron 1) evaluar la eficacia de QPI-1002 en la prevención de DGF y 2) evaluar aun más la seguridad de una infusión en bolo IV de dosis unitaria de QPI-1002 en pacientes con riesgo elevado luego de trasplante renal de donante fallecido.

30 El principal criterio de valoración fue la incidencia de DGF, mientras que la DGF se definió en el protocolo como la necesidad de diálisis durante los primeros 7 días luego del trasplante. Los criterios de valoración secundarios incluyeron los parámetros de medición de la gravedad de diálisis en pacientes dializados, la función del riñón en pacientes no dializados inmediatamente luego del trasplante (dentro de los 5 días), así como la función del riñón en un punto de observación de período intermedio, es decir, a los 30 días luego del trasplante.

Materiales y métodos

35 Producto de prueba: Quark Pharmaceuticals Inc., Fremont CA proporcionó QPI-1002, formulado como una solución estéril sin conservantes formulada en solución salina amortiguada con fosfato. El producto se llenó en recipientes de vidrio tipo I transparentes con tapones de caucho de butilo recubiertos con Teflon con sellos abrefácil de aluminio.

35 Cada recipiente se proporcionó para un único uso. Los recipientes se almacenaron a 2 – 8 °C, protegidos de la luz. Se entibió la solución hasta temperatura ambiente antes del uso.

40 Se administró QPI-1002 mediante inyección intravenosa en bolo a una dosis de 10 mg/kg a alrededor de 30 minutos luego de finalizada la cirugía y de retirar al paciente de la máquina de bypass cardiopulmonar, o luego de reperfusión del riñón trasplantado.

45 Almacenamiento en frío: Luego de la extirpación del donante, los riñones conservados mediante almacenamiento en frío se enjuagaron con solución conservante fría y se colocaron en una bolsa estéril inmersa en la solución. La bolsa estéril se colocó dentro de una bolsa adicional que contenía hielo triturado.

50 Perfusión con máquina: Luego de extirparlos del donante, los riñones conservados mediante perfusión con máquina se conectaron a un dispositivo de perfusión configurado para bombear de manera continua el fluido de perfusión a través del órgano, los ejemplos no taxativos de dispositivos comúnmente utilizados para perfusión con máquina de riñones de donantes incluyen el Waters RM3 (IGL/Waters Medical Systems, Rochester MN) y el transportador de riñón LifePort (Organ Recovery Systems, des Plaines, IL, EUA). Los ejemplos no taxativos de soluciones de conservación adecuadas incluyen la solución de UW (Universidad de Wisconsin) y la solución de HTK (histidina-triptófano-cetoglutarato). Durante la perfusión con máquina, se controló la presión de la perfusión y se administró verapamilo según fuera necesario para vasodilatar el riñón.

55 Pacientes: Luego de obtener consentimiento informado por escrito, 332 pacientes con DDRT programado se asignaron a grupos aleatorios 1:1 para recibir ya sea una única dosis IV de QPI-1002, 10,0 mg/kg o placebo de solución salina isotónica (0,9 % NaCl) en modo doble ciego, por vía intraoperatoria luego de la reperfusión del aloinjerto (establecimiento del flujo sanguíneo del riñón trasplantado). 331 pacientes recibieron el fármaco de estudio (QPI-1002

o Placebo). Debido a un error de dispensación de farmacia, un paciente no recibió un fármaco de estudio.

La siguiente tabla proporciona detalles de grupos de análisis de pacientes:

Tabla A: Grupos de análisis

| | |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ITT (Intención de tratar): | Todos los pacientes asignados aleatoriamente, trasplantados y a los que se les administró la dosis <i>se analizaron como asignados aleatoriamente</i> . |
| ITTEE: | Pacientes con eficacia que se puede evaluar (EE): Todos los pacientes asignados aleatoriamente, trasplantados y a los que se les administró la dosis se analizaron como <i>asignados aleatoriamente</i> (<i>excluye cuatro</i> pacientes que sufrieron pérdida de injerto durante las primeras 24 horas luego del trasplante y un paciente que no recibió el fármaco de estudio), esta población se usó en el análisis del criterio de valoración de eficacia principal. |
| MITT (Intención de tratar modificada): | Igual al ITT pero analizada como <i>tratada</i> , esta población se usó en el análisis de seguridad. |
| MITT(EE): | Igual al ITTEE pero analizada como tratada, esta población se usó en el análisis de eficacia (criterios de valoración secundarios). |

- 5 Los criterios de elegibilidad fundamentales se diseñaron para inscribir a pacientes con trasplante de riñón programado de un donante fallecido en 4 subgrupos formados en función del tipo de donante especificado por el protocolo y la realización de conservación (completamente almacenados en frío (CS, por sus siglas en inglés) o al menos parcialmente perfusionados con máquina (MP, por sus siglas en inglés)):
- 10 • ECD/CS: El riñón de ECD que se ha conservado mediante almacenamiento en frío durante todo el período de fase de isquemia fría (CIT, por sus siglas en inglés), independientemente de la duración.
- ECD/MP: El riñón de ECD que se ha conservado mediante perfusión con máquina durante cualquier intervalo de tiempo durante el período de isquemia fría, donde la CIT total ha sido de al menos 26 horas.
- El riñón de SCD/SCD que se ha conservado mediante almacenamiento en frío, donde la CIT total ha sido de al menos 26 horas.
- 15 • El riñón de SCD que se ha conservado mediante perfusión con máquina durante cualquier intervalo de tiempo durante el período de isquemia fría, donde la CIT total ha sido de al menos 26 horas.
- Por lo tanto, la duración de CIT calculada no limitó la elegibilidad del estudio en el grupo de estudio de pacientes ECD/CS (riñones de ECD completamente almacenados en frío). La duración de CIT calculada limitó la elegibilidad (≥ 26 horas) en los otros grupos de estudio de pacientes:
- 20 La siguiente tabla proporciona resultados de estratificación para el análisis de eficacia:

Tabla B. Resultados de estratificación para el análisis de eficacia

| Capas % de mITT(EE) | ITT 332 pacientes | mITT(EE) 327 pacientes | ITTEE 327 pacientes |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Total 100 % | 167 Placebo 165 QPI-1002 | 163 Placebo 164 QPI-1002 | 165 Placebo 162 QPI-1002 |
| ECD/CS 54,4 % | 91 Placebo 90 QPI-1002 | 88 Placebo 90 QPI-1002 | 89 Placebo 88 QPI-1002 |
| ECD/MP 11,6 % | 18 Placebo 20 QPI-1002 | 19 Placebo 19 QPI-1002 | 18 Placebo 20 QPI-1002 |
| SCD/CS 11,6 % | 21 Placebo 19 QPI-1002 | 21 Placebo 17 QPI-1002 | 21 Placebo 19 QPI-1002 |

| | | | |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| SCD/MP 22,4 % | 37 Placebo 36 QPI-1002 | 35 Placebo 38 QPI-1002 | 37 Placebo 35 QPI-1002 |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|

Cabe destacar que el tipo de donante de órgano no se identificó de manera precisa hasta el trasplante, por lo tanto, al momento de la asignación aleatoria, no se identificó el tipo de órgano final. Como se puede observar a partir de la Tabla B, ECD/CS fue la capa más grande (N=178 (mITT(EE)), con más del 50 % de los pacientes incluidos en esta capa. Las capas ITT e ITTEE se presentan en la Tabla B como tipo de donante de órgano (ECD/SCD) usado en la asignación aleatoria. La capa mITT(EE) se presenta en la Tabla B según tipo de donante de órgano real (ECD/SCD).

5

La edad de los donantes fue la detallada en la Tabla C que figura a continuación:

Tabla C. Edad del donante

| | Donante | |
|-----------------------------------|---------------------|--------------|
| Edad (años); promedio (intervalo) | QPI-1002 | Placebo |
| Población total | 53,9 (12-84) | 53,6 (9-86) |
| -SCD/CS CIT >26 h | 38,1 (12-56) | 38,4 (9-59) |
| -SCD/MP CIT >26 h | 37,1 (12-59) | 38,0 (16-59) |
| -ECD/CS | 62,9 (50-84) | 62,4 (51-86) |
| -ECD/MP CIT >26 h | 58,5 (50-74) | 58,8 (51-69) |

10 DGF se definió como la necesidad de diálisis dentro de las 24 horas luego de la transferencia del riñón (excluyendo la hipertoniasmia y/o hipervolemia).

Entre 327 pacientes con eficacia evaluable (162 QPI-1002; 165 Placebo), las edades promedio fueron 58,9 y 59,1 años, respectivamente; 64,8 % y 68,5 %, fueron hombres, 23,5 % y 22,4 % fueron de raza negra (p=ns). No se registraron diferencias de tratamiento significativas en función del peso, índice de masa corporal (BMI, por sus siglas en inglés), % máximo de panel de anticuerpos reactivos (PRA, por sus siglas en inglés) previo a la transferencia del receptor, antes del estado de transfusión o error de coincidencia de HLA. El riesgo de DGF previo a la transferencia, determinado según nomograma de Irish (2010), fue de 35-36 % en ambos grupos (p=ns). Entre los donantes, ~2/3 fueron ECD y 1/3 SCD en cada grupo; CIT y creatinina en suero terminal promedio, % con hipertensión y la causa de fallecimiento no fueron significativamente distintos entre los grupos. La descripción detallada de los datos demográficos de los receptores y los donantes se proporciona en la Tabla D que figura a continuación:

15

20

Tabla D. Resultados de estratificación para el análisis de eficacia

| | Receptores | | Donantes | |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | QPI-1002 | Placebo | QPI-1002 | Placebo |
| Edad (años); promedio (intervalo) | 58.9 (24-85) | 59.1 (23-83) | 53.9 (12-84) | 53.6 (9-86) |
| Sexo (% hombre) | 64,8 | 68,5 | 58,0 | 52,1 |
| Raza (% raza negra) | 23,5 | 22,4 | 11,7 | 9,7 |
| Peso*, kg; promedio (intervalo) | 79,4 | 79,2 | 80,8 (20,79) | 82,7 (21,11) |
| BMI**, kg/m ² ; promedio (SD) | 27,6 (4,93) | 27,6 (4,36) | - | - |
| Transfusión de sangre previa, n(%) | 64 (39,8) | 63 (38,2) | - | - |
| % PRA máximo ***, promedio (intervalo) | 16.9 (0-100) | 14.2 (0-99) | - | - |
| Errores de coincidencia de HLA de donante/receptor, promedio (intervalo) | 4,4 (0-6) | 4,4 (0-6) | - | - |

* Peso: Peso del receptor al momento de la evaluación;

** BMI: Índice de masa corporal

*** PRA: Panel de anticuerpos reactivos

La Tabla E proporciona variables de riesgo de DGF de donantes no demográficas:

Tabla E. Variables de riesgo de DGF de donantes no demográficas

| | Donante | |
|--------------------------------------------------|-------------|-------------|
| | QPI-1002 | Placebo |
| Tipo de donante: | | |
| -ECD, n (%) | (N=162) | (N=165) |
| -SCD, n (%) | 108 (66,7) | 108 (65,5) |
| | 54 (33,3) | 57 (34,5) |
| Tiempo de isquemia fría, h, promedio (intervalo) | 22.6 (3-65) | 23 (5-59) |
| Scr* terminal, mg/dL; promedio (SD) | (N=159) | (N=165) |
| | 1,2 (0,84) | 1,3 (0,95) |
| Antecedentes de hipertensión, n (%) | (N=162) | (N=165) |
| | 85 (52,5) | 90 (54,5) |
| Causa de fallecimiento | (N=112) | (N=114) |
| -Anoxia | 30 (26,8) | 29 (25,4) |
| -CVA/apoplejía | 80 (71,4) | 84 (73,7) |
| -Cardíaco | 2 (1,8) | 1 (0,9) |
| Probabilidad de riesgo de DGF, promedio (SD) | (N=162) | (N=165) |
| | 0,35 (0,16) | 0,36 (0,18) |

En la Tabla : *Scr: concentración de creatinina en suero; *PRA: Panel de anticuerpos reactivos.

5 Resultados

Criterios de valoración de eficacia: El principal criterio de valoración del estudio fue la incidencia de la función retardada del injerto (DGF) en la población con intención de tratar (ITT) de todos los pacientes asignados aleatoriamente y trasplantados, donde DGF se definió como la necesidad de diálisis iniciada dentro de los primeros 7 días luego del trasplante, con exclusión de lo siguiente:

- 10 (i) Diálisis realizada durante las primeras 24 horas por uno o más de los siguientes motivos:
- Tratamiento de hiperpotasemia o hipervolemia
 - Rechazo hiperagudo u otro rechazo agudo mediado por anticuerpo (confirmada por biopsia)
 - Complicaciones vasculares técnicas que involucran el aloinjerto: trombosis arterial y/o venosa renal debido a lesión vascular o complicaciones quirúrgicas técnicas.
- 15 (ii) Diálisis realizada durante los primeros 7 días luego del trasplante por uno o más de los siguientes motivos:
- Uropatía obstructiva (confirmada radiográficamente)
 - Recurrencia fulminante de enfermedad principal (etiología subyacente de ESRD, confirmada por biopsia), que incluye glomeruloesclerosis focal y segmentaria.
 - Un diagnóstico específico de microangiopatía trombótica (púrpura trombocitopénica trombótica o síndrome urémico hemolítico, confirmado por biopsia).

Además del principal criterio de valoración, también se evaluaron los siguientes criterios de valoración de eficacia exploratorios fundamentales:

- 25 1. La incidencia de DGF en la población con intención de tratar modificada ((mITT)(EE)) de todos los pacientes asignados aleatoriamente y trasplantados que recibieron el fármaco de estudio, donde DGF se definió como la necesidad de diálisis aguda dentro de los primeros 7 días luego del trasplante, con exclusión de lo siguiente:
- Diálisis realizada durante las primeras 24 horas por uno o más de los siguientes motivos:
 - Tratamiento de hiperpotasemia o hipervolemia
 - Rechazo hiperagudo u otro rechazo agudo mediado por anticuerpo (confirmada por biopsia)

- Complicaciones vasculares técnicas que involucran el aloinjerto: trombosis arterial y/o venosa renal debido a lesión vascular o complicaciones quirúrgicas técnicas

- Diálisis realizada durante los primeros 7 días luego del trasplante por uno o más de los siguientes motivos:

- Uropatía obstructiva (confirmada radiográficamente)

- 5 • Recurrencia fulminante de enfermedad principal (etiología subyacente de ESRD), que incluye glomeruloesclerosis focal y segmentaria
- Un diagnóstico específico de microangiopatía trombótica (púrpura trombocitopénica trombótica o síndrome urémico hemolítico, confirmado por biopsia)

2. Diferencias de tratamiento en el índice de mejora de la función renal con el transcurso del tiempo

- 10 3. Diferencias de tratamiento en la necesidad de terapia de reemplazo renal.

Como se definió, DGF tuvo lugar en 50 (30,9 %) y 60 (36,4 %) de pacientes con QPI-1002 y placebo, respectivamente (p=0,349), un 15,1 % de reducción relativa del riesgo de DGF. En el grupo de pacientes más grande (ECD/CS, n=178), los índices de DGF fueron de 27,9 % y 39,3 % para QPI-1002 vs. placebo, respectivamente, una reducción relativa significativa en términos clínicos de 30,7 % (p=0,111).

15 La probabilidad de periodo sin diálisis restante a primera diálisis luego del trasplante fue significativamente mayor mejorada para QPI-1002 (rango logarítmico p=0,045) y la duración promedio de la diálisis fue numéricamente menor en esta capa (3,5 vs. 9,0 días para QPI-1002 vs. placebo, respectivamente, p=0,097). El perfil de seguridad global del fármaco concordó con el esperado entre los receptores de DDRT durante el período temprano luego del trasplante, y similar en ambos grupos de tratamiento.

20 La Tabla F proporciona resultados de criterios de valoración de eficacia primarios en población ITTEE (analizada como asignados aleatoriamente):

Tabla F. Criterio de valoración de eficacia primaria (población ITTEE)

| | QPI-1002 | | Placebo | | |
|--------------------|------------|-------------------|------------|-------------------|----------------------------------|
| Capas | N | DGF n (%) | N | DGF n (%) | Reducción de riesgo relativa (%) |
| Total | 162 | 50 (30,86) | 165 | 60 (36,36) | -15,12 |
| SCD/CS CIT>26 h | 19 | 7 (36,84) | 21 | 7 (33,33) | 10,53 |
| SCD/MP CIT>26 h | 35 | 11 (31,43) | 37 | 10 (27,03) | 16,29 |
| ECD/CS | 88 | 24 (27,27) | 89 | 35 (39,33) | -30,65 |
| ECD/MP CIT>26 h | 20 | 8 (40,00) | 18 | 8 (44,44) | -10 |

25 Los resultados para diálisis de criterio de valoración secundario recibida en cualquier momento durante los primeros 7 días luego del trasplante (definición de UNOS) en población ITTEE y en la capa ECD/CS se proporcionan en la Tabla G que figura a continuación:

Tabla G. DGF de criterio de valoración secundario (definición de UNOS) (población ITTEE)

| Población ITTEE total (N=327) | | | Solamente capa ECD/CS (N= 178) | | |
|--------------------------------|----------------------|-------|--------------------------------|-----------------------|-------|
| | DGF | | | DGF | |
| | N | % | | N | % |
| QPI-1002 (n=164) | 62 | 37,80 | QPI-1002 (n=90) | 32 | 35,56 |
| Placebo (n=163) | 76 | 46,63 | Placebo (n=88) | 43 | 48,86 |
| Reducción relativa (%) | -18,9 | | Reducción relativa (%) | -27,2 | |
| Diferencia de riesgo (95 % CI) | -8,82 (-19,49, 1,84) | | Diferencia de riesgo (95 % CI) | -13,31 (-27,69, 1,08) | |

| | | | |
|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|
| Prueba exacta de Fisher valor p | 0,1176 | Prueba exacta de Fisher valor p | 0,0947 |
|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|

5 Las Figuras 2a y 2b proporcionan resultados para probabilidad de criterio de valoración secundario de período sin diálisis restante a primera diálisis luego del trasplante en población mITT(EE) (Figura 2a) y en la capa ECD/CS (Figura 2b), lo que demuestra una mayor mejora de reducción en la población ECD/CS tratada con QP1-1002 en comparación con la población total.

Los resultados para el criterio de valoración secundario de duración del período de diálisis luego del trasplante inicial en todos los pacientes y en la capa ECD/CS se proporcionan en la Tabla H que figura a continuación:

Tabla H. Criterio de valoración secundario de duración del período de diálisis luego del trasplante inicial.

| | QPI-1002 | | Placebo | | | |
|-----------------------|----------|----------------------------------|---------|----------------------------------|---------------------------|----------|
| | N | Duración (días) Promedio (SD) | N | Duración (días) Promedio (SD) | Reducción relativa (%) | Valor p* |
| Todos los pacientes** | 51 | 14,1 (27,75) | 59 | 16,9 (30,91) | -17 | 0,620 |
| Capa ECD/CS*** | 26 | 13,40 (34,43) | 34 | 21,06 (39,61) | -36 | 0,436 |

* Valor p: (Prueba T no emparejada)
** Todos los pacientes que recibieron una sesión de diálisis que comenzó durante la primera semana después del trasplante.
*** Todos los pacientes ECD/CS que recibieron una sesión de diálisis que comenzó durante la primera semana después del trasplante.

10 La Tabla H muestra que se alcanzó la reducción clínicamente significativa de más del 30 % en la capa de ECD/CS, de manera que, en promedio, se ahorró una semana de diálisis en pacientes que recibieron QP1-1002.

El criterio de valoración de eficacia secundario fue la incidencia de lograr un eGFR >10 mL/min/1,73 m² durante al menos 3 de 7 días durante la primera semana después del trasplante (definición de DGF no basada en diálisis). Los resultados se proporcionan en la Tabla I.

15 Tabla I. Recuperación de la función renal luego del trasplante. Incidencia de la disminución de la creatinina en suero $\geq 10\%/\text{día}$ para ≥ 3 de los primeros 7 días.

| | QPI-1002 (n=107)* | Placebo (n=92)* | Efecto del fármaco relativo (%) | Prueba exacta de Fisher valor p |
|------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Todos los pacientes n (%) | 63 (58,9) | 52 (56,5) | 4,2 | 0,775 |
| | (n=58)* | (n=50)* | | |
| ECD/CS n (%) | 34 (58,6) | 23 (46,0) | 27,4 | 0,247 |

*Análisis limitado a las concentraciones de creatinina en suero de pacientes que no recibieron una sesión de diálisis (y no habían recibido diálisis durante al menos 48 horas).

El criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis adicional fue la pendiente de GFR calculado (eGFR) versus tiempo luego del trasplante. Los resultados se proporcionan en la Tabla J.

20 Tabla J. Criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis. Pendiente de GFR calculado (eGFR) versus tiempo luego del trasplante.

| | QPI-1002 | | Placebo | | | |
|-----------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|
| | N | Pendiente de eGFR*, mL/min/1,73m ² /día; promedio (SD) | N | Pendiente de eGFR*, mL/min/1,73m ² /día; promedio (SD) | Efecto relativo (%) | Valor P |
| Todos los pacientes | | | | | | |
| - Ecuación de MDRD de 4 variables | 164 | 2,7 (3,63) | 163 | 2,4 (3,45) | 12,5 | 0,587 |
| - Ecuación de Cockroft-Gault | 155 | 2,6 (3,79) | 153 | 2,4(4,18) | 8,3 | 0,701 |

| | | | | | | |
|-----------------------------------|-----|------------|-----|------------|------|-------|
| - Ecuación de Nankivell "B" | 100 | 2,5 (4,01) | 100 | 2,6 (4,68) | -4,0 | 0,825 |
| Pacientes ECD/CS | | | | | | |
| - Ecuación de MDRD de 4 variables | 90 | 2,6 (3,40) | 88 | 1,8 (2,88) | 44,4 | 0,065 |
| - Ecuación de Cockcroft-Gault | 84 | 2,6 (3,70) | 86 | 1,7 (3,23) | 52,9 | 0,081 |
| - Ecuación de Nankivell "B" | 60 | 2,7(4,14) | 64 | 2,4 (4,42) | 12,5 | 0,633 |

* eGFR: Calculado después de analizar los resultados de creatinina en suero obtenidos durante o dentro de las 48 horas después de finalizada cualquier sesión de diálisis.

5 El criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis adicional fue GFR medido el día 30 de visita del estudio, determinado con iotalamato no radioetiquetado, usando un protocolo comercialmente disponible (Clínica Mayo, Rochester MN), solamente en sitios norteamericanos. Los pacientes que eran dependientes de diálisis dentro de las 48 horas después del día 30 de visita y los que presentaban antecedentes de alergia a los mariscos o radiocontraste iodado también se excluyeron de la participación en este estudio. Los resultados se proporcionan en la Tabla K.

Tabla K. Criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis. Recuperación luego del trasplante de GFR medido de función renal el día 30 de visita del estudio

| Población ITTEE total (N=327) | | | Solamente capa ECD/CS (N= 178) | | |
|--------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|
| | DGF | | | DGF | |
| | N | mGFR promedio (SD) | | N | mGFR promedio (SD) |
| QPI-1002 (n=164) | 62 | 33,8 (31,96) | QPI-1002 (n=90) | 30 | 34,8 |
| Placebo (n=163) | 76 | 29,3 (28,13) | Placebo (n=88) | 36 | 21,1 |
| Diferencia de GFR absoluto (95 % CI) | 4,54 (-5,58, 14,67) | | Diferencia de GFR absoluto (95 % CI) | 13,72 (1,02, 26,41) | |
| Prueba exacta de Fisher valor p | 0,376 | | Prueba exacta de Fisher valor p | 0,035 | |

10 Un criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis adicional fue la producción de orina entre 2 y 3 días luego del trasplante, según lo determinó la producción de orina cuantificada el Día 2—Día 3 indicada según protocolo; el volumen total registrado se normalizó con respecto al de la recolección cada 24 horas para cada paciente. 15 El análisis excluyó los resultados de todos los pacientes que recibieron o todavía estaban recibiendo diálisis en algún momento luego del trasplante hasta el final (Día 2—Día 3) del período de recolección de orina. Los resultados se proporcionan en la Tabla L.

Tabla L. Criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis. Producción de orina entre 2 y 3 días luego del trasplante

| | QPI-1002 | | Placebo | | | |
|----------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|
| | N | Producción de orina en Día 2—Día 3 (# pacientes >500 ml/día); promedio (SD) | N | Producción de orina en Día 2—Día 3 (# pacientes >500 ml/día) promedio (SD) | Efecto relativo (%) | Valor P |
| Todos los pacientes | 80 | 71(88,8) | 79 | 62 (78,5) | 13,1 | 0,090 |
| Todos los pacientes ECD/CS | 40 | 37 (92,5) | 41 | 28 (68,3) | 35,4 | 0,011 |

El criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis adicional se basó en las diferencias de tratamiento en los porcentajes de sujetos con DGF, SGF e IGF, como se define según los criterios de Humar et ál (Clinical Transplantation, 2002) y Johnston et ál (NDT, 2006). Los resultados se proporcionan en la Tabla M y los datos sugieren un cambio de DGF a función lenta del injerto (SGF, por sus siglas en inglés) (SGF) en el grupo tratado con QPI-1002.

- 5 Tabla M. Criterio de valoración de eficacia secundario de DGF sin diálisis. Incidencia de función retardada, lenta e inmediata del injerto (EGF, SGF e IGF).

| Subconjunto de evento | QPI-1002 (N=164) | Placebo (N = 163) | Total (N=327) | Valor p, no ajustado [2] | Tasa de probabilidades ajustada [3] |
|-----------------------|------------------|-------------------|---------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Humar et ál. | | | | | |
| Todos los pacientes | (n=133) | (n=134) | (n=267) | | |
| -IGF | 36 (27,1) | 36 (26,9) | 72 (27,0) | 0,112 | 0,8 (0,5, 1,2) |
| -SGF | 35 (26,3) | 22 (16,4) | 57 (21,3) | | |
| -DGF | 62 (46,6) | 76 (56,7) | 138 (51,7) | | |
| Johnston et al. | | | | | |
| Todos los pacientes | (n=132) | (n=136) | (n=268) | | |
| -IGF | 31 (23,5) | 33 (24,3) | 64 (23,9) | 0,167 | 0,8 (0,5, 1,3) |
| -SGF | 39 (29,5) | 27 (19,9) | 66 (24,6) | | |
| -DGF | 62 (47,0) | 76 (55,9) | 138 (51,5) | | |

Limitaciones definidas por edad

10 Criterio de valoración de eficacia principal: Los resultados de DGF basados en la definición del protocolo principal y basados en la definición de UNOS (riesgos relativos y 95 % de intervalos de confianza) en la población mITT(EE) total, la capa ECD/CS previamente especificada y en pacientes que recibieron riñones de donantes mayores de 45 años de edad o mayores de 35 años de edad se muestran en la Figura 3. La Figura 3 muestra una gráfica de Forest que demuestra el impacto del tratamiento con QPI-1002 en DGF con respecto a la reducción del riesgo en receptores de injerto por tipo de riñón de donante. El riesgo relativo (RR) se calcula como la relación entre la incidencia de DGF en pacientes tratados con QPI-1002 y pacientes tratados con placebo en un subgrupo de pacientes determinado.

15 Diagramas de caja: Los valores de RR calculado se marcan con "+" dentro de las cajas. Los tamaños de las cajas son proporcionales a los tamaños de la muestra respectiva. Los extremos de la línea representan los límites de confianza (CL, por sus siglas en inglés) de 95 % de RR calculado respectivo. Otras definiciones: N – cantidad de pacientes en un subgrupo determinado. RRR – reducción de riesgo relativo (%) calculado como $RRR (\%) = 100 * (RR - 1)$. LCL – 95 % de límite de confianza menor de RRR. UCL – 95 % de límite de confianza mayor de RRR.

20 El efecto de fármaco más potente se observó en pacientes que recibieron riñones de donantes mayores de 45 años de edad (n=252; 77 % de todos los pacientes evaluables en este estudio independientemente de la asignación al subgrupo), donde QPI-1002 redujo la incidencia de DGF en alrededor de -30 % con respecto al placebo. Los resultados fueron los mismos cuando se usó ya sea la definición principal de DGF en este protocolo o la definición ampliamente aceptada de UNOS. Esta diferencia -30 % fue tanto estadísticamente significativa (DGF definida según protocolo - $p = 0,048$; definición de DGF de UNOS - $p = 0,016$) como clínicamente relevante. Además, cuando se redujo el umbral de edad del donante hasta 35 años de edad (n=281; 86 % de todos los pacientes evaluables en este estudio independientemente de la asignación al subgrupo), QPI-1002 aún mantuvo su capacidad de reducir el índice de DGF en -27 % relativo, una diferencia clínica y estadísticamente significativa (definición de DGF de UNOS, $p = 0,023$).

25 Estos resultados fueron compatibles con la nueva clasificación de UNOS OPTN, diseñada para reemplazar la clasificación ECD, SCD, DCD anterior.

30 Criterio de valoración de eficacia secundario: Se evaluó el impacto de QPI-1002 en la gravedad de DGF observando la duración (en días) de la sesión de diálisis inicial y la intensidad (en cantidad de sesiones) de diálisis en los primeros 30 días luego del trasplante. Para ambos parámetros, QPI-1002 produjo resultados numéricamente superiores en la población mITT(EE) total (n=110), y en los subgrupos de pacientes que recibieron riñones de ECD/CS (n=60) o en pacientes que recibieron riñones de donantes de edad más avanzada en los umbrales de 45 (n=88) o 35 (n=101) años

de edad. Específicamente, en pacientes tratados con QPI-1002 dializados que recibieron riñones de ECD/CS tanto la duración como la intensidad de diálisis se redujeron en un -46 % con respecto al grupo placebo. En los pacientes dializados que recibieron riñones de edad más avanzada (ya sea de donantes de más de 45 o 35 años de edad), así como en la población de pacientes total, estas reducciones oscilaron entre -26 % y -33 %.

- 5 El impacto de QPI-1002 en la función del riñón en el período inmediato luego del trasplante (5 días) en pacientes no dializados se evaluó midiendo la producción de orina, así como los parámetros basados en creatinina relacionados con la función glomerular, es decir, eGFR y concentración de creatinina en suero. La cantidad de pacientes en los cuales la producción de orina fue superior a 500 ml desde el día 2 hasta el día 3 luego del trasplante fue 35 % mayor entre los pacientes ECD/CS tratados con QPI-1002 en comparación con el grupo placebo (n=81; p=0,011). Entre los pacientes que recibieron riñones de donantes de edad más avanzada, los aumentos de porcentaje correspondientes asociados con el tratamiento con QPI-1002 fueron de 18 % y 20 % para los umbrales de edad de donantes de 35 (n=132) y 45 (n=118) años de edad, respectivamente.
- 10
- 15 Las Tablas 3a, 3b y 3c muestran datos de criterios de valoración para la población de receptores total, población de receptores que recibieron un riñón de un donante de 45 años de edad y mayor, y población de receptores que recibieron un riñón de un donante de 35 años de edad y mayor. "Duración de DGF" (es decir, la cantidad total de días contiguos contados a partir de la fecha de inicio de DGF hasta la fecha de culminación de DGF).

Tabla 3a:

Población total

| Criterio de valoración | Placebo (N=163) | QPI-1002 (N=164) | Diferencia absoluta | Diferencia relativa | Valor p |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|---------|
| DGF (criterio de valoración principal) Porcentaje | N=163 36,2 % | N=164 31,1 % | -5,1 | -14,09 % | 0,351 |
| DGF (UNOS) Porcentaje | N=163 46,6% | N=164 37,8% | -8,8 | -18,88% | 0,118 |
| Duración de DGF Días promedio (SD) | N=59 19,2 (36,9) | N=51 14,1 (27,8) | -5,13 | -26,72% | 0,417 |
| Intensidad de diálisis Sesiones de diálisis promedio (SD) | N=59 8,7 (15,7) | N=51 6,2 (11,8) | -2,48 | -28,51% | 0,356 |
| Producción de orina a 24 h >500 ml entre Día 2 y Día 3 Porcentaje | N=79 78,5% | N=80 88,8% | 10,3 | 13,12% | 0,090 |
| Pendiente de eGFR Cockcroft-Gault Coeficiente promedio (SD) | N=153 2,4 (4,2) | N=155 2,6 (3,8) | 0,17 | 7,08% | 0,701 |
| Pendiente de eGFR (MDRD) Coeficiente promedio (SD) | N=163 2,4 (3,5) | N=164 2,7 (3,6) | 0,21 | 8,75% | 0,587 |
| Pendiente de eGFR Nankivell Coeficiente promedio (SD) | N=100 2,6 (4,7) | N=100 2,5 (4,0) | -0,14 | -5,38% | 0,825 |
| eGFR Día 30 Cockcroft-Gault Promedio (SD) | N=127 42,3 (20,1) | N=116 45,7 (20,2) | 3,46 | 8,18% | 0,183 |
| eGFR Día 30 MDRD Promedio (SD) | N=151 41,4 (20,7) | N=146 42,2 (21,2) | 0,83 | 2,00% | 0,734 |
| eGFR Día 30 Nankivell Promedio (SD) | N=127 53,3 (23,2) | N=116 56,9 (22,2) | 3,54 | 6,64% | 0,226 |
| mGFR Día 30 Promedio (SD) | N=76 42,6 (21,3) | N=62 42,5 (26,5) | -0,13 | -0,31% | 0,974 |

Tabla 3b

>45 años de edad

| Criterio de valoración | Placebo (N = 163) | QPI-1002 (N=164) | Diferencia absoluta | Diferencia relativa | Valor p |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|---------|
| DGF (criterio de valoración principal) Porcentaje | N=127 40,94 | N=125 28,8 | -12,14 | -29,66% | 0,048 |
| DGF (UNOS) Porcentaje | N=127 50,39 | N=125 35,2 | -15,19 | -30,15% | 0,016 |
| Duración de DGF Días promedio (SD) | N=52 20,7 (39,0) | N=36 14,3 (32,4) | -6,39 | -30,87% | 0,421 |
| Intensidad de diálisis Sesiones de diálisis promedio (SD) | N=52 9,3 (16,6) | N=36 6,2 (13,8) | -3,10 | -33,3% | 0,359 |
| Producción de orina a 24 h >500 ml entre Día 2 y Día 3 Porcentaje | N=60 73,33 | N=58 87,93 | 14,6 | 19,91% | 0,063 |
| Pendiente de eGFR Cockroft-Gault Coeficiente promedio (SD) | N=121 2,0 (4,1) | N=117 2,4 (3,6) | 0,40 | 20,0% | 0,421 |
| Pendiente de eGFR (MDRD) Coeficiente promedio (SD) | N=127 2,0 (3,3) | N=125 2,6 (3,6) | 0,65 | 32,5% | 0,136 |
| Pendiente de eGFR Nankivell Coeficiente promedio (SD) | N=83 2,4 (4,6) | N=81 2,6 (4,0) | 0,19 | 7,92% | 0,783 |
| eGFR Día 30 Cockroft-Gault Promedio (SD) | N=101 39,1 (20,4) | N=89 42,9 (18,7) | 3,81 | 9,74% | 0,183 |
| eGFR Día 30 MDRD Promedio (SD) | N=117 37,2 (19,6) | N=111 40,3 (19,9) | 3,12 | 8,39% | 0,235 |
| eGFR Día 30 Nankivell Promedio (SD) | N=101 50,2 (24,1) | N=89 54,9 (21,8) | 4,72 | 8,4% | 0,161 |
| mGFR Día 30 Promedio (SD) | N=56 39,2 (20,2) | N=47 41,1 (23,2) | 1,87 | 4,77% | 0,663 |

5

Tabla 3c:

>35 años de edad

| Criterio de valoración | Placebo (N = 163) | QPI-1002 (N=164) | Diferencia absoluta | Diferencia relativa | Valor p |
|------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|------------------------|---------|
| DGF (criterio de valoración principal) Porcentaje | N=139 41,01 | N=142 30,99 | -10,02 | -24,44% | 0,084 |
| DGF (UNOS) Porcentaje | N=139 51,08 | N=142 37,32 | -13,76 | -26,93% | 0,023 |
| Duración de DGF | N=57 | N=44 | | | |

| | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-------|---------|-------|
| Días promedio (SD) | 19,6 (37,4) | 14,0 (29,6) | -5,59 | -28,52% | 0,419 |
| Intensidad de diálisis Sesiones de diálisis promedio (SD) | N=57 8,9 (15,9) | N=44 6,2 (12,7) | -2,64 | -29,66% | 0,370 |
| Producción de orina a 24 h >500 ml entre Día 2 y Día 3 Porcentaje | N=64 73,44 | N=68 86,76 | 13,32 | 18,14% | 0,079 |
| Pendiente de eGFR Cockcroft-Gault Coeficiente promedio (SD) | N=131 2,0 (4,2) | N=134 2,5 (3,8) | 0,54 | 27,0% | 0,271 |
| Pendiente de eGFR (MDRD) Coeficiente promedio (SD) | N=139 2,0 (3,3) | N=142 2,7 (3,7) | 0,66 | 33,0% | 0,115 |
| Pendiente de eGFR Nankivell Coeficiente promedio (SD) | N=90 2,3 (4,8) | N=87 2,5 (4,0) | 0,20 | 8,70% | 0,767 |
| eGFR Día 30 Cockcroft-Gault Promedio (SD) | N=109 40,1 (20,3) | N=102 44,0 (19,2) | 3,92 | 9,78% | 0,152 |
| eGFR Día 30 MDRD Promedio (SD) | N=129 38,5 (19,7) | N=126 40,4 (20,0) | 1,93 | 5,01% | 0,439 |
| eGFR Día 30 Nankivell Promedio (SD) | N=109 51,0 (23,7) | N=102 55,4 (21,5) | 4,45 | 8,73% | 0,156 |
| mGFR Día 30 Promedio (SD) | N=63 41,0 (20,9) | N=54 42,3 (27,6) | 1,33 | 3,24% | 0,768 |

Cabe destacar que todos los valores de GFR del día 30 en las Tablas 3a-3c son valores observados y no cambian con respecto a la referencia. Conclusiones: El beneficio clínico del QPI-1002 en pacientes que se someten a trasplante renal de donante fallecido con riñones marginales aumenta con la edad del donante.

5 Los mejores resultados de criterio de valoración principal se obtuvieron para los pacientes que recibieron riñones de donantes mayores de 45 años de edad, independientemente de su clasificación de subgrupo principal (que constituyó el 77 % de todos los pacientes evaluables en el estudio). Un umbral de 35 años de edad (86 % de todos los pacientes evaluables en el estudio independientemente de la clasificación de subgrupo) proporcionó beneficios similares, que se detallan a continuación:

10 Reducción clínicamente relevante y, en algunos subgrupos, estadísticamente significativa de la incidencia de diálisis en la primera semana luego del trasplante, el principal criterio de valoración de este estudio.

15 Reducciones clínicamente relevantes en la duración e intensidad de diálisis en pacientes que experimentaron DGF.

15 Aumentos clínicamente relevantes en producción de orina y pendiente de eGFR con el transcurso del tiempo en el período inmediato luego del trasplante en pacientes no dializados; y

20 Aumento clínicamente relevante en eGFR el día 30.

Conclusiones de eficacia de recuperación de función renal/sin diálisis:

20 1. Pendiente de eGFR con el transcurso del tiempo. La población total mostró un aumento leve del índice de mejora de eGFR con el transcurso del tiempo en los pacientes tratados con QPI-1002 en comparación con los pacientes tratados con placebo. Mientras que la capa ECD/CS demostró un aumento clínicamente significativo (44 % MDRD) en el índice de mejora de eGFR con el transcurso del tiempo en pacientes tratados con QPI-1002 en comparación con los pacientes tratados con placebo ($p=0,065$ para el eGFR calculado mediante la ecuación MDRD).

25 2. mGFR el día 30. La población total demostró un aumento de 4,5 mL/min/1,73 m² en mGFR para los pacientes tratados con QPI-1002 vs. placebo. Mientras que la capa ECD/CS demostró un aumento clínica y estadísticamente significativo de 13,72 mL/min/1,73 m² en mGFR para los pacientes tratados con QPI-1002 vs. placebo ($p=0,035$)

3. Producción de orina luego del trasplante. La población total demostró un aumento del 13 % en la producción de orina en pacientes tratados con QPI-1002 vs. placebo ($p=0,09$). Mientras que la capa ECD/CS demostró un aumento

del 35 % en la producción de orina en pacientes tratados con QPI-1002 vs. placebo. (p=0,011).

4. Un cambio de DGF a SGF en el grupo tratado con QPI-1002.

Conclusión: El índice de DGF fue numéricamente inferior entre los pacientes tratados con QPI-1002 en comparación con los pacientes que recibieron placebo en el grupo más grande (ECD/CS) y estuvo acompañado por una menor necesidad de diálisis postransferencia y un perfil de seguridad comparable entre ambos grupos de tratamiento.

5 Los pacientes que se sometieron a DDRT con riñones de ECD completamente almacenados en frío se pueden beneficiar con el tratamiento intraoperatorio luego de la reperfusión con QPI-1002 en términos de menor necesidad de diálisis y mayor GFR 1 mes luego de la transferencia.

10 El tratamiento de dosis única con QPI-1002 luego de la reperfusión vascular estuvo asociado con un perfil de seguridad similar al del placebo, y fue comparable con el esperado entre los receptores de trasplantes renales de donantes fallecidos.

15 En resumen, los receptores de tratamiento con dosis unitaria de QPI-1002 demostraron un índice de DGF 15 % inferior en comparación con el placebo. Este resultado no fue estadísticamente significativo.

15 Entre los receptores de riñones de ECD completamente almacenados en frío, la capa más grande de pacientes de estudio, una diferencia de tratamiento del 30 % en el índice de DGF a favor del QPI-1002 logró una relevancia estadística (p=0,11).

Los análisis de criterios de valoración secundarios demostraron diferencias de tratamiento beneficiosas clínicamente significativas versus placebo en los siguientes criterios de valoración:

- Índice de DGF según la definición de UNOS clásica
- 20 • Tiempo hasta la primera diálisis
- Gravedad de DGF: Duración e intensidad
- Pendiente de eGFR
- Producción de orina 2-3 días luego del trasplante
- Cambio de DGF a SGF

25 Para muchos de estos criterios de valoración secundarios, los resultados para los receptores de riñones de ECD completamente almacenados en frío, la capa más grande del estudio, lograron un mayor acercamiento (y en algunos casos alcanzaron) la relevancia estadística.

Se observó un beneficio farmacoeconómico potencial en la capa de ECD/CS junto con el tratamiento con dosis unitaria de QPI-1002, en términos de:

- 30
- Una probabilidad significativamente mayor sin diálisis restante, como se demuestra mediante el análisis de Kaplan-Meier (rango logarítmico p<0,05); y
 - Menos tratamientos de diálisis en total recibidos durante los primeros 30 días luego del trasplante (menor "intensidad" de diálisis), una diferencia que logró la relevancia estadística (p<0,10).

35 Ejemplo 2: Uso de un inhibidor de un gen p53 para profilaxis de función retardada del injerto (DGF) en un receptor de un riñón de donantes de varias edades.

Se realizó un estudio similar al Ejemplo 1 para analizar la eficacia de QPI-1002 usando riñones de donantes de varias edades que no cumplieron necesariamente con los criterios para donantes ECD.

40 En el análisis de eficacia, los mejores resultados de criterio de valoración principal se obtuvieron para los pacientes que recibieron riñones de donantes mayores de 45 años de edad (independientemente de su clasificación de subgrupo principal) que constituyó el 77 % de todos los pacientes evaluables en el estudio. Cabe destacar que un umbral de 35 años de edad (86 % de todos los pacientes evaluables en el estudio independientemente de la clasificación de subgrupo) proporcionó beneficios similares (que se detallan a continuación):

Reducción clínicamente relevante y, en algunos subgrupos, estadísticamente significativa de la incidencia de diálisis en la primera semana luego del trasplante, el principal criterio de valoración de este estudio.

45 Reducciones clínicamente relevantes en la duración e intensidad de diálisis en pacientes que experimentaron DGF.

Aumentos clínicamente relevantes en producción de orina y pendiente de eGFR con el transcurso del tiempo en el período inmediato luego del trasplante en pacientes no dializados; y

Aumento clínicamente relevante en eGFR el día 30.^[11]

Ejemplo 3: Análisis de diálisis en estudio de fase II

Objetivo: La diálisis tiene un impacto farmacoeconómico, así como consecuencias para la salud. Por lo tanto, es interesante realizar una comparación de la cantidad de diálisis desde el día 0 hasta el día 180 entre los grupos de tratamiento.

Métodos estadísticos: para comparar entre los grupos de tratamiento (I5NP, Placebo)

- Modelo de regresión de Poisson inflado con ceros (ZIP, por sus siglas en inglés), que es un modelo estadístico basado en una distribución de probabilidad de Poisson que permite observaciones de valor cero frecuentes. El conteo de diálisis por variable de paciente es de dicha naturaleza.

- 10 • Análisis de sensibilidad: Prueba no paramétrica: Wilcoxon y media

- Estadística descriptiva: usando conteos, promedio, desviación estándar (SD), media, mínimo y máximo

El análisis no se limitó al primer período solamente ni estuvo condicionado al evento de DGF.

Esquema de análisis: El análisis se realizó en la población mitt(EE).

- Pacientes totales

- 15 • Grupo de pacientes de edad de donante >35 años

- Grupo de pacientes de edad de donante >45 años

Análisis de duración del estudio

- 0-180 días y

- 0-7 días

- 20 ◦ 7(+)-30 días

- 30+

Detalles (de datos) técnicos: Los datos de diálisis se extraen del archivo "Dial". En general, en el grupo de datos de "Dial" cualquier registro antes del día 30 se considera una sesión y a partir del día 30 en adelante el registro se considera un período que incluye la fecha de inicio y la fecha de culminación. La cantidad de diálisis en un período se calcula de la siguiente manera: Cantidad de diálisis en un período=3*(Última fecha del período – Fecha de inicio de un período)/7.

Resultados:

- Pacientes totales: En total, se realizaron 936 diálisis en el estudio. Su distribución de acuerdo con el intervalo de tiempo y en total se resumen en la Tabla 4a:

30 Tabla 4a: Distribución de diálisis total e intervalos de tiempo - población total

Total

| Tratamiento | Conteo de diálisis 0< días <=180 | diálisis 0< días <=7 | Conteo de diálisis 7< días <=30 | Conteo de diálisis día>30 |
|----------------|----------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------|
| I5NP | 375 (40%) | 138 (44%) | 113 (41%) | 124 (36%) |
| Placebo | 561 (60%) | 178 (56%) | 162 (59%) | 221 (64%) |
| Diálisis total | 936 | 316 | 275 | 345 |

La Tabla 4b resume el promedio, STD, min, máx y media de la cantidad de diálisis por paciente de cada grupo de tratamiento. Las columnas que se encuentran más a la derecha incluyen el valor p obtenido de las distintas pruebas para la comparación de tratamientos.

35 Tabla 4b: comparación de cantidad promedio de diálisis por paciente entre los grupos de tratamiento (población total)

| Total: Conteo de diálisis 0< días <=180 | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------|-----|----------|----------|-----|-------|-----|--------|-----------|--|
| Tratamiento | N | promedio | estándar | min | Media | Máx | Pmedia | Pwilcoxon | |
| I5NP | 164 | 2,29 | 7,31 | 0 | 0 | 78 | 0,0857 | 0,112 | |
| Placebo | 163 | 3,44 | 10,47 | 0 | 0 | 86 | | | |

La cantidad promedio de diálisis por paciente en el grupo I5NP es de 2,29, que representa ~2/3 del grupo Placebo (3,44). El valor p es 0,086 de acuerdo con la prueba media.

5 El valor p obtenido mediante el modelo ZIP es 0,014, lo que significa que tuvo lugar una reducción significativa de la cantidad de diálisis por paciente en el grupo I5NP con respecto al grupo placebo.

- Subpoblación de pacientes con riñones de donantes >45 años de edad:
- En total, se realizaron 796 diálisis en la subpoblación de riñones de donantes > 45 años de edad. Su distribución de acuerdo con el intervalo de tiempo y en total se resumen en la Tabla 4c:

Tabla 4c: Distribución de diálisis total e intervalos de tiempo - población de donantes >45 años de edad

| Donantes >45 años de edad | | | | |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|
| Tratamiento | Conteo de diálisis 0< días <=180 | Conteo de diálisis 7< días <=3030 | Conteo de diálisis >30 | Conteo de diálisis >30 |
| I5NP | 269 (34%) | 93 (38%) | 65 (30%) | 111 (33%) |
| Placebo | 527 (66%) | 151 (62%) | 155 (70%) | 221 (67%) |
| Diálisis total | 796 | 244 | 220 | 332 |

10 La Tabla 4d contiene los datos estadísticos descriptivos para la cantidad promedio de diálisis por paciente de acuerdo con los grupos de tratamiento.

Tabla 4d: comparación de cantidad promedio de diálisis por paciente entre los grupos de tratamiento Población de donantes >45 años de edad

| Donantes >45 años de edad: Conteo de diálisis 0< días <=180 | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------|-----|----------|----------|-----|-------|-----|--------|-----------|--|
| Tratamiento | n | promedio | estándar | min | Media | Máx | Pmedia | Pwilcoxon | |
| I5NP | 125 | 2,15 | 7,95 | 0 | 3 | 78 | 0,0076 | 0,0071 | |
| Placebo | 127 | 4,15 | 11,74 | 0 | 1 | 86 | | | |

15 La cantidad promedio de diálisis por paciente en el grupo I5NP es de 2,15, que representa ~1/2 del grupo Placebo (4,14). La diferencia en valor p estadísticamente significativo es 0,0076 de acuerdo con la prueba media.

El valor p obtenido mediante el modelo ZIP es <0,01, lo que significa que tuvo lugar una reducción significativa de la cantidad de diálisis por paciente en el grupo I5NP con respecto al grupo placebo.

- 20 • Pacientes con riñones de donantes >35 años de edad:
- En total, se realizaron 871 diálisis en la subpoblación de riñones de donantes > 35 años de edad. Su distribución de acuerdo con el intervalo de tiempo y en total se resumen en la Tabla 4e:

Tabla 4e: Distribución de diálisis total e intervalos de tiempo - población de donantes >35 años de edad

| Donantes >35 años de edad | | | | |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Tratamiento | (Conteo de diálisis 0< días <=180) | Conteo de diálisis 0< días <=7 | Conteo de diálisis 7< días <=30 | Conteo de diálisis día>30 |
| I5NP | 322 (37%) | 118 (41%) | 88 (35%) | 116 (34%) |
| Placebo | 549 (63%) | 168 (59%) | 160 (65%) | 221 (66%) |
| Diálisis | 871 | 286 | 248 | 337 |

La Tabla 4f contiene los datos estadísticos descriptivos para la cantidad promedio de diálisis por paciente de acuerdo con los grupos de tratamiento.

5 Tabla 4f: comparación de cantidad promedio de diálisis por paciente entre los grupos de tratamiento Población de donantes ≥ 35 años de edad

| Donantes >35 años de edad: Conteo de diálisis 0< días <=180 | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------|-----|----------|----------|-----|-------|-----|--------|-----------|--|
| Tratamiento | | promedio | estándar | min | Media | Máx | Pmedia | Pwilcoxon | |
| I5NP | 142 | 2,27 | 7,63 | 0 | 0 | 78 | 0,0149 | 0,0186 | |
| Placebo | 139 | 3,95 | 11,26 | 0 | 1 | 86 | | | |

La cantidad promedio de diálisis por paciente en el grupo I5NP es de 2,27, que representa ~3/5 del resultado del grupo Placebo (3,95). La diferencia en valor p estadísticamente significativo es 0,0149 de acuerdo con la prueba media.

10 El valor p obtenido mediante el modelo ZIP es <0,01, lo que significa que tuvo lugar una reducción significativa de la cantidad de diálisis por paciente en el grupo I5NP con respecto al grupo placebo.

Resumen:

- En total, el grupo de pacientes tratados con QPI-1002 consumió ~2/3 de diálisis con respecto al grupo de pacientes tratados con placebo.
- En la población MITTEE total, tuvo lugar una reducción significativa de la cantidad de diálisis por paciente en el grupo I5NP con respecto al grupo placebo de acuerdo con el modelo de regresión ZIP, y es sostenido por las pruebas no paramétricas de sensibilidad.
- En la subpoblación de acuerdo con la edad de los donantes, los valores p son inferiores y la diferencia entre los grupos de tratamiento la cantidad de diálisis por paciente promedio aumenta.

Ejemplo 4: Generación de secuencias novedosas para compuestos de ANcd activos

20 Usando los algoritmos de propiedad y la secuencia conocida del mARN del gen p53 (SEQ ID NOS:1-7), se generaron las secuencias de muchos compuestos de ANcd posibles. Se priorizaron las secuencias de oligonucleótidos en función de su puntaje en un algoritmo de propiedad como las mejores secuencias que se previeron para dirigir la expresión del gen p53 humano.

25 Los ejemplos de secuencias sentido y antisentido útiles para generar un inhibidor temporal de ANcd del gen p53 se muestran en la Tabla 2, supra, e incluyen SEQ ID NOS:36 y 37; 8 y 21; 9 y 22; 9 y 31; 10 y 23; 11 y 24; 12 y 25; 13 y 26; 14 y 27; 15 y 28; 16 y 29; 17 y 30; 18 y 31; 18 y 22; 19 y 32; 19 y 28; 20 y 33; y 20 y 21.

Ejemplo 5: Identificación de secuencias preferidas para compuestos de ácido nucleico activos y generación de compuestos de ácido nucleico de cadena doble

30 Las secuencias de oligonucleótidos con el mejor puntaje se priorizaron adicionalmente en función de su actividad *in vitro*. Con este propósito, se sintetizaron los compuestos de ARNcd que presentaron los siguientes patrones de modificación:

Compuestos de ARNcd que tienen ribonucleótidos no modificados en la cadena antisentido y en la cadena en sentido, y un excedente de extremo 3' -dTdT tanto en la cadena en sentido como en la cadena antisentido, donde dT designa timidina y dTS designa timidina sin fosfato en el extremo.

El compuesto de ARNcd que tiene ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-metilo (Me) alternados está presente en la primera, tercera, quinta, séptima, novena, decimoprimera, decimotercera, decimoquinta, decimoséptima y decimonovena posición de la cadena antisentido, mediante lo cual la misma modificación, es decir, ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-Metilo están presentes en la segunda, cuarta, sexta, octava, décima, decimosegunda, decimocuarta, decimosexta y decimoctava posición de la cadena en sentido.

5 Se usó el siguiente ensayo para los estudios de actividad *in vitro*.

Ensayo de actividad

10 Se cultivaron alrededor de 1,5-2x10⁵ de células humanas o de rata analizadas que expresan endógenamente los genes p53 (células HCT116 humanas o células REF52 de rata) en placas de 6 pocillos en 1,5 ml de medio de crecimiento durante alrededor de 24 horas hasta 30-50 % de confluencia. Las células luego se transfecaron con el compuesto de ANcd analizado en una concentración final necesaria 0,001-100 nM por pocillo usando reactivos Lipofectamine 2000. A los efectos de determinar la eficacia de transfección del estudio, 5 pocillos se trataron de manera independiente con reactivos Lipofectamine 2000 y se definieron como "muestras de control negativo" y 5 pocillos se transfecaron de manera independiente con ARNcd activo a una concentración final de 5 nM definidos como "muestras activas de control" (control positivo). Se usaron células transfecadas con ARNip etiquetado con Cy3 como control positivo para determinar la eficacia de la transfección. Luego, las células se incubaron en una incubadora a 37±1 °C, 5 % de CO₂ durante 48-72 horas. Las células transfecadas con ARNcd se recolectaron y se aisló el ARN usando el kit EZ-RNA [Biological Industries (#20-410-100)]. Se realizó transcripción inversa de la siguiente manera: se sintetizó ADNc y se determinaron los niveles de mARN p53 humano y/o de rata, de manera acorde mediante qPCR en tiempo real y se normalizaron hasta los de mARN de Ciclofilina A (CYNA, PPIA) para cada muestra. Se determinó la actividad de ARNcd en función de la relación de la cantidad de mARN en muestras tratadas con ARNip versus las muestras de control no transfecadas.

15 20 Como resultado del estudio de actividad, se identificaron las secuencias preferidas para compuestos de ARNcd novedosos para la regulación por disminución del gen p53 (no se muestran los resultados). Estas secuencias se establecen en la Tabla 1, supra (SEQ ID NOS: 8-37)

25 Ejemplo 6: Generación y análisis de compuestos de ácido nucleico de cadena doble modificados

30 Se usaron las secuencias preferidas (SEQ ID NOS: 8-37) para generar compuestos de ácido nucleico de cadena doble modificados. Algunos compuestos de ácido nucleico de cadena doble modificados que se generaron usando las secuencias de cadena antisentido y de cadena en sentido preferidas se establecen en las Tablas N y O, que figuran más adelante. La Tabla P que figura más adelante muestra algunos compuestos de ácido nucleico de cadena doble modificados preferidos que se generaron usando las secuencias de cadena antisentido y de cadena en sentido preferidas (SEQ ID NOS: 8-37).

Tabla N.

| Nombre del dúplex | Cadena en sentido (5'>3') | Cadena antisentido (5'>3') |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| p53_34 | <u>GGAUGUUUGGGAGAUGUAA</u> | <u>UUACAUUCUCCAAACAUCC</u> |
| p53_35 | <u>GACUCAGACUGACAUUCUA</u> | <u>UAGAAUGUCAGUCUGAGUC</u> |
| p53_36 | <u>GGGUUGGUAGUUUCUACAA</u> | <u>UUGUAGAAACUACCAACCC</u> |
| p53_37 | <u>GGGAUGUUUGGGAGAUGUA</u> | <u>UACAUUCUCCAAACAUCCC</u> |
| p53_38 | <u>GGAUCCACCAAGACUUGUA</u> | <u>UACAAGUCUUGGUGGAUCC</u> |
| p53_39 | <u>GAGGGAUGUUUGGGAGAUA</u> | <u>UAUCUCCCAAACAUCCUC</u> |
| p53_40 | <u>GGGCCUGACUCAGACUGAA</u> | <u>UUCAGUCUGAGUCAGGCC</u> |
| p53_41 | <u>GACUCAGACUGACAUUCUU</u> | <u>AAGAAUGUCAGUCUGAGUC</u> |
| p53_42 | <u>GCAUUUGCACCUACCUCAA</u> | <u>UUGAGGUAGGUGCAAUGC</u> |
| p53_43 | <u>GGAUGUUUGGGAGAUGUAU</u> | <u>AUACAUUCUCCAAACAUCC</u> |

| Nombre del dúplex | Cadena en sentido (5'>3') | Cadena antisentido (5'>3') |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|
| p53_44 | <u>GGGCCUGACUGAGACUGAU</u> | <u>AUCAGUCUGAGUCAGGCC</u> |
| p53_45 | <u>CAGACCUAUGGAAACUACA</u> | <u>UGUAGUUUCCAUAGGUUCUG</u> |

En todas las tablas precedentes y en las que figuran más adelante, los nombres de dúplex están identificados por los prefijos "p53" y "TP53" que se utilizan de manera indistinta.

Para todos los compuestos de ARNcd en la Tabla N:

5 A, U, G, C – designa un ribonucleótido no modificado;

A, U, G, C – designa un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo;

10 En diversos ejemplos, en los compuestos de ácido nucleico en la Tabla N, el ribonucleótido en el extremo 3' y en el extremo 5' en cada una de la cadena antisentido y la cadena en sentido puede estar fosforilado o no fosforilado. En algunos ejemplos de los compuestos de ácido nucleico en la Tabla N, en cada una de la cadena antisentido y la cadena en sentido, el ribonucleótido en el extremo 3' está fosforilado y el ribonucleótido en el extremo 5' no está fosforilado. En algunos ejemplos, en cada uno de los compuestos de ácido nucleico de la Tabla N, la cadena antisentido y la cadena en sentido no están fosforiladas en el extremo 3' y en el extremo 5'.

15 Determinados ejemplos de dúplexes para la generación de compuestos de ácido nucleico de cadena doble para la regulación por disminución de un gen p53 se establecen en la presente a continuación en la Tabla O. Se proporcionan dúplexes adicionales en la sección de Ejemplos que figura a continuación.

Tabla O. Dúplexes de p53.

| Nombre del dúplex | En sentido (N')y 5->3 | Antisentido (N)x 5->3 |
|-------------------|------------------------------------------|------------------------------------|
| p53_13 | cap- <u>CAGACCUAUGGAAACUACU</u> -C3-pi | <u>AGUAGUuUCCAUAGGUUCUG</u> -C3-C3 |
| | cap- <u>CAGACCUAUGGAAACaaacu</u> -C3-pi | <u>AGUAGUuUCCAUAGGUUCUG</u> -C3-C3 |
| | cap- <u>CAGACCUAUGGAAACUACU</u> -pi | <u>AGUAGUUUCCAUAGGUUCUG</u> -pi |
| | cap- <u>CAGACCUAUGGAAACaaaca</u> -C3-pi | <u>UGUAGUuUCCAUAGGUUCUG</u> -C3-C3 |
| | cap- <u>CAGACCUAUGGAAACUACA</u> -C3-pi | <u>UGUAGUUUCCAUAGGUUCUG</u> -pi |
| | cap- <u>CAGACCUAUGGAAACUACA</u> -pi | UGUAGUUUCCAUAGGUUCUG |
| | cap- <u>CAGACCUAUGGAAACUACA</u> | UGUAGUUUCCAUAGGUUCUG |
| p53_34 | cap-GGAUGUUUUGGGAGA <u>UGUAA</u> -C3-pi | <u>UUACAUcUCCCAAACAUCC</u> -C3-C3 |
| | cap-GGAUGUUUUGGGAGA <u>Auguaa</u> -C3-pi | <u>UUACAUcUCCCAAACAUCC</u> -C3-C3 |
| | cap-GGAUGUUUUGGGAGA <u>Auguaa</u> -C3-pi | <u>AUACAUcUCCCAAACAUCC</u> -C3-C3 |
| | cap-GGAUGUUUUGGGAGA <u>UGUAU</u> -C3-pi | <u>UUACAUcUCCCAAACAUCC</u> -C3-C3 |
| | cap-GGAUGUUUUGGGAGA <u>Auguau</u> -C3-pi | <u>AUACAUcUCCCAAACAUCC</u> -C3-C3 |
| | GG AUGUUUUGGGAGAUGUAUzdTzdT\$ | AUACAUcUCCCAAACAUCCzdTzdT\$ |

| Nombre del dúplex | En sentido (N')y 5->3 | Antisentido (N)x 5->3 |
|-------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| p53_35 | cap-GACUCAGACUGACAuucua-C3-pi | <u>U</u> AGAAUg <u>U</u> CAGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUCUA</u> -C3-pi | <u>U</u> AGAA <u>U</u> g <u>U</u> CAGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUCUA</u> -C3-pi | <u>U</u> AGAAuGU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUCUA</u> -C3-pi | <u>U</u> AGAAUgU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | GACUCAGACUGACAUUCUAzdTzdT\$ | UAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdT\$ |
| p53_40 | cap-GGCCUGACUCAGAC <u>UGAA</u> -C3-pi | <u>U</u> U <u>C</u> AGU <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUCAGAcugaa-C3-pi | <u>U</u> U <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi | <u>U</u> U <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | csp-GGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi | AU <u>C</u> AGU <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUC <u>AGACU</u> UGAA-C3-pi | <u>U</u> U <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUC <u>AGACU</u> GAU-C3-pi | AU <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUC <u>AGACU</u> UGAA-C3-pi | <u>U</u> U <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | GGGCCUGACUCAGACUGAAzdTzdT\$ | UUCAGUCUGAGUCAGGCCzdTzdT\$ |
| p53_41 | cap-GACUCAGACUGACAuucuu-C3-pi | AAGAA <u>U</u> g <u>U</u> CAGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUCU</u> -C3-pi | AAGAAUgU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUCU</u> -C3-pi | AAGAAUg <u>U</u> CAGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | cap-GACUCAGACUGA <u>CAUUCU</u> -C3-pi | AAGAAuGU <u>C</u> AGUCU <u>G</u> AG <u>U</u> C-C3-C3 |
| | GACUCAGACUGACAUUCUUzdTzdT\$ | AAGAAUGUCAGUCUGAGUCzdTzdT\$ |
| p53_43 | cap-GGAUGUUUGGGAGAugau-C3-pi | AUACAU <u>C</u> U <u>CC</u> AA <u>AC</u> AU <u>CC</u> -C3-C3 |
| | cap-GGAUGUUUGGGAGA <u>UGU</u> AU-C3-pi | <u>A</u> U <u>AC</u> AU <u>C</u> U <u>CC</u> AA <u>AC</u> <u>CA</u> <u>U</u> <u>CC</u> -C3-C3 |
| p53_44 | cap-GGCCUGACUCAGAC <u>UGAU</u> -C3-pi | AU <u>C</u> AGU <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi | AU <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUC <u>AGACU</u> GAU-C3-pi | AU <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| | cap-GGCCUGACUC <u>AGACU</u> GAU-C3-pi | AU <u>C</u> AG <u>C</u> U <u>G</u> AGU <u>C</u> AGGCC-C3-C3 |
| p53_45 | cap- <u>C</u> AGACC <u>UA</u> UGGAA <u>Acuaca</u> -C3-pi | <u>U</u> GU <u>AGU</u> u <u>UCC</u> <u>AU</u> <u>AGG</u> UC <u>U</u> <u>G</u> -C3-C3 |

| Nombre del dúplex | En sentido (N')y 5->3 | Antisentido (N)x 5->3 |
|-------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| | cap- <u>CAGACC</u> UAUGGAAAC <u>UAC</u> A-C3-pi | <u>UGUAG</u> UU <u>UCC</u> AU <u>AGG</u> U <u>CUG</u> -pi |
| | cap-C <u>AGACC</u> U <u>AUGGAAAC</u> U <u>AC</u> A-pi | UGUAGUU <u>UCC</u> AU <u>AGG</u> U <u>CUG</u> |

Para todos los compuestos de ácido nucleico de cadena doble en la Tabla O:

A, U, G, C – designa un ribonucleótido no modificado;

A, U, G, C - designa un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo;

5 a, u, c, g – designa un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace fosfato internucleótido en la posición 2'-5' (5'>3');

10 cap – designa un resto terminal. En algunos ejemplos preferidos, el resto terminal es el grupo que consiste en un resto ribosa abásico, un resto desoxirribosa abásico, un resto desoxirribosa invertido, un resto desoxiabásico invertido (idAb), resto amino-C6 (AM-c6), C6-amino-pi, un resto no nucleótido, un nucleótido espectral, un fosfodiéster butírico de 5,6,7,8-tetrahidro-2-naftaleno (THNB) y un resto conjugado.

pi – designa fosfato 3'.

z- designa el resto terminal

\$ - designa fosfato no terminal

dT\$ - designa timidina (distinta de fosfato)

15 C3 - – designa 1,3-Propanodiol, mono(dihidrógeno fosfato) (C3) [CAS RN: 13507-42-1].

C3-C3 – designa dos moléculas de C3 consecutivas.

En diversos ejemplos de los compuestos de ácido nucleico descritos en la Tabla O, *supra*, el excedente no nucleótido C3-C3 unido covalentemente en el extremo 3' de la cadena antisentido está fosforilado (-C3-C3-pi).

20 En algunos ejemplos de los compuestos de ácido nucleico descritos en la Tabla O, *supra*, en cada uno de los compuestos de ácido nucleico, el ribonucleótido en el extremo 5' en la cadena antisentido está fosforilado. En algunos ejemplos de los compuestos de ácido nucleico descritos en la Tabla O, *supra*, en cada uno de los compuestos de ácido nucleico, el ribonucleótido en el extremo 5' en la cadena antisentido no está fosforilado.

Los compuestos que se muestran en la Tabla P a continuación son realizaciones de inhibidores de p53 temporales para uso de acuerdo con la presente invención.

25

Tabla P

| Compuesto ARNcd | En sentido (N')y 5->3 | Antisentido (N)x 5->3 |
|-----------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| TP53_13_S2275 | C3- <u>CAGACC</u> UAUGGAAAC <u>UAC</u> U-C3-pi | 5' phos-AG <u>UAG</u> UuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi |
| TP53_13_S2276 | C3- <u>CAGACC</u> UAUGGAAAC <u>UAC</u> U-C3-pi | 5' phos-AG <u>UAG</u> UuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi |
| TP53_13_S2277 | C3- <u>CAGACC</u> UAUGGAA <u>Acuacu</u> -C3-pi | 5' phos-AG <u>UAG</u> UuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi |
| TP53_13_S2278 | C3- <u>CAGACC</u> UAUGGAA <u>Acuacu</u> -C3-pi | 5' phos-AG <u>UAG</u> UuUCC <u>AU</u> AGGUC <u>UG</u> -C3;C3-pi |
| TP53_41_S709 | GACUCAGACUGACAUUCUU-dTdT\$ | AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT\$ |
| TP53_41_S2279 | C3-GACUCAGACUGAC <u>CAUUCUU</u> -C3-pi | 5' phos-AAGAA <u>Ug</u> U <u>CAG</u> UC <u>UG</u> AGUC-C3;C3-pi |
| TP53_41_S2298 | C3-OACUCAGACUGAC <u>Auucau</u> -C3-pi | 5' phos-AAGAA <u>Ug</u> U <u>CAG</u> UC <u>UG</u> AGUC-C3;C3-pi |
| TP53_41_S2299 | C3-GACUCAGACUGAC <u>Auncun</u> -C3-pi | 5' phos-AAGAA <u>Ug</u> U <u>CAG</u> UC <u>UG</u> AGUC-C3;C3-pi |
| TP53_41_S2300 | C3-GACUCAGACUGAC <u>CAUUCUU</u> -C3-pi | 5' phos-AAGAA <u>Ug</u> U <u>CAG</u> UC <u>UG</u> AGUC-C3;C3-pi |
| TP53_44_S2301 | C3-GGGCCUGACUCAG <u>Acugau</u> -C3-pi | 5' phos-AU <u>CAG</u> U <u>cUGAGU</u> <u>CAGGCC</u> -C3;C3-pi |

| Compuesto ARNcd | En sentido (N')y 5->3 | Antisentido (N)x 5->3 |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| TP53_44_S2302 | C3-GGGCCUGACUCAGAcugau-C3-pi | 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3:C3-pi |
| TP53_44_S2303 | C3GGGCCUGACUCAGAC <u>U</u> GAU-C3-pi | 5' phos-AUCAGU <u>c</u> UGAGU <u>C</u> AGGCC-C3:C3pi |
| TP53_44_S2304 | C3-GGGCCUGACUCAGAC <u>U</u> GAU-C3-pi | 5' phos-AUCAGUcUGAGUCAGGCC-C3:C3pi |

En todas las tablas precedentes y en las que figuran más adelante, los nombres de dúplex están identificados por los prefijos "p53" y "TP53" que se utilizan de manera indistinta. Por lo tanto, por ejemplo, un compuesto identificado por el prefijo "p53_13" y "TP53_13" designa un compuesto de ácido nucleico de cadena doble que tiene una secuencia de cadena en sentido 5' CAGACCUAUGGAAACUACU 3' (SEQ ID NO:8) y una secuencia de cadena antisentido 5' AGUAGUUUCCAUAGGUCUG 3' (SEQ ID NO: 21).

5

Para todos los compuestos de ARNcd en la Tabla P:

A, U, G, C – designa un ribonucleótido no modificado;

A, U, G, C – designa un ribonucleótido modificado con azúcar 2-O-metilo;

10 a, u, c, g – designa un nucleótido unido a un nucleótido adyacente (5'>3') mediante un enlace fosfato internucleótido en la posición 2'-5';

C3 – designa 1,3-Propanodiol, mono(dihidrógeno fosfato) también identificado como resto terminal 3-Hidroxipropano-1-fosfato [CAS RN: 13507-42-1].

C3C3 – designa un resto terminal que consiste en dos moléculas de C3 consecutivas

15 pi – designa fosfato 3'.

5'-phos – designa fosfato 5'

Estas y otras modificaciones químicas pueden encontrarse, entre otras cosas, en la patente estadounidense y en las publicaciones de solicitudes estadounidenses 8,362,229; 20120283309; 20130035368; 20130324591, otorgadas al cesionario de la presente solicitud.

20 Se estudió la actividad de compuestos de ácido nucleico de cadena doble modificados en células HCT116 humanas y en células REF52 de rata.

La Tabla Q resume los resultados de actividad *in vitro* obtenidos para algunas de las moléculas de ácido nucleico de cadena doble en la línea celular HCT116 humana. Todos los compuestos de ANcd se describen en la Tabla P, supra.

25 El compuesto p53_13_S500 tiene la cadena en sentido SEQ ID NO: 8 y la cadena antisentido SEQ ID NO: 21 y el siguiente patrón de modificación: ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-metilo (Me) alternados están presentes en la primera, tercera, quinta, séptima, novena, decimoprimer, decimotercera, decimoquinta, decimoséptima y decimonovena posición de la cadena antisentido, mediante lo cual la misma modificación, es decir, ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-Metilo están presentes en la segunda, cuarta, sexta, octava, décima, decimosegunda, decimocuarta, decimosexta y decimoctava posición de la cadena en sentido.

30 La actividad *in-vitro* en la Tabla Q se demuestra como el % de mARN diana residual con respecto al control.

Tabla Q

| Descripción de la muestra (compuesto de ARNcd usado) | Concentración del compuesto de ARNdc | % de ARNm residual de p53 de control |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Ninguno (control) | | 100 |
| p53_13_S500 | 50nM | 25 |
| p53_13_S500 | 25nM | 14 |
| p53_13_S500 | 5nM | 33 |
| p53_13_S500 | InM | 55 |
| p53_1_S500 | 50nM | 22 |
| p53_1_S500 | 25nM | 16 |

ES 2 862 185 T3

| Descripción de la muestra (compuesto de ARNcd usado) | Concentración del compuesto de ARNdc | % de ARNm residual de p53 de control |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| p53_1_S500 | 5nM | 52 |
| p53_1_S500 | 1nM | 107 |
| p53_13_S2275 | 50nM | 19 |
| p53_13_S2275 | 25nM | 14 |
| p53_13_S2275 | 5nM | 25 |
| p53_13_S2275 | 1nM | 60 |
| p53_13_S2276 | 50nM | 19 |
| p53_13_S2276 | 25nM | 19 |
| p53_13_S2276 | 5nM | 44 |
| p53_13_S2276 | 1nM | 112 |
| p53_13_S2277 | 50nM | 22 |
| p53_13_S2277 | 25nM | 14 |
| p53_13_S2277 | 5nM | 38 |
| p53_13_S2277 | 1nM | 112 |
| p53_13_S2278 | 50nM | 41 |
| p53_13_S2278 | 25nM | 25 |
| p53_13_S2278 | 5nM | 49 |
| p53_13_S2278 | 1nM | 99 |
| p53_41_S709 | 50nM | 5 |
| p53_41_S709 | 25nM | 8 |
| p53_41_S709 | 5nM | 14 |
| p53_41_S709 | 1nM | 30 |
| p53_41_S2279 | 50nM | 3 |
| p53_41_S2279 | 25nM | 8 |
| p53_41_S2279 | 5nM | 3 |
| p53_41_S2279 | 1nM | 5 |
| p53_41_S2298 | 50nM | 5 |
| p53_41_S2298 | 25nM | 8 |
| p53_41_S2298 | 5nM | 5 |
| p53_41_S2299 | 1nM | |
| p53_41_S2299 | 50nM | 3 |
| p53_41_S2299 | 25nM | 3 |
| p53_41_S2299 | 5nM | 5 |
| p53_41_S2299 | 1nM | 5 |
| p53_41_S2300 | 50nM | 3 |
| p53_41_S2300 | 25nM | 3 |
| p53_41_S2300 | 5nM | 2 |
| p53_41_S2300 | 1nM | 3 |
| p53_44_S2301 | 50nM | 5 |
| p53_44_S2301 | 25nM | 5 |

| Descripción de la muestra (compuesto de ARNcd usado) | Concentración del compuesto de ARNdc | % de ARNm residual de p53 de control |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| p53_44_S2301 | 5nM | 3 |
| p53_44_S2301 | 1nM | 14 |
| p53_44_S2302 | 50nM | 3 |
| p53_44_S2302 | 25nM | 3 |
| p53_44_S2302 | 5nM | 5 |
| p53_44_S2302 | 1nM | 8 |
| p53_44_S2303 | 50nM | 3 |
| p53_44_S2303 | 25nM | 5 |
| p53_44_S2303 | 5nM | 3 |
| p53_44_S2303 | 1nM | 3 |
| p53_44_S2304 | 50nM | 5 |
| p53_44_S2304 | 25nM | 5 |
| p53_44_S2304 | 5nM | 11 |
| p53_44_S2304 | 1nM | 19 |

La Tabla R resume los resultados de actividad *in vitro* obtenidos para algunas de las moléculas de ácido nucleico de cadena doble en la línea celular REF52 de rata.

La actividad *in-vitro* en la Tabla R se demuestra como el % de mARN diana residual con respecto al control.

Tabla R

| Descripción de la muestra (compuesto de ARNcd usado) | Concentración del compuesto de ARNdc | % de ARNm residual de p53 de control |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Control de REF52 | Ninguno | 100 |
| p53_13_S500 | 50nM | 26 |
| | 25nM | 30 |
| | 5nM | 63 |
| | 1nM | 68 |
| p53_41_S709 | 50nM | 40 |
| | 25nM | 87 |
| | 5nM | 96 |
| | 1nM | 211 |
| p53_41_S2279 | 50nM | 38 |
| | 25nM | 20 |
| | 5nM | 21 |
| | 1nM | 60 |
| p53_41_S2298 | 50nM | 137 |
| | 25nM | 81 |
| | 5nM | 71 |
| | 1nM | 113 |
| p53_41_S2299 | 50nM | 116 |
| | 25nM | 122 |

| Descripción de la muestra (compuesto de ARNcd usado) | Concentración del compuesto de ARNdc | % de ARNm residual de p53 de control |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | 5nM | 107 |
| | 1nM | 153 |
| p53_41_S2300 | 50nM | 102 |
| | 25nM | 81 |
| | 5nM | 112 |
| | 1nM | 149 |
| p53_44_S2301 | 50nM | 12 |
| | 25nM | 14 |
| | 5nM | 25 |
| | 1nM | 55 |
| p53_44_S2302 | 50nM | 14 |
| | 25nM | 9 |
| | 5nM | 18 |
| | 1nM | 59 |
| p53_44_S2303 | 50nM | 20 |
| | 25nM | 12 |
| | 5nM | 12 |
| | 1nM | 38 |
| p53_44_S2304 | 50nM | 22 |
| | 25nM | 33 |
| | 5nM | |
| | 1nM | |

Ejemplo 7: Evaluación de la actividad de inactivación de moléculas de ARN de cadena doble usando el sistema psiCHECK™-2

Se prepararon tres construcciones basadas en psiCHECK™-2 (Promega) para evaluar la actividad potencial. Las construcciones de psiCHECK contenían copias únicas de guía complementaria emparejada (AS-CM). Se inocularon 1,3-1,5x10⁶ células HeLa humanas en un disco de 10 cm. Las células luego se incubaron en una incubadora a 37±1 °C, 5 % de CO₂ durante 24 horas. El medio de crecimiento se reemplazó un día luego de la inoculación con 8 ml de medio de crecimiento recién preparado y cada placa se transfectó con uno de los plásmidos mencionados anteriormente, usando reactivo Lipofectamine™ 2000 de acuerdo con el protocolo del fabricante y se incubaron durante 5 horas a 37±1 °C y 5 % de CO₂. Luego de la incubación, las células se volvieron a colocar en placas de 96 pocillos a una concentración final de 5x10³ células por pocillo en 80 µl de medio de crecimiento. Despues de 16 horas, las células se transfectaron con compuesto de ARN de transfección usando reactivo Lipofectamine™ 2000 en concentraciones finales que oscilan entre 0,01 nM y 100 nM en un volumen final de 100 µl. Luego, las células se incubaron durante 48 horas a 37±1 °C luego de la evaluación de actividades de luciferasa de luciérnaga y Renilla como se describe más adelante.

48 horas luego de la transfección con compuesto de ARN de cadena doble, se midieron las actividades de luciferasa de luciérnaga y Renilla en cada una de las muestras transfectadas con ARNip, usando el kit de ensayo Dual-Luciferase® (Promega, Cat#E1960) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Se dividió el valor de actividad de luciferasa de Renilla entre el valor de actividad de luciferasa de luciérnaga para cada muestra (normalización). La actividad de luciferasa de Renilla se expresa finalmente como el porcentaje del valor de actividad normalizado en la muestra analizada con respecto al valor normalizado obtenidos en células transfectadas con el plásmido psiCHECK™-2 correspondiente solamente pero sin ARN de cadena doble.

Los resultados del estudio de actividad en el sistema psiCHECK™-2 (no se muestran los resultados) se usaron para seleccionar las mejores secuencias con mayor actividad para generar un compuesto de ácido nucleico de cadena doble muy activo para regular por disminución el gen p53.

Listado de secuencias

<110> Quark Pharmaceuticals,

Inc. Elizabeth C. SQUIERS

Shai ERLICH

5 Daniel ROTHENSTEIN Nir SHARON

Daniel J. ODENHEIMER

Elena FEINSTEIN

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EVITAR LA LESIÓN POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN ÓRGANOS

<130> 262/PCT1

10 <150> 62/004239

<151> 05-29-2014

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 2586

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 1

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gauugggguu uuccccuccc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuuucucaa | 60 |
| aagcuuagag ccaccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu | 120 |
| cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug acacgcuucc cuggauuggc agccagacug | 180 |
| ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc agucagaucc uagcguccag cccccucuga | 240 |
| gucaggaaac auuuucagac cuauggaaac uacuuccuga aaacaacguu cuguccccc | 300 |
| ugccguccca agcaauggau gauuugaugc ugccccggc cgauauugaa caaugguuca | 360 |
| cugaagaccc agguccagau gaagcuccca gaaugccaga ggcugcuccc cccguggccc | 420 |
| cugcaccagc agcuccuaca ccggcgcccc cugcaccagc cccucccugg cccuguguau | 480 |
| cuucuguccc uucccagaaa accuaccagg gcagcuacgg uuuccgucug ggcuucuugc | 540 |
| auucuggggac agccaagucu gugacuugca cguacucccc ugcccucuac aagauguuuu | 600 |
| gccaacuggc caagaccugc ccugugcagg uguggguuga uuccacaccc ccgccccggca | 660 |
| cccgcguccg cgccaugggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc | 720 |
| gcugccccc ccaugaggcg ugcucagaua gcauguggcu ggccccuccu cagcaucua | 780 |
| uccgagugga aggaaauuug cguguggagu auuuggauga cagaaacacu uuuucgacaua | 840 |
| gugugguggu gcccuaugag cggccugagg uggcucuga cuguaccacc auccacuaca | 900 |
| acuacaugug uaacaguucc ugcaugggcg gcaugaaccg gaggcccauc cucaccauca | 960 |
| ucacacugga agacuccagu gguauacuac ugacggaa cagcuuugag gugcguguuu | 1020 |
| gugccugucc ugacggagac cggccgcacag aggaagagaa ucuccgcaag aaaggggagc | 1080 |

ES 2 862 185 T3

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| cucaccacga gcugccccca gggagcacua agcgagcacu gcccaacaac accagcuuu | 1140 |
| cucccccagcc aaagaagaaa ccacuggaung gagaauauuu cacccuucag auccgugggc | 1200 |
| gugagcgcuu cgagauguuc cgagagcuga augaggccuu ggaacucaag gaugcccagg | 1260 |
| cugggaagga gccagggggg agcagggcuc acuccagcca ccugaaguucc aaaaaggguc | 1320 |
| agucuaccuc cgcgcuaaaa aaacucaugu ucaagacaga agggccugac ucagacugac | 1380 |
| auucuccacu ucuuuguuuccc cacugacagc cucccacccc caucucuccc ucccgugcca | 1440 |
| uuuugggguuu ugggucuuuug aacccuugcu ugcaauaggu gugcgcucaga agcaccagg | 1500 |
| acuuccauuu gcuuuuguccc gggccuccac ugaacaaguu ggccugcacu gguguuuugu | 1560 |
| uguggggagg aggaugggga guaggacaua ccagccuuaga uuuuaagguu uuuacuguga | 1620 |
| gggauguuug ggagauguaa gaauguuucu ugcaguuaag gguuaguuuua caaucagcca | 1680 |
| cauucuaggua agggggccac uucaccguac uaaccaggga agcuguccu cacuguugaa | 1740 |
| uuuucucuua cuucaaggcc cauaucugug aaaaugcuggc auuugcaccu accucacaga | 1800 |
| gugcauugug aggguuuaug aaaaugua caucuggccu ugaaaccacc uuuuauuaca | 1860 |
| uggggucuag aacuugaccc cciuugagggu gciuuguuuccc ucuccuguu ggucgguggg | 1920 |
| uugguaguuu cuacaguugg gcagcugguu agguagaggg aguugucaag ucucugcugg | 1980 |
| cccagccaaa cccugucuga caaccucuug gugaaccuuua guaccuaaaa ggaaaucuca | 2040 |
| ccccauccca cacccuggag gauucaucu cuuguauaug augaucugga uccaccaaga | 2100 |
| cuuguuuuau gcucaggguc aauuucuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuuuu ucuuuuuucuu | 2160 |
| ugagacuggg ucucgguuuug uugccaggc uggaguggag uggcgcugauc uuggcnuuacu | 2220 |
| gcagccuuug ccuuccccggc ucgagcaguc cugccucagc cuccggagua gcugggacca | 2280 |
| cagguucaug ccaccauggc cagccaacuu uugcauguuu uguagagaug gggucucaca | 2340 |
| guguugccca ggcuggucuc aaacuccugg gcucaggcga uccaccuguc ucagccucc | 2400 |
| agagugcugg gauuacaauu gugagccacc acguccagcu ggaaggguca acaucuuua | 2460 |
| cauucugcaa gcacaucugc auuuucaccc cacccuuccc cuccuucucc cuuuuuauau | 2520 |
| cccauuuuua uaucgaucuc uuauuuuaca auaaaacuuu gcugccaccu gugugucuga | 2580 |
| ggggug | 2586 |
| <210> 2 | |
| <211> 2583 | |
| <212> ARN | |
| <213> Homo_Sapiens | |
| <400> 2 | |
| gauugggguu uuccccuccc augugcuuaa gacuggcgcu aaaaguuuuug agcuucucaa | 60 |
| aagucuagag ccaccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu | 120 |

ES 2 862 185 T3

| | |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug acacgcuucc cuggauuggc cagacugccu | 180 |
| uccgggucac ugccauggag gagccgcagu cagaucuaq cgucgagccc ccucugagc | 240 |
| aggaaacauu uucagaccua uggaaacuac uuccugaaaa caacguucug ucccccugc | 300 |
| cgucccaagc aauggaugau uugaugcugu ccccgacga uauugaacaa ugguucacug | 360 |
| aagacccagg uccagauagaa gcucccagaa ugccagaggc ugcucccccc guggccccug | 420 |
| caccagcgc uccuacacccg gcggcccccug caccagcccc cuccuggccc cugucaucuu | 480 |
| cugucccuuc ccagaaaacc uaccaggca gcuacgguuu cgcugggc uucuugcauu | 540 |
| cugggacagc caagucugug acuugcacgu acuucccugc ccuacaacaag auguuuugcc | 600 |
| aacuggccaa gaccugccu gugcaggcugu ggguugauuc cacaccccg cccggcaccc | 660 |
| gcguccgcgc cauggccauc uacaaggcagu cacagcacau gacggaggguu gugaggcgcu | 720 |
| gc(ccccacca ugagcgcugc ucagauagcg auggugcugc cccuccucag caucuuaucc | 780 |
| gaguggaagg aaauuugcgu guggaguauu uggaugacag aaacacuuuu cgacauagug | 840 |
| ugguggugcc cuaugagccg ccugagguug gcucugacug uaccaccauc cacuacaacu | 900 |
| acauguguaa caguuccugc augggcggca ugaaccggag gcccuccuc accaucauca | 960 |
| cacuggaaga cuccaguggu aaucuacugg gacggaacag cuuugaggug cguguuugug | 1020 |
| ccuguccugg gagagaccgg cgcacagagg aagagaaucu cgcagaaaa ggggagccuc | 1080 |
| accacgagcu gccccccagg agcacuaagc gagcacugcc caacaacacc agcuccucuc | 1140 |
| cccagccaaa gaagaaacca cuggauggag aaauuuucac cciucagauc cgugggceug | 1200 |
| agcgciucga gaugiuuccga gagcugaaug aggccuugga acucaaggau gcccaggcug | 1260 |
| ggaaggagcc aggggggagc agggcucacu ccagccaccu gaaguccaaa aagggucagu | 1320 |
| cuaccucccg ccauaaaaaaa cucauguuca agacagaagg gcuugacuca gacugacauu | 1380 |
| cuccacuuuc uguuuccccac ugacagccuc ccaccccau cucuccucc ccugccauuu | 1440 |
| ugguuuugg gcuuugaaac ccuugcugc aauaggugug cgucagaagc acccaggacu | 1500 |
| uccauuugcu uugucccggg gcuccacuga acaaguuggc cugcacuggu guuuuguug | 1560 |
| ggggaggagg auggggagua ggacauacca gcuuagauuu uaagguuuuu acugugaggg | 1620 |
| auguuuugga gauguaagaa auguuuucugc aguuuagggu uaguuuacaa ucagccacau | 1680 |
| ucuaggugagg ggcccacuuuc accguacuua ccagggaaagc ugucuccucac uguugaaauuu | 1740 |
| ucucuaacuu caaggcccac uucugugaaa ugcuggcauu ugcaccuacc ucacagagug | 1800 |
| cauugugagg guuaaugaaa uaauguacau cuggccuuga aaccaccuuu uauuacaugg | 1860 |
| ggucuagaac uugaccccu uggaggugc uguuuccucu cccuguuuggu cgguggguug | 1920 |
| guaguuucua caguugggca gcugguuagg uagagggagu ugucaagucu cugcuggccc | 1980 |

ES 2 862 185 T3

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| agccaaaccc ugucugacaa ccucuuggug aaccuuagua ccuaaaagga aaucucaccc | 2040 |
| caucccacac ccuggaggau uucaucucuu guauauggaug aucuggaucc accaagacuu | 2100 |
| guuuuaugcu cagggucaau uucuuuuuuuc uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuucuuuga | 2160 |
| gacugggucu cgcuuuguug cccagggcugg aguggagugg cgugauuuug gcuuacugca | 2220 |
| gccuuugccu cccggcucg agcaguccug ccucagccuc cggaguagcu gggaccacag | 2280 |
| guucaugcca ccauggccag ccaacuuuuug cauguuuugu agagaugggg ucucacagug | 2340 |
| uugcccaggc ugguccuaaa cuccugggcu caggcgaucc accugucuca gccucccaga | 2400 |
| gugcugggau uacaauugug agccaccacg uccagcugga agggucaaca ucuuuuacau | 2460 |
| ucugcaagca caucugcaau uucaccccac ccuuccccuc cuucuccuuu uuuauauccc | 2520 |
| auuuuuauau cgaucucuuua uuuuacaaaua aaacuuugcu gccaccugug ugucugaggg | 2580 |
| gug | 2583 |
| <210> 3 | |
| <211> 2719 | |
| <212> ARN | |
| <213> Homo_Sapiens | |
| <400> 3 | |
| gauugggguu uccccuccc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuucucaa | 60 |
| aagucuagag ccacccgucca gggagcaggu agcugcuggg cuccggggac acuuugcguu | 120 |
| cggcuggga gcgugcuiuc cacgacggug acacggcucc cuggauuggc agccagacug | 180 |
| ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc agucagaucc uagcgucgag ccccccucuga | 240 |
| gucaggaaac auuuucagac cuauggaaac uacuuccuga aaacaacguu cuguccccc | 300 |
| ugccguccca agcaauggau gauuugugc ugccccggg cgauauugaa caauugguca | 360 |
| cugaagaccc agguccagau gaagcuccca gaaugccaga ggcugcuccc cccugggccc | 420 |
| cugcaccagc agcuccuaca cggcgcccc cugcaccagc cccuccugg cccuguguau | 480 |
| cuucuguccc uucccagaaa accuaccagg gcagcuacgg uiuccgucug ggcuucuugc | 540 |
| auucugggac agccaagucu gugacuugca cguacucccc ugcccucuac aagauguuu | 600 |
| gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc uguggguuga uiuccacaccc ccgccccggca | 660 |
| cccgcgucgg cgcccauggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc | 720 |
| gcugccccc ccaugagcgc ugcucagaua gcgauggucu ggccccuccu cagcaucuu | 780 |
| uccgagugga aggaaauuug cguguggagu auuuggauga cagaaacacu uiucgacaua | 840 |
| gugugguggu gcccuaugag ccgcugagg uuggcucuga cuguaccacc auccacuaca | 900 |
| acuacauugug uaacaguucc ugcaugggagc gcaugaaccg gaggcccauc cucaccauca | 960 |
| ucacacugga agacuccagu gguaaucuac uggaacggaa cagcuuugag gugguguuu | 1020 |

ES 2 862 185 T3

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| gugccugucc | ugggagagac | cggcgcacag | aggaagagaa | ucuccgcaag | aaaggggagc | 1080 |
| cucaccacga | gcugcccca | gggagcacua | agcgagcacu | gcccaacaac | accagcuccu | 1140 |
| cuccccagcc | aaagaagaaa | ccacuggaung | gagaauauuu | cacccuucag | gaccagacca | 1200 |
| gcuuucaaaa | agaaaauugu | uaaagagagc | augaaaaugg | uucuaugacu | uugccugaua | 1260 |
| cagaugcuac | uugacuuacg | augguguuac | uuccugauaa | acucgucgua | aguugaaaaau | 1320 |
| auuauccgug | ggcgugagcg | cuucgagaaug | uuccgagagc | ugaaugaggc | cuuggaacuc | 1380 |
| aaggaugccc | aggcugggaa | ggagccaggg | gggagcaggg | cucacuccag | ccaccugaag | 1440 |
| uccaaaaagg | gucagucuac | cucccgccau | aaaaaacuca | uguucaagac | agaagggccc | 1500 |
| gacucagacu | gacauucucc | aciuuuuguu | ccccacugac | agccucccac | ccccaucu | 1560 |
| cccuccccug | ccauuuuggg | uuuugggu | uugaacccuu | gciugcaaua | ggugugcgc | 1620 |
| agaagcaccc | aggacuucca | uuugcuuuug | cccgccccuc | cacugaacaa | guuggccugc | 1680 |
| acugguguuu | uguugugggg | aggaggaugg | ggaguaggac | auaccagc | uuuuaag | 1740 |
| guuuuuacug | ugaggggaugu | uugggagaaug | uaagaaaaugu | uciugcagu | aaggguuagu | 1800 |
| uuacaaucag | ccacauucua | gguaggggccc | cacuucaccg | uacuaaccag | ggaagcuguc | 1860 |
| ccucacuguu | gaauuuucuc | uaacuucaag | gcccuaaucu | gugaaaugc | ggcauuugca | 1920 |
| ccuaccucac | agagugcauu | gugaggguua | augaaaaau | guacaucugg | ccuugaaacc | 1980 |
| accuuuuauu | acaugggguc | uagaacuu | ccccc | uugagag | ggugc | 2040 |
| guuggucgg | ggguugguag | uuuucacagu | ugggcagcug | guuagguaga | gggaguug | 2100 |
| aagucucugc | uggcc | aaacc | ugacaaccuc | uuggugaacc | uuaguaccua | 2160 |
| aaaggaaauc | ucaccccauc | ccacacccug | gaggauu | ucucuu | augaugaucu | 2220 |
| ggauccacca | agacuuguuu | uaugcucagg | gucauuu | uuuuu | uuuuuuuuuu | 2280 |
| uuuuu | uuuugagacu | gggucucgg | uuguuug | ggc | ggc | 2340 |
| aucuuggc | acugcagcc | uugccucc | ggc | ucg | aggc | 2400 |
| guagc | ccacagg | augcc | g | cc | cc | 2460 |
| augg | g | g | u | u | u | 2520 |
| guc | cc | cc | ag | u | u | 2580 |
| ucaaca | u | u | u | u | u | 2640 |
| uuacau | u | u | u | u | u | 2700 |
| ccu | u | u | u | u | u | 2719 |

<210> 4

<211> 2646

<212> ARN

<213> Homo_Sapiens

<400> 4

ES 2 862 185 T3

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| gauugggguu ucccccuccc augugcucaa gacuggcgcu aaaaguuuug agcuucucaa | 60 |
| aagcuagag ccaccgucca gggagcgagg gucugcuggg cuccggggac acuuugcguu | 120 |
| cgggcuggga gcgugcuuuc cacgacggug acacgcuucc cuggauuggc agccagacug | 180 |
| ccuuccgggu cacugccaug gaggagccgc agucagaucc uagcgucgag cccccucuga | 240 |
| gucaggaaac auuuucaagac cuauggaaac uacuuccuga aaacaacguu cuguccccc | 300 |
| ugccguccca agcaauggau gauuuugauc ugccccggc cgauauugaa caauggguuca | 360 |
| cugaagaccc agguccagau gaagcuccca gaaugccaga ggcugcuccc cccguggccc | 420 |
| cugcaccagc agcuccuaca ccggcggccc cugcaccagc cccuccugg cccugucau | 480 |
| cuucuguccc uuuccagaaa accuaccagg gcaugcuacgg uuuccgucug ggcuucuugc | 540 |
| auucugggac agccaagucu gugacuugca cguacucccc ugcccuaac aagauguuu | 600 |
| gccaacuggc caagaccugc ccugugcagc uguggguuga uuccacaccc cggccggca | 660 |
| cccgcguccg cgccaugggcc aucuacaagc agucacagca caugacggag guugugaggc | 720 |
| gcugccccc ccaugagcgc ugcucagaua gcaugggucu ggccccuccu cagcaucuu | 780 |
| uccgagugga aggaaauuug cguguggagu auuuggauga cagaaacacu uuucgacaua | 840 |
| gugugguggu gcccuaugag cgcgcugagg uuggcucuga cuguaccacc auccacuaca | 900 |
| acuacaugug uaacaguucc ugcaugggcg gcaugaaccg gaggcccauc cucaccauca | 960 |
| ucacacugga agacuccagu gguauaucuac ugggacggaa cagcuuugag gugcguguuu | 1020 |
| gugccuqucc ugggagagac cggcccacag aggaagagaa ucuccgcaag aaaggggagc | 1080 |
| cucaccacga cgugccccc gggagcacua agcgagcacu gcccaacaac accagcuccu | 1140 |
| cucccccagcc aaagaagaaa ccacuggaug gagaauauuu cacccuucag augcuacuug | 1200 |
| acuuacgaug guguuacuuc cugauuaacu cgucguaagu ugaaaaauuu auccgugggc | 1260 |
| gugagcgcuu cgagauguuc cgagagcuga augaggccuu ggaacucaag gaugcccagg | 1320 |
| cugggaagga gccaggggg agcagggcuc acuccagcca ccugaaguucc aaaaaggguc | 1380 |
| agucuaccuc cgcgc当地 aacucaugu ucaagacaga agggccugac ucagacugac | 1440 |
| auucuccacu cuuuguuccc cacugacagc cucccacccc caucucuccc uccucugcca | 1500 |
| uuuuggguuu ugggucuuug aacccuugcu ugcaauaggu gugcgucaga agcaccagg | 1560 |
| acuuuccauuu gcuuugguuccc ggggcuccac ugaacaaguu ggccugcacu gguguuuuugu | 1620 |
| uguggggagg aggaugggga guaggacaua ccagcuuaga uuuuaagggu uuuacuguga | 1680 |
| gggauguuug ggagauguaa gaaauguucu ugcaguuaag gguuaguua caaucagcca | 1740 |
| cauucuaggu agggcccac uucaccguac uaaccaggga agcuguccu cacuguugaa | 1800 |
| uuuucucuua cuucaaggcc cauauucugug aaaugcuggc auuugcaccu accucacaga | 1860 |

ES 2 862 185 T3

| | | | | | | |
|--------------------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|------|
| gugcauugug | aggguuuaug | aaauuaugua | caucuggccu | ugaaaccacc | uuuuauuuaca | 1920 |
| uggggucuag | aacuugaccc | ccuugagggu | gcuuguuucc | ucucccuguu | ggucgguggg | 1980 |
| uugguaguuu | cuacaguugg | gcagcugguu | agguagaggg | aguugucaag | ucucugcugg | 2040 |
| cccagccaaa | cccugucuga | caaccucuug | gugaaccuuua | guaccuaaaa | ggaaaucuca | 2100 |
| ccccauccca | caccugggag | gauuucaucu | cuuguaauug | augaucugga | uccaccaaga | 2160 |
| cuuguuuuau | gcucaggguc | aauuucuuuu | uucuuuuuuu | uuuuuuuuuu | ucuuuuucuu | 2220 |
| ugagacuggg | ucucgcuuug | uugcccaggc | uggaguggag | uggcgugauc | uuggcuuacu | 2280 |
| gcagccuuug | ccuuccccggc | ucgagcaguc | cugccucagc | cuccggagua | gcugggacca | 2340 |
| cagguucaug | ccaccauggc | cagccaacuu | uugcauguuu | uguagagaug | gggucucaca | 2400 |
| guguugccca | ggcugggucuc | aaacuccugg | gcucaggcg | uccaccuguc | ucagccuccc | 2460 |
| agagugcugg | gauuacaauu | gugagccacc | acguccaggc | ggaaggguca | acaucuuuu | 2520 |
| cauucugcaa | gcacaucugc | auuuucaccc | cacccuuccc | cuccuucucc | cuuuuuauau | 2580 |
| cccauuuuua | uaucgaucuc | uuauuuuaca | auaaaacuuu | gcugccaccu | gugugucuga | 2640 |
| ggggug | | | | | | 2646 |
| <210> 5 | | | | | | |
| <211> 2271 | | | | | | |
| <212> ARN | | | | | | |
| <213> Homo_Sapiens | | | | | | |
| <400> 5 | | | | | | |
| ugaggccagg | agauggaggg | ugcagugaggc | ugugaucaca | ccacugugcu | ccagccugag | 60 |
| ugacagagca | agacccuauc | ucaaaaaaaaaa | aaaaaaaaaa | gaaaagcucc | ugagguguag | 120 |
| acgccaacuc | ucucuagcuc | gcuagugggu | ugcaggaggu | gcuuacgcau | guuuguuuucu | 180 |
| uugcugccgu | cuuccaguug | cuuuaucugu | ucacuugugc | ccugacuuuc | aacucugucu | 240 |
| ccuuccucuu | ccuacaguac | uccccugccc | ucaacaagau | guuuugccaa | cuggccaaga | 300 |
| ccugccugu | gcagcugugg | guugauucca | caccccgccc | cggcacccgc | guccgcgc | 360 |
| uggccaucua | caagcaguca | cagcacauga | cggagguugu | gaggcgugc | ccccaccaug | 420 |
| agcgcugcuc | agauagcga | ggucuggccc | cuccucagca | ucuuauccga | guggaaggaa | 480 |
| auuugcgugu | ggaguauuug | gaugacagaa | acacuuuuucg | acauagugug | guggugccu | 540 |
| augagccgccc | ugagguuggc | ucugacugua | ccaccaucca | cuacaacuac | auguguaaca | 600 |
| guuccugcau | gggcggcaug | aaccggaggc | ccauccucac | caucaucaca | cuggaagacu | 660 |
| ccagugguaa | ucuacuggga | cggaacagcu | uugaggugcg | uguuugugcc | uguccuggga | 720 |
| gagaccggcg | cacagaggaa | gagaauucc | gcaagaaagg | ggagccucac | cacgagcugc | 780 |
| ccccagggag | cacuaagcga | gcacugccca | acaacaccag | cuccucuccc | cagccaaaga | 840 |

ES 2 862 185 T3

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| agaaaaccacu ggauggagaa uauuuucaccc uucagauccg ugcccugag cgcuucgaga | 900 |
| uguuccgaga gcugaaugag gccuuggaac ucaaggauug ccaggcuggg aaggagccag | 960 |
| gggggagcag ggcucacucc agccaccuga aguccaaaaa gggucagucu accucccggcc | 1020 |
| auaaaaaaacu cauguucaag acagaagggc cugacucaga cugacauucu ccaciuuug | 1080 |
| uuccccacug acagccuccc acccccacu cucccucccc ugccauuuug gguuuugggu | 1140 |
| cuuugaaccc uugcuugcaa uaggugugcg ucagaagcac ccaggacuuc cauugcuuu | 1200 |
| gucccggggc uccacugaac aaguuggccu gcacuggugu uuuuugugg ggaggaggau | 1260 |
| ggggaguagg acauaccagc uuagauuuua agguuuuuac ugugagggau guuugggaga | 1320 |
| uguaagaaaa guucuugcag uuaaggguua guuuacaauc agccacauuc uagguaagggg | 1380 |
| cccacuucac cguacuaacc agggaaagcug uccucacug uugaauuuuc ucuaaciuca | 1440 |
| aggcccacauu cugugaaaug cuggcauuug caccuaccuc acagagugca uugugagggu | 1500 |
| uaaugaaaaa auguacauuc ggccuugaaa ccaccuuuuua uuacaugggg ucuagaacuu | 1560 |
| gaccccuuug agggugcug uuccucucc cuguuggugc guggguuggu aguuuucuaca | 1620 |
| guugggcagc ugguuaggua gagggaguug ucaagucucu gcuggccag ccaaaccug | 1680 |
| ucugacaacc ucuuggugaa ccuuaguacc uaaaaggaaa ucucacccca ucccacaccc | 1740 |
| uggaggauuu caucucuugu auaugaughau cuggauccac caagacuugu uuuuugcuca | 1800 |
| gggucaauuu cuuuuuucuu uuuuuuuuuu uuuuuuucuuu uucuuugaga cuggucucg | 1860 |
| cuuuguugcc caggcuggag ugagggcg ugaucuuggc uuacugcagc cuuugccucc | 1920 |
| ccggcucgag caguccugcc ucagccuccg gaguagcugg gaccacaggu ucaugccacc | 1980 |
| auggccagcc aacuuuugca uguuuuguag agaugggguc ucacaguguu gcccaggcug | 2040 |
| gucucaaaccu ccugggcuca ggcgauccac cugucucagc cuccagagu gcugggauua | 2100 |
| caauugugag ccaccacguc cagcuggaag gguacaacauc uuuuacauuc ugcaagcaca | 2160 |
| ucugcauuuu caccccaccc uuccccuccu ucuccuuuu uauaucccau uuuuauaucg | 2220 |
| aucucuuuuu uuacaauaaa acuuugcugc caccugugug ucugaggggu g | 2271 |
| <210> 6 | |
| <211> 2404 | |
| <212> ARN | |
| <213> Homo_Sapiens | |
| <400> 6 | |
| ugaggccagg agauggagggc ugcagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag | 60 |
| ugacagagca agacccuauc ucaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaagcucc ugagguguag | 120 |
| acgccaacuc ucucuagcuc gcuagugggu ugcaggaggu gcuuacgcau guuuguuucu | 180 |
| uugcugccgu cuuccaguug cuuuauugc uacacuugugc ccugacuuuc aacucugucu | 240 |

ES 2 862 185 T3

| | |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| ccuuccucuu ccuacaguac uccccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga | 300 |
| ccugccugu gcagcugugg guugauucca cacccccgccc cggcacccgc guccgcgcca | 360 |
| uggccaucua caagcaguca cagcacauga cggagguugu gaggcgugc ccccaccaug | 420 |
| agcgugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuuauccga guggaaggaa | 480 |
| auuuugcugu ggaguauuuug gaugacagaa acacuuuuucg acauagugug guggugccu | 540 |
| augagccgccc ugagguuggc ucugacugua ccaccaucua cuacaacuac auguguaaca | 600 |
| guuccugcau gggcggcaug aaccggaggc ccauccucac caucaucaca cuggaagacu | 660 |
| ccagugguaa ucuacuggga cggAACAGCU uugaggugcg uguuuugugcc uguccuggga | 720 |
| gagaccggcg cacagaggaa gagaauuccc gcaagaaagg ggagccucac cacgagcugc | 780 |
| ccccagggag cacuaagcga gcacugccca acaacaccag cuccucuccc cagccaaaga | 840 |
| agaaaccacu ggauggagaa uauuuacccc uucaggacca gaccagcuuu caaaaagaaa | 900 |
| auuguuuaag agagcaugaa aaugguuicua ugacuuuugcc ugauacagau gcuacuugac | 960 |
| uuacgauggu guuacuuccu gauaaacucg ucguauugu aaaaauuuau ccgugggcgu | 1020 |
| gagcgcuucg agauguuccg agagcugaaau gaggccuugg aacucaagga ugcccaggcu | 1080 |
| gggaaggagc cagggggag cagggcucac uccagccacc ugaaguuccaa aaagggucag | 1140 |
| ucuacucccc gccaauaaaaa acucauguuc aagacagaag ggccugacuc agacugacau | 1200 |
| ucuccacuuc uuguuuccca cugacagccu cccacccca ucucuccuc cccugccauu | 1260 |
| uugguuuuug ggucuuuugaa cccuugcuug caauaggugu gcgucagaag caccaggac | 1320 |
| uuccauuugc uugguucccg ggcuccacug aacaaguugg ccugcacugg uguuuuuguu | 1380 |
| uggggaggag gauggggagu aggacauacc agcucuagau uuaagguuuu uacugugagg | 1440 |
| gauguuuuggg agauguaaga aauguucuug caguuaaggg uuaguuuaca aucagccaca | 1500 |
| uucuagguag gggcccacuu caccguacua accagggaaag cuguccuca cuguugaauu | 1560 |
| uucucuaacu ucaaggccca uaucuugaa augcuggcau uugcaccuac cucacagagu | 1620 |
| gcauugugag gguuaugaa auaauguaca ucuggccuug aaaccaccuu uuauuacaug | 1680 |
| gggucuagaa cuugacccccc uugaggugc uuguuucccuc ucccuguugg ucgguggguu | 1740 |
| gguaguuuucu acaguugggc agcugguuag guagagggag uugucaaguc ucugcuggcc | 1800 |
| cagccaaacc cugucugaca accucuuggu gaaccuuagu accuaaaagg aaaucucacc | 1860 |
| ccauccaca cccuggagga uuucaucucu uguauauggau gaucuggauc caccaagacu | 1920 |
| uguuuuuaugc ucagggucaa uuuuuuuuuu cuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuc uuuuuuucuuug | 1980 |
| agacugggguc ucgcuuuuguu gcccaggcug gaguggagug gcgugauuu ggcuuuacugc | 2040 |
| agccuuuugcc uccccggcuc gagcaguuccu gccucagccu ccggaguagc ugaccacaca | 2100 |
| gguucaugcc accauggccca gccaacuuuu gcauguuuug uagagauugg gucucacagu | 2160 |
| guugcccagg cuggucucaa acuccuggc ucaggcgauc caccugucuc agccucccag | 2220 |
| agugcuggga uuacaaauugu gagccaccac guccagcugg aaggguacaac aucuuuuaca | 2280 |
| uucugcaagc acaucugcau uuuacccca cccuucuccu cciucuccu uuuuaauucc | 2340 |
| cauuuuuauua ucgaucucuu auuuuacaaau aaaacuuuugc ugccaccugu gugucugagg | 2400 |
| ggug | 2404 |

ES 2 862 185 T3

<210> 7

<211> 2331

<212> ARN

<213> Homo_Sapiens

<400> 7

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ugaggccagg agauggaggc ugcagugagc ugugaucaca ccacugugcu ccagccugag | 60 |
| ugacagagca agacccuauc ucaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagccuug ugagguguag | 120 |
| acgccaacuc ucucuagcuc gcuaguggu ugcaggaggu gcuuacgcau guuuguuuu | 180 |
| uugcugccgu cuuccaguug cuuuaucugu ucacuugugc ccugacuuuc aacucugucu | 240 |
| ccuuuccucuu ccuacaguac uccccugccc ucaacaagau guuuugccaa cuggccaaga | 300 |
| ccugccucgu gcagcugugg guugauucca caccggccgc cgccacccgc guccgcgcca | 360 |
| uggccaucua caagcaguca cagcacaua cggaggugug gaggcgcugc ccccaccaug | 420 |
| agcgcugcuc agauagcgau ggucuggccc cuccucagca ucuuauccga guggaaggaa | 480 |
| auuugcgugu ggaguauuug gaugacagaa acacuuuucg acauagugug guggugccu | 540 |
| augagccgccc ugagguuggc ucugacugua ccaccaucca cuacaacuac auguguaaca | 600 |
| guuccugcau gggccggcaug aaccggaggc ccauccucac caucacaca cuggaagacu | 660 |
| ccagugguaa ucuacuggga cggAACAGCU uugaggugcg uguuugugcc uguccuggga | 720 |
| gagaccggcg cacagaggaa gagaauuccc gcaagaaagg ggagccucac cacgagcugc | 780 |
| ccccagggag cacuaaggcga gcacugccca acaacaccag cuccucuccc cagccaaaga | 840 |
| agaaaccacu ggauggagaa uauuucaccc uucagauugcu acuugacuuua cgaugguguu | 900 |
| aciuccugau aaacucugucg uaaguugaaa auauuauccg ugcccugag cgciucgaga | 960 |
| uguuccgaga gcugaaugag gcccuggaac ucaaggauug ccaggcuggg aaggagccag | 1020 |
| gggggagcag ggcucacucc agccaccuga aguccaaaaa gggucagucu accuccggcc | 1080 |
| auaaaaaaaaacu cauguucaag acagaaggcugacugacuacu ccacuuucuug | 1140 |
| uuccccacug acagccuccc acccccaucu cucccucccc ugccauuuug gguuugggu | 1200 |
| cuuugaaccc uugcuugcaa uaggugugcg ucagaagcac ccaggacuuuc cauugcuuu | 1260 |
| gucccggggc uccacugaac aaguuggccu gcacuggugu uuuguugugg ggaggaggau | 1320 |

ES 2 862 185 T3

| | | |
|----|---------------------------------------------------------------------|------|
| | ggggaguagg acauaccagc uuagauuuua agguuuuuac ugugagggau guuuggaga | 1380 |
| | uquaqaaau quucuugcag uuaagguaa guuuacaauc agccacauuc uagguaagggg | 1440 |
| | cccacuucac cguacuaacc agggaagcug ucccucacug uugaauuuuc ucuaacuuca | 1500 |
| | aggccauau cugugaaaug cuggcauuug caccuaccuc acagagugca uugugagggu | 1560 |
| | uaaugaaaua auguacaucu ggcuugaaa ccaccuuua uuacaugggg ucuagaacuu | 1620 |
| | gaccccccug agggugcuug uucccucucc cuguuggucg guggguuggu aguuuucuaca | 1680 |
| | guugggcagc ugguuaggua gagggaguug ucaagucucu gcuggccag ccaaaccug | 1740 |
| | ucugacaacc ucuuggugaa ccuaguacc uaaaaggaaa ucucacccca ucccacaccc | 1800 |
| | uggaggauuu caucucuugu auaugaugau cuggauccac caagacuugu uuuuugcuca | 1860 |
| | gggucaauuu cuuuuuuucuu uuuuuuuuuu uuuuuuucuuu uucuuugaga cugggucucg | 1920 |
| | cuuugguugcc caggcuggag ugagugggcg ugaucuuggc uuacugcagc cuuugccucc | 1980 |
| | ccggcucgag caguccugcc ucagccuccg gaguagcugg gaccacaggu ucaugccacc | 2040 |
| | auggccagcc aacuuuugca uguuuuguag agaugggguc ucacagugu gcccaggcug | 2100 |
| | gucucaaaccu ccugggcuca ggcgauccac cugucucagc cuccagagu gcugggauua | 2160 |
| | caauugugag ccaccacguc cagcuggaag gguacaacauc uuuuacauuc ugcaagcaca | 2220 |
| | ucugcauuuu caccccaccc uuccccuccu ucuccuuuu uauaucccau uuuuauaucg | 2280 |
| | aucucuuuuu uuacaauaaa acuuugcugc caccugugug ucugaggggu g | 2331 |
| | <210> 8 | |
| | <211> 19 | |
| | <212> ARN | |
| 5 | <213> artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sintetizado químicamente | |
| | <400> 8 | |
| | cagaccuaug gaaacuacu 19 | |
| 10 | <210> 9 | |
| | <211> 19 | |
| | <212> ARN | |
| | <213> artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Sintetizado químicamente | |
| | <400> 9 | |
| | ggauguuugg gagauguaa 19 | |
| | <210> 10 | |
| | <211> 19 | |
| 20 | <212> ARN | |

<213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 10
 5 gacucagacu gacauucua 19
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 11
 ggguugguag uuucuacaa 19
 <210> 12
 15 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 20 <400> 12
 gggauuuug ggagaugua 19
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 13
 ggauccacca agacuugua 19
 30 <210> 14
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 14
 gagggauuu ugaaagaua 19

<210> 15
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 15
 gggccugacu cagacugaa 19
 <210> 16
 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 16
 gacucagacu gacauucuu 19
 <210> 17
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 17
 gcauuugcac cuaccucaa 19
 25 <210> 18
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 18
 ggauguuugg gagauguau 19
 <210> 19
 <211> 19
 35 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>

<223> Sintetizado químicamente
 <400> 19
 gggccugacu cagacugau 19
 <210> 20
 5 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 10 <400> 20
 cagaccuaug gaaacuaca 19
 <210> 21
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 21
 aguaguuuucc auaggucug 19
 20 <210> 22
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 22
 uuacaucucc caaacaucc 19
 <210> 23
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 23
 35 uagaauguca gucugaguc 19
 <210> 24
 <211> 19

<212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 5 <400> 24
 uuguagaaac uaccaaccc 19
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 25
 uacaucuccc aaacauccc 19
 15 <210> 26
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 26
 uacaagucuu gguggaucc 19
 <210> 27
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 27
 30 uaucucccaa acaucccuc 19
 <210> 28
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 28

uucagucuga gucaggccc 19
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ARN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 29
 aagaauguca gucugaguc 19
 10 <210> 30
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 30
 uugagguaagg ugcaaaugc 19
 <210> 31
 <211> 19
 20 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 31
 25 auacaucucc caaacaucc 19
 <210> 32
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 32
 aucagucuga gucaggccc 19
 <210> 33
 35 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 33

uguaguuucc auaggucug 19

5 <210> 34

<211> 19

<212> ARN

<213> artificial

<220>

10 <223> Sintetizado químicamente

<400> 34

ccgaguggaa gaaaaauug 19

<210> 35

<211> 19

15 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 35

20 caaauuuucc uccacucgg 19

<210> 36

<211> 19

<212> ARN

<213> artificial

25 <220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 36

gagaauauuu cacccuaca 19

<210> 37

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

35 <400> 37

ugaaggugua aauauucuc 19

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor temporal de un gen p53 para uso en la profilaxis de la lesión por isquemia-reperfusión (IRI) en un riñón en riesgo de IRI, proporcionando la profilaxis de IRI profilaxis de la lesión renal aguda (AKI), en donde el inhibidor temporal es para administrar a un sujeto que tiene 35 años o más que posee el riñón en riesgo de IRI, en donde el riñón en riesgo es un órgano natural del sujeto y nunca se ha extraído del cuerpo del sujeto,

5 en donde el inhibidor es un ácido ribonucleico interferente pequeño (ARNip) sintético que tiene la estructura

5' UGAAGGGUGAAAUUUCUC 3' (cadena antisentido) (SEQ ID NO: 37)

3' ACUUCCCACUUUAAGAG 5' (cadena en sentido) (SEQ ID NO: 36)

10 en donde cada uno de A, C, U y G es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une al próximo ribonucleótido mediante un enlace covalente; y

15 en donde los ribonucleótidos alternados tanto en la cadena antisentido como en la cadena en sentido son ribonucleótidos modificados con azúcar 2'-O-metilo y un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo está presente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la cadena antisentido y un ribonucleótido no modificado está presente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la cadena en sentido; o

en donde el inhibidor es un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) seleccionado de

| Compuesto de ARNdc | Sentido (N')y 5->3 | Antisentido (N)x 5->3 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| TP53_13_S2275 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> CU <u>A</u> CU-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuUCC <u>A</u> U <u>A</u> GGUC <u>U</u> G-C3;C3-pi |
| TP53_13_S2276 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> CU <u>A</u> CU-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuU <u>CC</u> <u>A</u> U <u>A</u> GGUC <u>U</u> G-C3;C3-pi |
| TP53_13_S2277 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> cuacu-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuUCC <u>A</u> U <u>A</u> GGUC <u>U</u> G-C3 ;C3-pi |
| TP53_13_S2278 | C3- <u>C</u> AGACC <u>A</u> UGGAA <u>A</u> cuacu-C3-pi | 5' phos-AG <u>U</u> AGUuU <u>CC</u> <u>A</u> U <u>A</u> GGUC <u>U</u> G-C3;C3-pi |
| TP53_41_S709 | GACUCAGACUGACAUUCUU-dTdT\$ | AAGAAUGUCAGUCUGAGUC-dTdT\$ |
| TP53_41_S2279 | C3-GACUCAGACUG <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> UU-C3-pi | 5' phos-AAGAA <u>U</u> g <u>C</u> AGUC <u>U</u> G <u>A</u> GU-C3;C3-pi |
| TP53_41_S2298 | C3-GACUCAGACUGAC <u>A</u> uucuu-C3-pi | 5' phos-AAGAA <u>U</u> g <u>C</u> AGUC <u>U</u> G <u>A</u> GU-C3;C3-pi |
| TP53_41_S2299 | C3-GACUCAGACUGAC <u>A</u> uucuu-C3-pi | 5' phos-AAGAAUg <u>C</u> AGUCUGAGUC-C3; C3-pi |
| TP53_41_S2300 | C3-GACUCAGACUG <u>A</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> UU-C3-pi | 5' phos-AAGAAUg <u>C</u> AGUCUGAGUC-C3;C3-pi |
| TP53_44_S2301 | C3-GGGCCUGACUCAG <u>A</u> cu <u>U</u> gau-C3-pi | 5' phos-AU <u>C</u> AGU <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCC-C3;C3-pi |
| TP53_44_S2302 | C3-GGGCCUGACUCAG <u>A</u> cu <u>U</u> gau-C3-pi | 5' phos-AU <u>C</u> AGU <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCC-C3;C3-pi |
| TP53_44_S2303 | C3-GGGCCUGACUCAG <u>A</u> <u>U</u> GAU-C3-pi | 5' phos-AU <u>C</u> AGU <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCC-C3;C3-pi |
| TP53_44_S2304 | C3-GGGCCUGACUCAG <u>A</u> <u>U</u> GAU -C3-pi | 5' phos-AU <u>C</u> AGU <u>c</u> <u>U</u> GAGU <u>C</u> AGGCC-C3;C3-pi |

en donde:

A, U, G, C - designa un ribonucleótido no modificado;

20 **A, U, G, C** - designa un ribonucleótido modificado con azúcar 2'-O-metilo;

a, u, c, g - designa un nucleótido unido a un nucleótido adyacente (5'>3') mediante un enlace de fosfato internucleotídico 2'-5';

C3 - designa 1,3-Propanodiol, mono(dihidrogenofosfato) también identificado como resto de protección 3-hidroxipropano-1-fosfato [CAS RN: 13507-42-1];

25 C3C3 - designa un resto de protección que consiste en dos moléculas consecutivas de C3;

dT - designa timidina;

dT\$ - designa timidina sin fosfato terminal;

pi - designa 3'- fosfato;

5'-phos - designa 5'- fosfato.

2. El inhibidor para uso de la reivindicación 1 en donde el sujeto que posee el riñón en riesgo de IRI tiene 45 años o más.
- 5 3. El inhibidor para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto ha tenido cirugía cardiovascular, cirugía cardiopulmonar, cirugía renal, obstrucción ureteral aguda, choque, hipoxia global y/o exposición a una nefrotoxina.
4. El inhibidor para uso de la reivindicación 3, en donde el sujeto ha tenido cirugía cardiovascular, cirugía cardiopulmonar, y/o cirugía renal.
- 10 5. El inhibidor para uso de la reivindicación 4, en donde el sujeto ha tenido una cirugía cardiovascular.
6. El inhibidor para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor es el ácido ribonucleico interferente pequeño (ARNip) sintético que tiene la cadena antisentido de la SEQ ID NO: 37 y la cadena en sentido de la SEQ ID NO: 36, en donde los extremos 5' y los extremos 3' no están fosforilados.
- 15 7. El inhibidor para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el ARNip o el compuesto de ARNdc está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, en particular en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio.
8. El inhibidor para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor temporal de un gen p53 se administra a una dosis de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, tal como a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg.
- 20 9. El inhibidor para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor temporal de un gen p53 debe administrarse como una composición líquida que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, en particular en donde el inhibidor temporal se administra como una composición inyectable que comprende un excipiente acuoso farmacológicamente aceptable, opcionalmente en donde la administración del inhibidor comprende uno o más de los siguientes:
- 25 - el inhibidor temporal se administra por inyección intravenosa (IV);
 - la inyección intravenosa (IV) se administra en un único tratamiento, en donde el único tratamiento comprende una única dosis o múltiples dosis;
 - el tratamiento único es una dosis única;
 - el tratamiento único es un impulso intravenoso (IVP) único;
- 30 30 - la inyección intravenosa (IV) se administra directamente en un puerto proximal de una línea venosa central o a través de una línea periférica;
 - la composición inyectable se administra por vía sistémica, subcutánea, tópica, por inhalación, por instilación (pulmones).
- 35 10. El inhibidor para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor temporal está conjugado o formulado en liposomas o nanopartículas.
11. El inhibidor para uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor está presente en un kit que comprende el inhibidor y las instrucciones de uso.

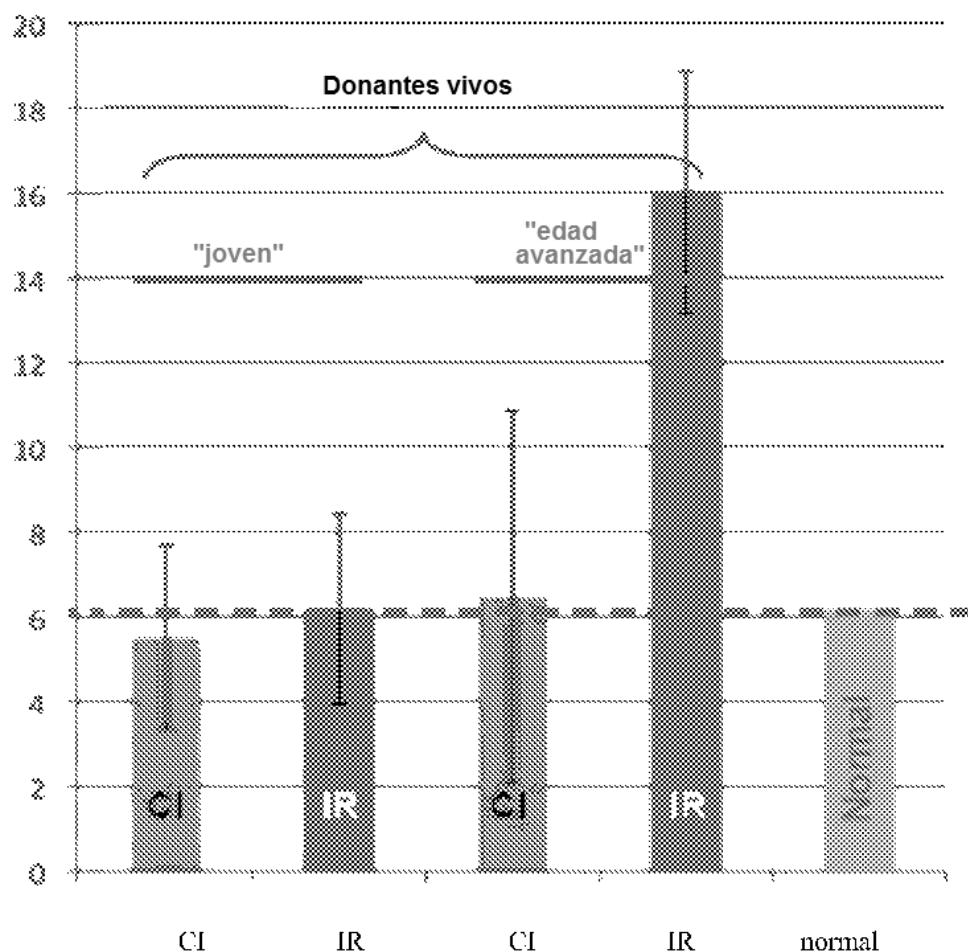
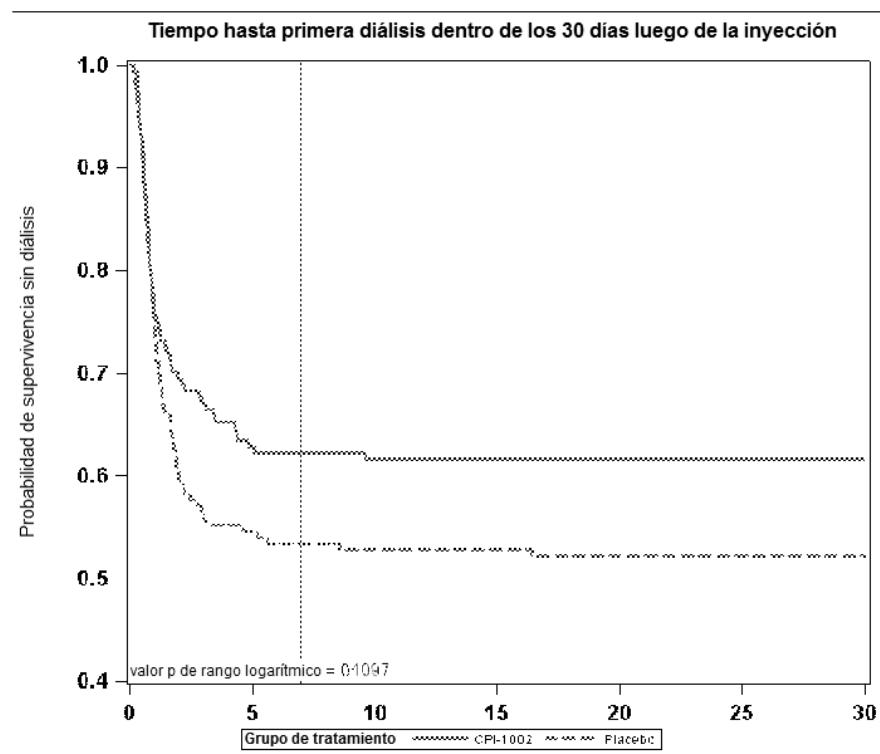
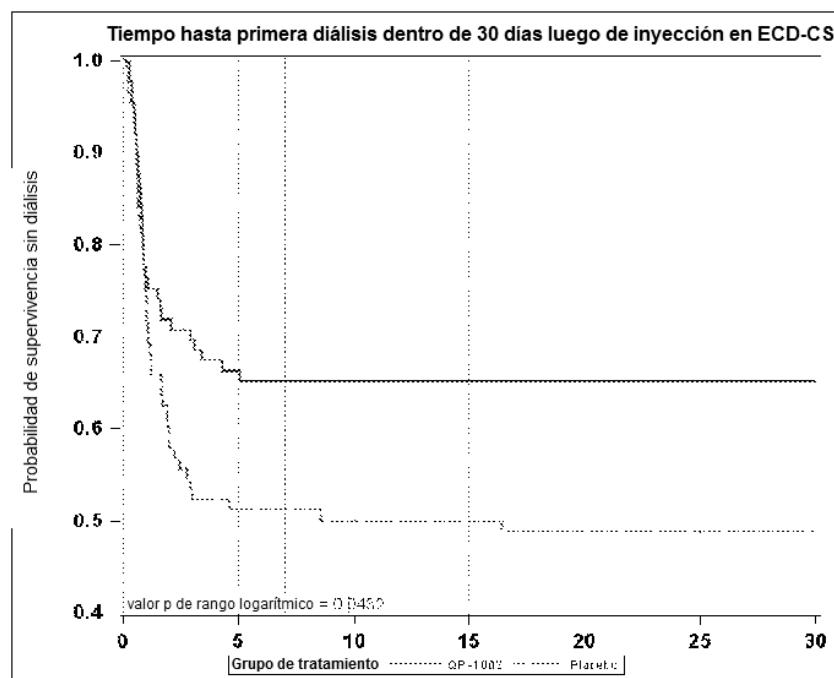
Figura 1

Figura 2a



Índice de riesgo - Tiempo hasta primera diálisis dentro de los 30 días luego de la inyección

| Población total | Análisis | 95% Índice de riesgo | | | Pr > ChiSq |
|-----------------|-------------|----------------------|----------------------|------------|------------|
| | | Índice de riesgo | Limites de confianza | Pr > ChiSq | |
| | No ajustado | 0.763 | 0.547 - 1.064 | | 0.1168 |

Figura 2b**Índice de riesgo - Tiempo hasta primera diálisis dentro de 30 días luego de inyección**

| Población | Análisis | 95% Índice de riesgo | | | Pr > ChiSq |
|-----------|-------------|----------------------|----------------------|------------|------------|
| | | Índice de riesgo | Límites de confianza | Pr > ChiSq | |
| ECD CS | No ajustado | 0.626 | 0.396 - 0.990 | | 0.0451 |

Figura 3

