

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 204**

21 Número de solicitud: 201430081

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**27.01.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.08.2015**

71 Solicitantes:

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA -  
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (80.0%)**

**Avda. de los Reyes Católicos, 2  
28040 Madrid ES y**

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA  
PAZ (20.0%)**

72 Inventor/es:

**ORTIZ ARDUAN, Alberto y  
SÁNCHEZ NIÑO, María Dolores**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **Composición farmacéutica y su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica y método de selección de compuestos**

57 Resumen:

Composición que comprende los ARN identificados por las secuencias SEQ ID NO: 1-3 y su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica. La presente solicitud también proporciona un método de selección de compuestos útiles en el tratamiento de la enfermedad renal crónica a partir de una librería de compuestos, que comprende: (a) incubar células tubulares renales en presencia de uno de los compuestos seleccionado de la librería de compuestos, (b) determinar si la expresión de BASP1 en las células tubulares renales es menor a la expresión de BASP1 en una muestra control e (c) identificar el compuesto elegido en la etapa (a) como compuesto útil en el tratamiento de la enfermedad renal crónica cuando la expresión de BASP1 en las células tubulares renales sea menor a la expresión de BASP1 en una muestra control.

ES 2 544 204 A1

**COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA Y SU USO PARA LA FABRICACIÓN DE UN  
MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y  
MÉTODO DE SELECCIÓN DE COMPUESTOS**

5

**DESCRIPCIÓN**

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención pertenece al campo de los compuestos con actividad terapéutica. Específicamente, la presente invención describe el uso de una molécula de ARN para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica. Esta molécula protege a las células tubulares renales de la toxicidad de la albuminuria actuando sobre BASP1.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La enfermedad renal crónica aumenta el riesgo de muerte cardiovascular y puede progresar a enfermedad renal crónica terminal que necesite diálisis o trasplante. La presencia de albuminuria es uno de los principales factores de riesgo tanto para la muerte cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica como para la progresión hacia insuficiencia renal terminal. Este hecho queda reconocido en la clasificación de la enfermedad renal crónica según el consenso KDIGO (KIDNEY DISEASE IMPROVING GLOBAL OUTCOMES). La clasificación KDIGO de la enfermedad renal crónica usa dos parámetros: el filtrado glomerular y la albuminuria. Este mismo consenso hace recomendaciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad renal crónica. Estas recomendaciones tienen dos aspectos: el primero es un control adecuado de la hipertensión arterial. El segundo aspecto es el uso de inhibidores del enzima de conversión de la angiotensina (IECAs) o de antagonistas de receptores de angiotensina (ARAI) para reducir la albuminuria. No obstante, los IECAs o ARAI no son universalmente efectivos ni en reducir la albuminuria ni en prevenir la progresión de la enfermedad renal crónica. En muchos pacientes a pesar del tratamiento persiste lo que se llama "albuminuria residual".

Hay mucho interés en buscar tratamientos que permitan hacer desaparecer la albuminuria residual. Recientemente fracasó un gran ensayo clínico que testaba la capacidad de Paricalcitol, un activador de receptores de vitamina D, para disminuir la albuminuria residual.

Actualmente existe una gran dificultad o, más exactamente, imposibilidad de disminuir la albuminuria residual.

Es bien conocido que la albuminuria favorece la progresión de la enfermedad renal crónica.

5 El mecanismo por el que la albuminuria favorece el daño renal consiste en la lesión y muerte por apoptosis de las células tubulares del riñón.

La presente invención está relacionada con el gen *BASP1* (del inglés *brain acid soluble protein 1*). Se ha descrito que *BASP1* promueve la apoptosis en nefropatía diabética  
10 (Sanchez-Niño MD et al. *BASP1* promotes apoptosis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Apr; 21(4):610-21). En dicha publicación se describe que la inhibición de *BASP1* previene la apoptosis inducida por alta glucosa y por privación de factores de supervivencia del suero, pero también describe que la apoptosis inducida por citoquinas no se previene al inhibir *BASP1* (página 613, último párrafo de la primera columna y Figura 9B).  
15 Esto es debido a que existen distintos mecanismos de apoptosis y moléculas que inhiben unos mecanismos resultan inútiles para inhibir la apoptosis inducida por otros mecanismos. Teniendo en cuenta la complejidad que presentan los diferentes mecanismos de apoptosis, el experto en la materia no podría concluir a partir del estado de la técnica que la inhibición de *BASP1* previene cualquier apoptosis de manera universal, y por tanto no podría concluir  
20 que previene la apoptosis inducida por albuminuria.

El problema técnico consiste en proporcionar una molécula alternativa a las descritas en el estado de la técnica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

25

La presente invención, según se define en las reivindicaciones, proporciona una solución a este problema técnico.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

Una realización preferente de la presente invención es el uso de una composición que comprende:

- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,
- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y
- 35 - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3,

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica, donde dicha composición reduce la muerte por apoptosis inducida por albuminuria de células tubulares renales, en adelante uso de la invención.

- 5 Otra realización de la presente invención es el uso de una composición que comprende:
- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3,
- para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

10

De forma particular, dicha identidad de secuencia es de al menos un 95%. De forma aún más particular, dicha identidad de secuencia es del 100 %.

- 15 En la presente solicitud, dicho porcentaje de identidad en una secuencia problema se calcula teniendo en cuenta que un 95% de identidad significa que un 95% de residuos de la secuencia problema son idénticos a los residuos de las SEQ ID NO: 1-3.

Otra realización es una composición que comprende:

- 20 - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,  
- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y  
- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3,  
para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal crónica, donde dicha composición reduce la muerte por apoptosis inducida por albuminuria de células tubulares renales.

- 25 Otra realización es un método de tratamiento de la enfermedad renal crónica, que comprende administrar a un humano una composición que comprende:

- 30 - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,  
- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y  
- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3,  
donde dicha composición reduce la muerte por apoptosis inducida por albuminuria de células tubulares renales.

- 35 La presente invención previene la progresión del daño renal mediante una estrategia que evita la lesión tubular como consecuencia de la albuminuria en lugar de evitar la albuminuria, estrategia que desafortunadamente no ha proporcionado resultados suficientemente satisfactorios.

La presente invención es complementaria a los fármacos usados habitualmente en clínica y supera la incapacidad de la medicina actual para disminuir más la albuminuria residual que persiste tras el uso de IECAs o ARAII.

5

La presente invención evita el aumento de expresión de BASP1 o impide la actividad de BASP1 que se produce en células tubulares en respuesta a la albúmina y que tiene como consecuencia la muerte por apoptosis de la célula. En concreto, la disminución de la expresión de BASP1 evitó la muerte de células tubulares inducida por albúmina, tal y como se demuestra en el Ejemplo 6.

10

La presente invención permite diseñar estrategias para disminuir la expresión o inhibir la acción de BASP1 para proteger al túbulo renal de la apoptosis inducida como respuesta a la albuminuria, y así evitar la lesión renal por albuminuria.

15

Otra realización preferente de la presente invención es una composición farmacéutica, caracterizada por que comprende:

- un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3,
- junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20

La presente invención también proporciona un método de selección de otros compuestos que tengan una estructura sustancialmente diferente a las moléculas de ARN identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1-3 y que puedan ser usados para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

25

Por tanto, otra realización de la presente invención es un método de selección de compuestos útiles en el tratamiento de la enfermedad renal crónica a partir de una librería de compuestos, que comprende:

30

- (a) incubar células tubulares renales en presencia de uno de los compuestos seleccionado de la librería de compuestos,
- (b) determinar si la expresión de BASP1 en las células tubulares renales es menor a la expresión de BASP1 en una muestra control e

(c) identificar el compuesto elegido en la etapa (a) como compuesto útil en el tratamiento de la enfermedad renal crónica cuando la expresión de BASP1 en las células tubulares renales sea menor a la expresión de BASP1 en una muestra control.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A, 1B y 1C. El aminonucleósido de puromicina (PAN) provocó aumento de la excreción urinaria de albúmina (Figura 1A) en el riñón de rata con síndrome nefrótico experimental. PAN aumentó la expresión del ARNm de BASP1 (Figura 1B) y de la proteína BASP1 (Figura 1C).

Figuras 2A y 2B. Figura 2A, aumento de la expresión de la proteína BASP1 observado mediante Western Blot tras administración de PAN. Figura 2B, localización de la proteína BASP1 en las células epiteliales tubulares por inmunohistoquímica.

Figura 3. Identificación del aumento de la expresión de BASP1 en las células tubulares mediante inmunohistoquímica de biopsias de pacientes con nefropatía albuminúrica (izquierda). A la derecha se representa el control.

Figuras 4A, 4B y 4C. Figura 4A, Aumento del número de células apoptóticas hipodiploides de una manera dependiente de la dosis mediante citometría de flujo del contenido de ADN en células tubulares proximales tratadas con albúmina. La exposición de células tubulares proximales a albúmina indujo el aumento de expresión del ARNm de BASP1 (Figura 4B) y también de la proteína BASP1 (Figura 4C) de una forma dependiente del tiempo. En blanco se representan los resultados del control.

Figura 5. La exposición de células tubulares proximales a albúmina indujo el aumento de la proteína BASP1 mediante Western blot de una forma dependiente del tiempo.

Figura 6. Confirmación de eficiencia del silenciamiento génico de BASP1 mediante Western blot.

Figura 7. Porcentaje de células hipodiploides según la evaluación del contenido de ADN mediante citometría de flujo.

35

Figura 8. Células que fueron tratadas con las secuencias silenciadoras de BASP1 SEQ ID NO: 1-3 y tratadas con albúmina parecen sanas.

## MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

5

### Ejemplo 1. Materiales y métodos

#### *Cultivo celular y reactivos*

10 Para los estudios in vitro se cultivaron células renales de túbulo proximal humanas (HK2). Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 5 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selenito de sodio y 5 ng/mL hidrocortisona en una atmósfera con 5% de dióxido de carbono  
15 a 37°C. Para los experimentos, el suero bovino fetal fue retirado 24 horas antes de los estudios y durante todo el experimento. Para simular in vitro las condiciones de las nefropatías albuminúricas, se cultivaron las células HK2 con albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones.

#### 20 *Estudios de muerte celular y apoptosis*

Para los estudios de muerte celular y apoptosis, se sembraron las células en placas de 12 pocillos. Para los estudios de apoptosis, se utilizó un citómetro de flujo donde se estudió tanto las células adherentes como las células que se desprendieron espontáneamente y se  
25 incubaron con una combinación de 100 µg/mL de yoduro de propidio, 0,05% NP-40 y 10 µg/mL de RNase en PBS a 4°C durante más de una hora. Este tratamiento permite permeabilizar las células y así el propidio tiñe todas las células (vivas y muertas). El porcentaje de células apoptóticas que tienen disminuido el ADN y por lo tanto menor tinción de ADN (células hipodiploides) se contó mediante citometría de flujo utilizando un software  
30 CellQuest (BD Biosciences).

#### *Estudios de proteínas por Western blot*

La membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-BASP1  
35 (Abcam) a una dilución 1:500. Tras esto, lavamos la membrana y la incubamos con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa a una dilución 1:2000 (Amersham, Aylesbury,

Reino Unido). El siguiente paso fue incubar la membrana con anti-tubulina a una dilución 1:5000 (Sigma, St. Louis, MO) y su correspondiente anticuerpo secundario. Se ha utilizado la tubulina como control de carga de la técnica. Tras esto, las membranas se revelaron con el método de quimioluminiscencia potenciada (ECL) siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham).

#### *Extracción de ARN y reacción inversa de la polimerasa (PCR)*

El ARN total se extrajo a partir de tejido y de células por el método del reactivo TRI (Sigma) y 1 µg de ARN se transcribió a ADN complementario mediante el kit comercial High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se usó una sonda para BASP1 previamente desarrollada (Applied Biosystems). La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador ABI Prims 7500 (Applied Biosystems) de acuerdo con el protocolo del fabricante y utilizando el método de Ct DeltaDELTA. Los niveles de expresión se muestran como relaciones a GAPDH.

#### *Transfección con ARN silenciador*

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) y se transfectaron con una mezcla de ARN silenciador (siRNA, *small interfering RNA*) 10 nmol/ml, que contiene las moléculas identificadas por las secuencias SEQ ID NO:1-3 (Ambion, Applied Biosystems, Foster City, CA), medio Opti-MEM I y con un reactivo de transfección (Ambion, Applied Biosystems). Tras 18 horas, se lavaron las células y se cultivaron durante 48 horas con medio suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, bioWhitaker) decomplementado, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Este tiempo fue seleccionado a partir de un estudio temporal de respuesta a la expresión de la proteína BASP1. Se usó un silenciador *sin sentido* como control que no redujo la expresión de la proteína BASP1.

#### *Modelo animal*

Se estudiaron dos grupos de ratas Wistar Kyoto (Criffa, Barcelona) de 10 semanas de edad (n=9/grupo). La nefropatía albuminúrica fue inducida mediante una única inyección intravenosa de 150 mg/Kg de aminonucleósido de puromicina (PAN) (Sigma, St. Louis, MO). Otro grupo de ratas control recibieron una inyección de salino. Las ratas fueron sacrificadas 2 y 10 días tras la inyección de PAN. Se recogió la orina de 24 horas en cajas metabólicas. Tras el sacrificio los riñones fueron perfundidos con salino frío antes de retirarlos. Un riñón

de cada rata fue fijado en formalina, se embebió en parafina y se utilizó para inmunohistoquímica. El otro riñón fue instantáneamente congelado en nitrógeno líquido para estudios de ARN y proteína. Se determinó la albuminuria mediante un ELISA usando albúmina de rata como estándar (Celltrend, Luckenwalde, Germany). Todos los estudios se realizaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea.

#### *Inmunohistoquímica de muestras humanas*

Las muestras renales humanas fueron obtenidas por biopsia renal percutánea en pacientes evaluados por nefropatía albuminúrica membranosa en la Unidad de Nefrología del IIS-FJD. Estos pacientes donaron voluntariamente el tejido sobrante tras el diagnóstico al biobanco del IIS-FJD. Como tejido de riñón humano control se usó la porción sana de tejido renal de pacientes que se sometieron a cirugía por tumores renales localizados. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en secciones de 5 µm de espesor de tejido embebido en parafina. Como anticuerpo primario se usó anti-BASP1 (Abcam). El control negativo de la técnica lo hicimos con una inmunoglobulina no específica del mismo isotipo que el anticuerpo primario. El comité de ética aprobó el protocolo del estudio y se obtuvo el consentimiento informado.

Ejemplo 2. PAN provoca proteinuria y aumenta la expresión de la proteína BASP1 en el riñón de rata con síndrome nefrótico experimental

La administración sistémica de aminonucleósido de puromicina (PAN) provocó lesiones en los podocitos de ratas dando lugar al aumento de la excreción urinaria de albúmina en el día 2 después de la administración de PAN y a la aparición de síndrome nefrótico en el día 10 después de la administración de PAN (Figura 1A). Tras 10 días de la administración de PAN se observó un aumento en la expresión del ARNm de BASP1 (Figura 1B) y de la proteína BASP1 (Figuras 1C y 2A) en el riñón entero coincidiendo con el aumento de la proteinuria. Mediante inmunohistoquímica se ha localizado la proteína BASP1 en las células epiteliales tubulares (Figura 2B).

Ejemplo 3. Aumento de la expresión de la proteína BASP1 en la nefropatía albuminúrica humana

En inmunohistoquímica de biopsias de pacientes con nefropatía albuminúrica se identificó el aumento de la expresión de BASP1 en las células tubulares (Figura 3). Se compararon

estas muestras con muestras de riñón humano sano (control) y no se observó tinción para BASP1.

5 Ejemplo 4. La muerte celular inducida por albúmina en las células tubulares tiene características de apoptosis

10 La albúmina es conocida por promover la apoptosis de las células del túbulo proximal. Mediante citometría de flujo del contenido de ADN se ha demostrado que las células tubulares proximales tratadas con albúmina tenían aumentado el número de células apoptóticas hipodiploides de una manera dependiente de la dosis (Figura 4A). El aumento de la tasa de apoptosis ya fue evidente a las 24 h y alcanzó su punto máximo a las 48 h tras la exposición de las células tubulares proximales a albúmina (Figura 4A).

15 Ejemplo 5. La albúmina induce el aumento de la expresión de BASP1 en células tubulares proximales renales

20 La exposición de células tubulares proximales a albúmina indujo el aumento de expresión del ARNm de BASP1 (Figura 4B) y también de la proteína BASP1 (Figuras 4C y Figura 5) de una forma dependiente del tiempo.

Ejemplo 6. La inhibición de la expresión de BASP1 protege contra la apoptosis inducida por albúmina

25 El hecho de que la albúmina aumente la expresión de BASP1 en las células tubulares proximales renales, sugiere que el aumento de la expresión de BASP1 observado in vivo es una manifestación directa de la citotoxicidad de la albúmina en las células tubulares.

30 Cuantificando el porcentaje de células hipodiploides según la evaluación del contenido de ADN mediante citometría de flujo, se ha comprobado que el silenciamiento de BASP1 protege contra la apoptosis inducida por albúmina puesto que las células tubulares proximales renales que tenían BASP1 silenciado morían menos que las células usadas como control (Figura 7). Mediante Western blot se confirmó la eficiencia del silenciamiento génico (Figura 6).

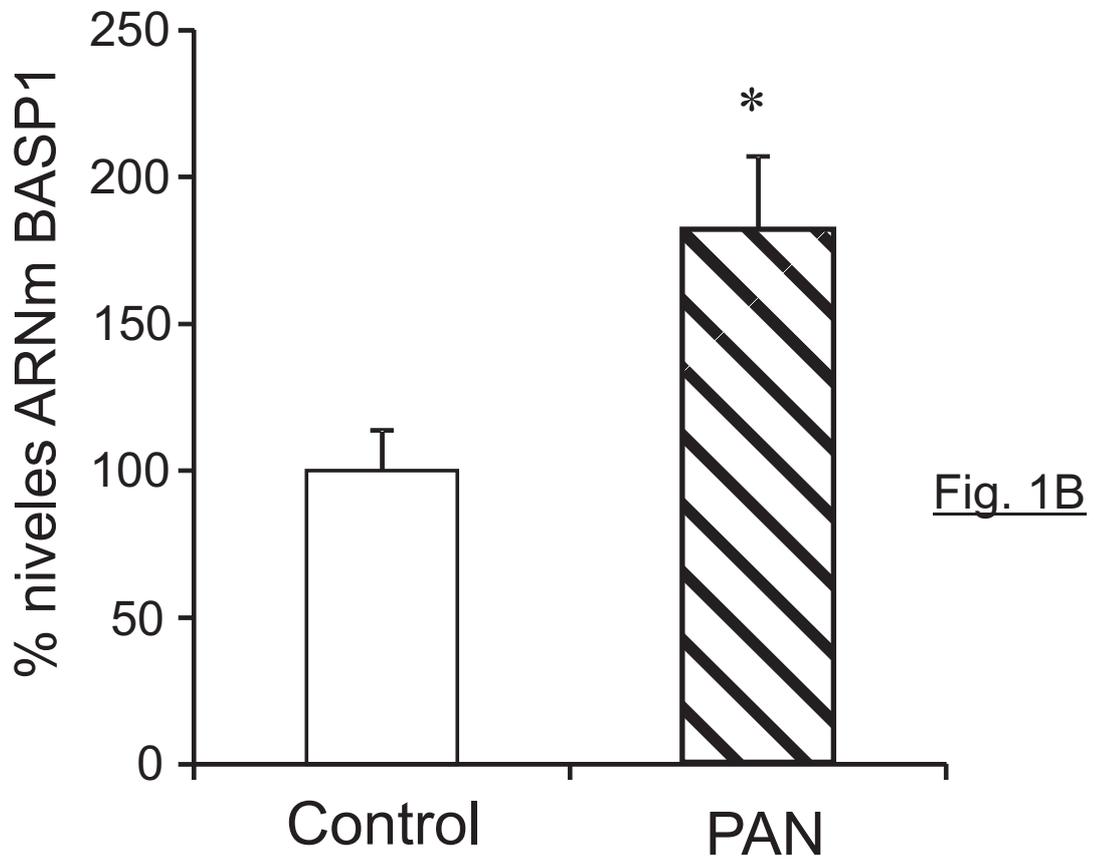
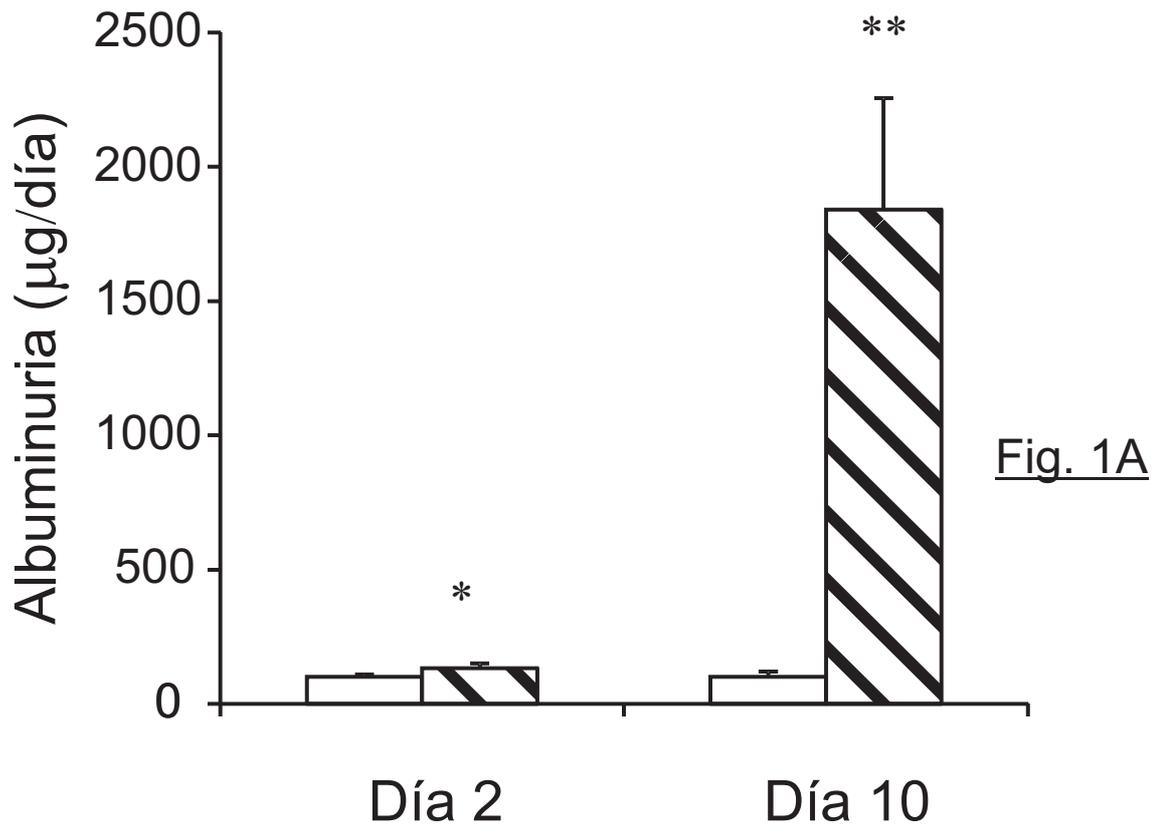
35 Mediante microscopía de contraste de fases se observó que la mayoría de las células expuestas a albúmina estaban flotantes y eran de pequeño tamaño (Figura 8). Esto es

consistente con el desprendimiento de la célula y la fragmentación característica de la apoptosis. También se observó que las células que fueron tratadas con el silenciador de BASP1 (composición que contiene moléculas de ARN identificadas por las secuencias SEQ ID NO: 1-3) y tratadas con albúmina parecen sanas (Figura 8).

5

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende:
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y
  - 5 - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3,para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica, caracterizado por que dicha composición reduce la muerte por apoptosis inducida por albuminuria de células tubulares renales.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha identidad de secuencia es de  
10 al menos un 95%.
3. Uso según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicha identidad de secuencia es del 100%.
4. Composición farmacéutica, caracterizada por que comprende:
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1,
  - 15 - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 y
  - un ARN con al menos un 90% de identidad respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3,junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Método de selección de compuestos útiles en el tratamiento de la enfermedad renal crónica a partir de una librería de compuestos, que comprende:  
20 (a) incubar células tubulares renales en presencia de uno de los compuestos seleccionado de la librería de compuestos,  
(b) determinar si la expresión de BASP1 en las células tubulares renales es menor a la expresión de BASP1 en una muestra control e  
(c) identificar el compuesto elegido en la etapa (a) como compuesto útil en el tratamiento  
25 de la enfermedad renal crónica cuando la expresión de BASP1 en las células tubulares renales sea menor a la expresión de BASP1 en una muestra control.



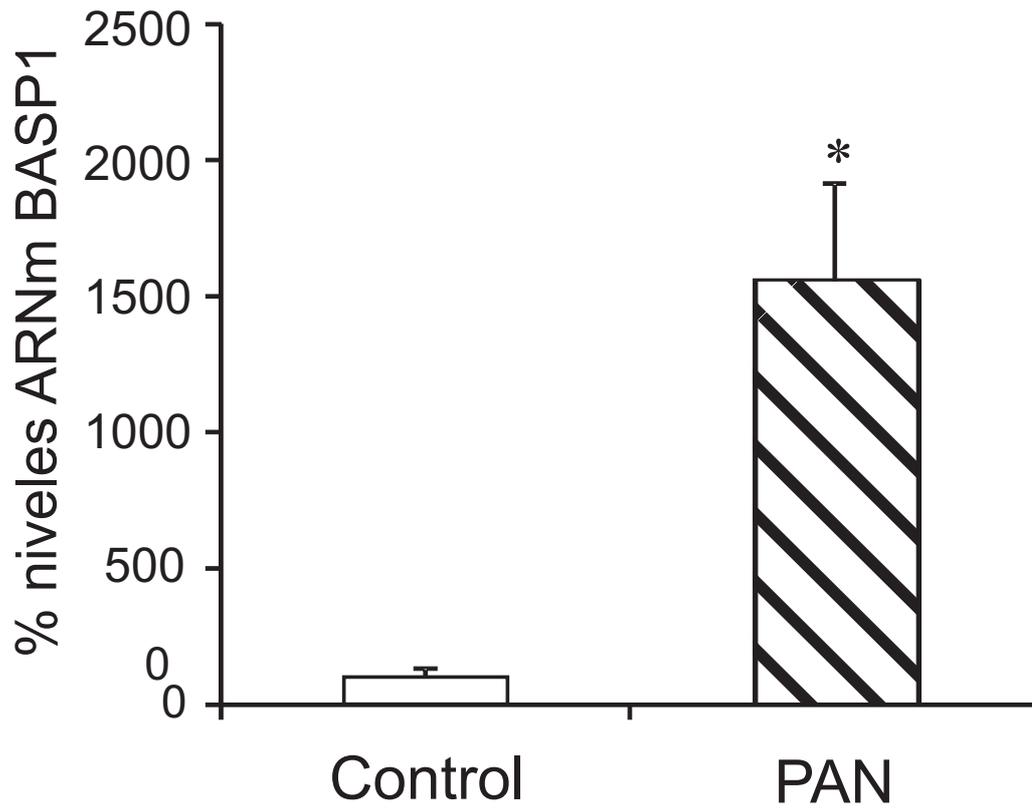


Fig. 1C

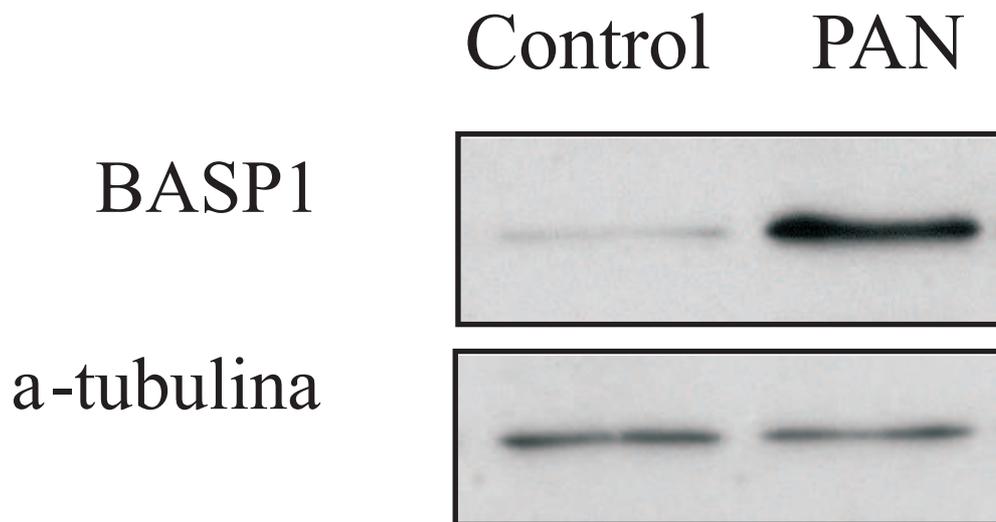


Fig. 2A

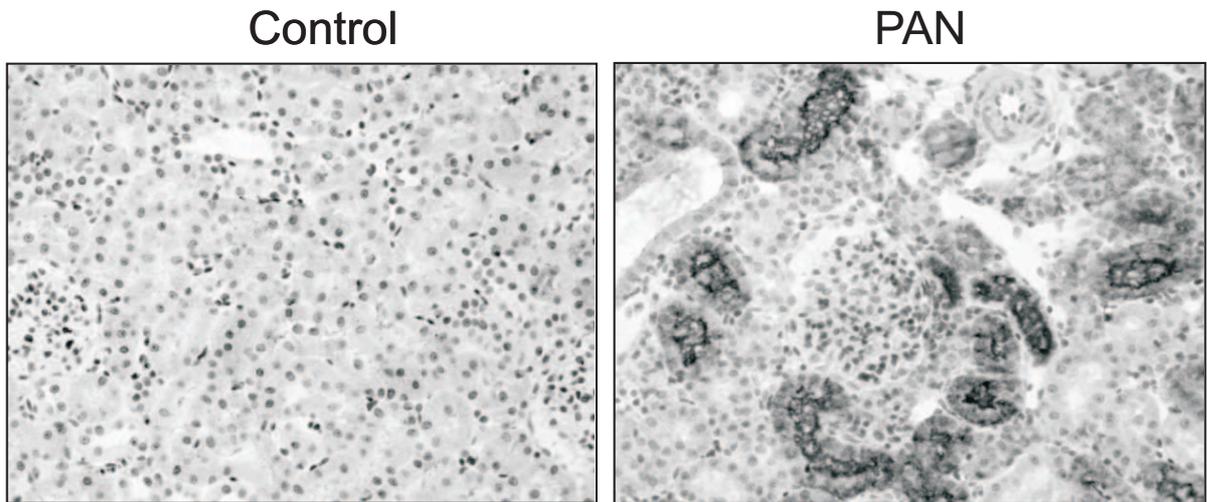


Fig. 2B

Síndrome nefrótico humano

Control

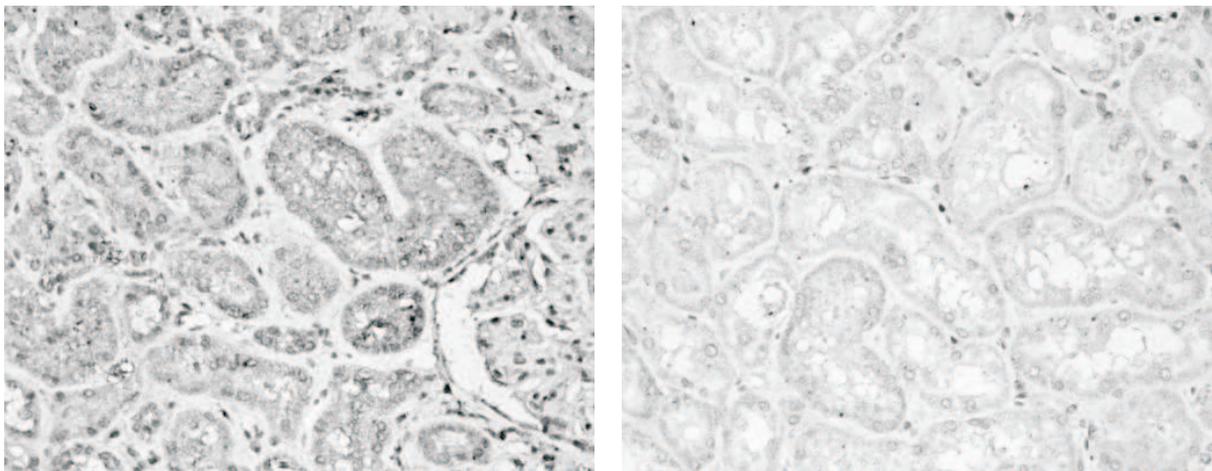


Fig. 3

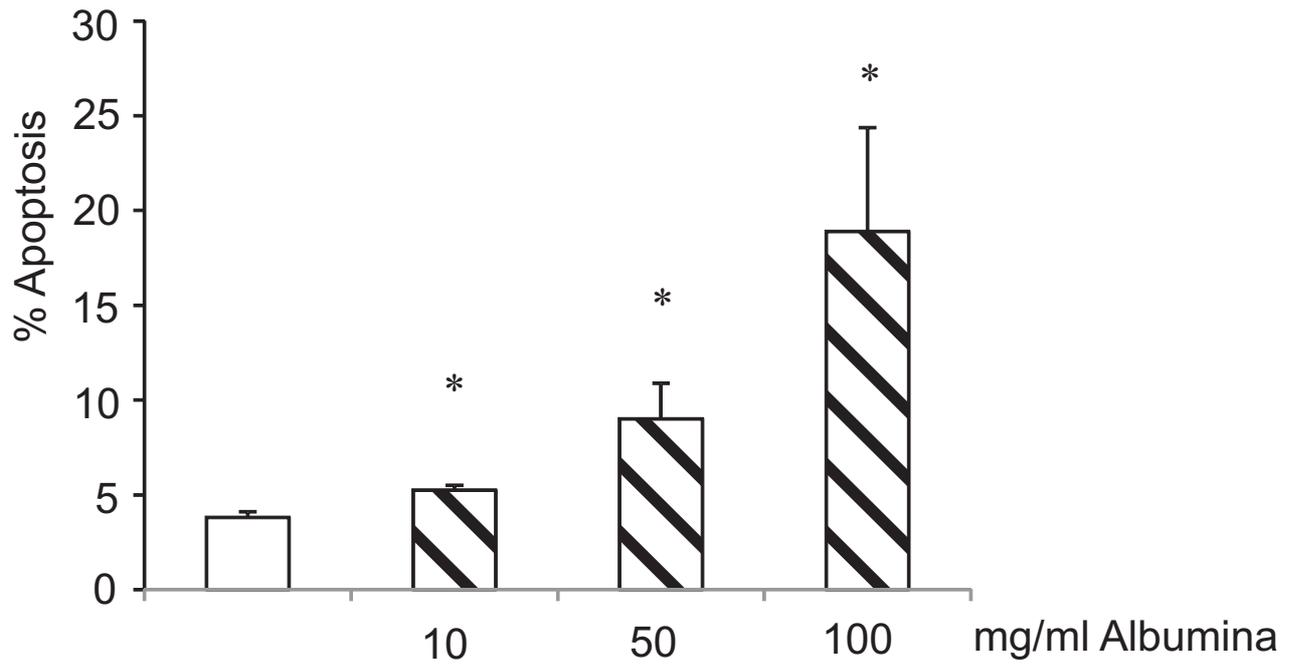


Fig. 4A

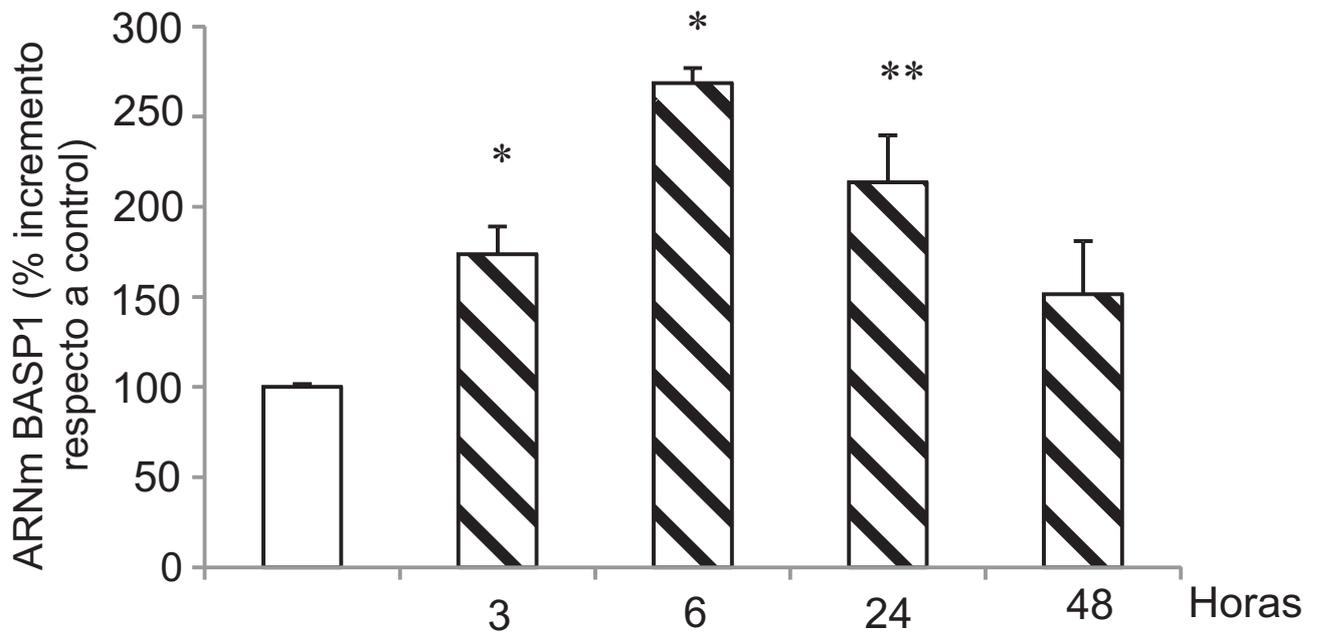


Fig. 4B

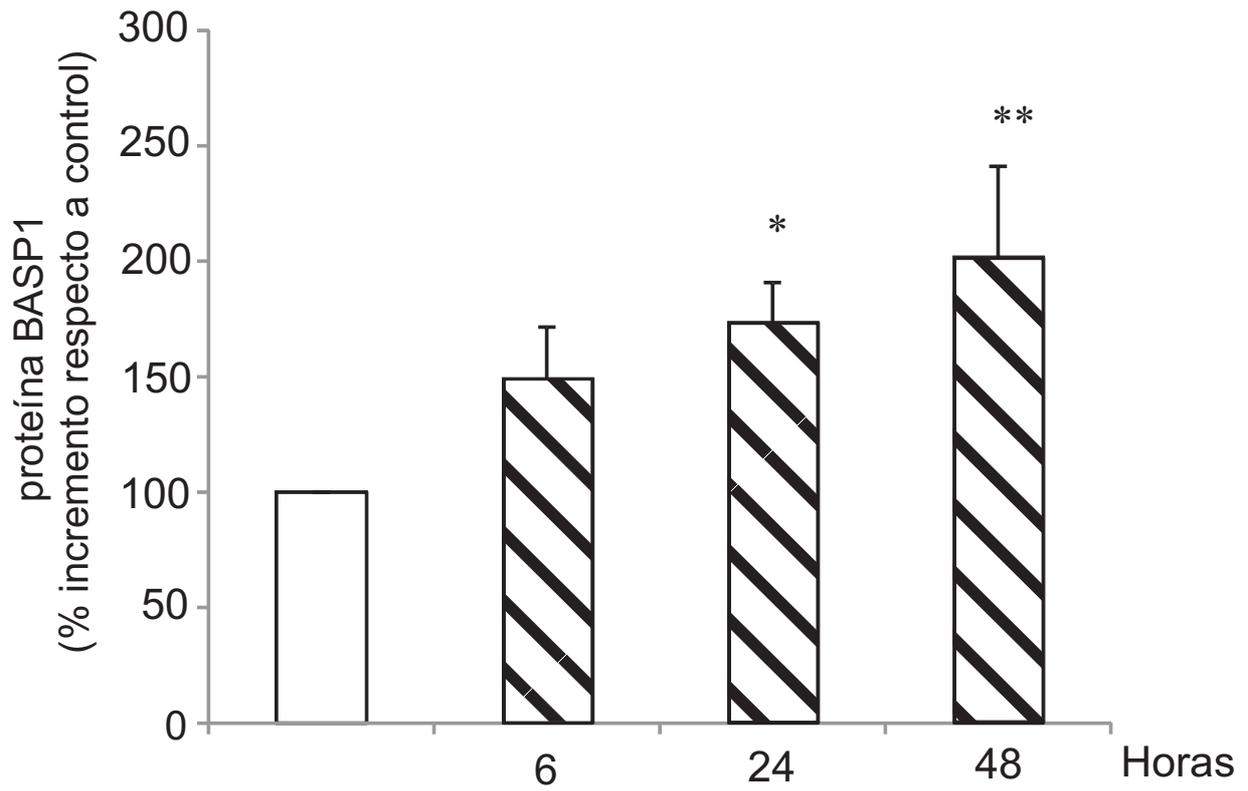


Fig. 4C

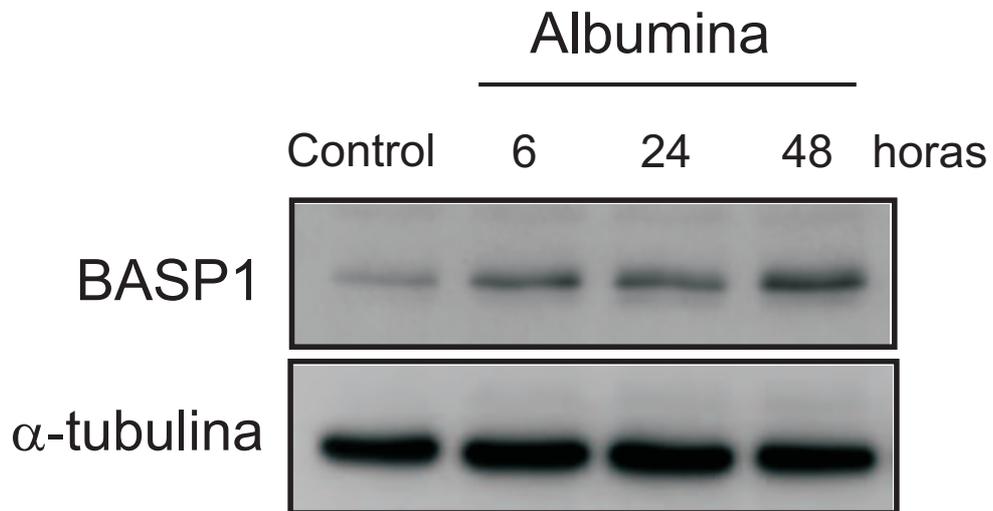


Fig. 5

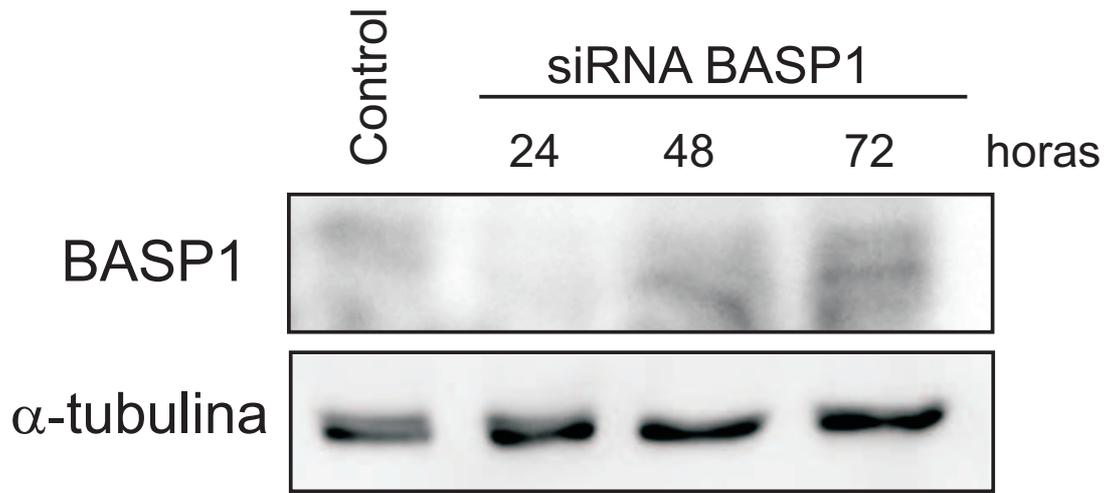


Fig. 6

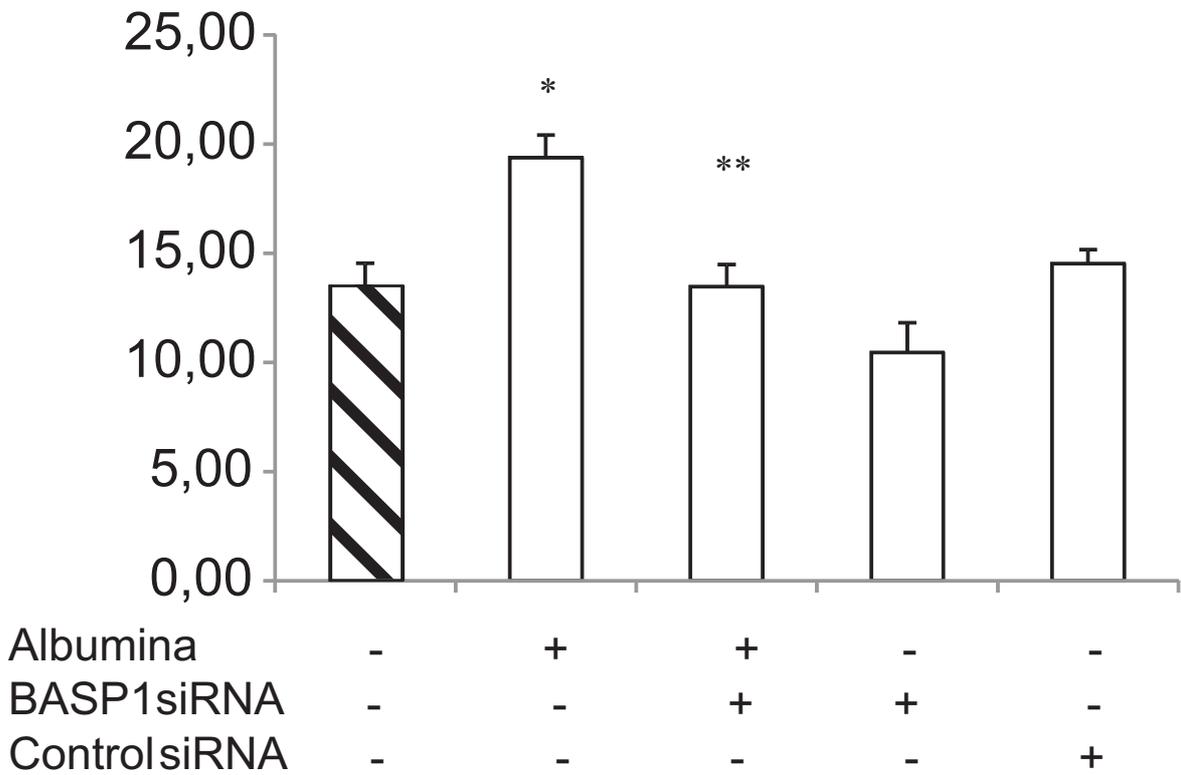


Fig. 7

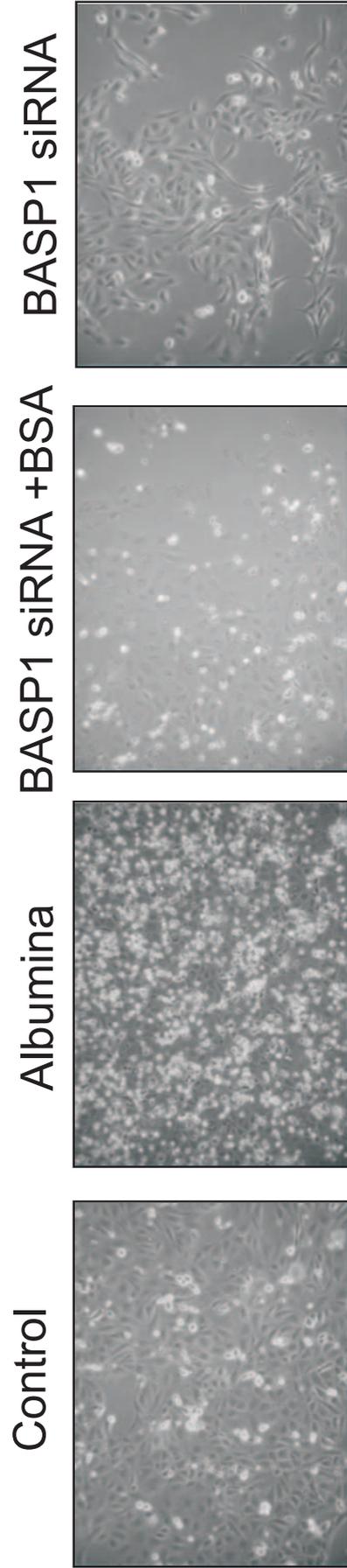


Fig. 8

# ES 2 544 204 A1

## Listado de secuencias

<110> INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA - FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

<120> COMPOSICIÓN FARMACEÚTICA Y SU USO PARA LA FABRICACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y MÉTODO DE SELECCIÓN DE COMPUESTOS

<160> 3

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1  
<211> 42  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..42  
<223> /mol\_type="unassigned RNA"  
/note="siRNA 1"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 1  
gcuaauuccg accaaaccgt tcgguuuggu cggaauuagc tg 42

<210> 2  
<211> 42  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..42  
<223> /mol\_type="unassigned RNA"  
/note="siRNA 2"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 2  
ccgugaaaga gugacaaggt tccuugucac ucuuucacgg tt 42

<210> 3  
<211> 42  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..42  
<223> /mol\_type="unassigned RNA"  
/note="siRNA 3"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 3  
cgaguuaag cauguccgut tacggacaug cauaaacug tc 42



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201430081

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.01.2014

③② Fecha de prioridad:

### INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/113** (2010.01)  
**C12N15/11** (2006.01)

#### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DOLORES SANCHEZ-NINO MARIA et al. BASP1 Promotes Apoptosis in Diabetic Nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology ABR 2010 (04.2010) VOL: 21 No: 4 Págs: 610-621 ISSN 1046-6673 Doi: doi:10.1681/ASN.2009020227.	1-5
X	SANCHEZ-NINO MARIA-DOLORES et al. New paradigms in cell death in human diabetic nephropathy. Kidney International OCT 2010 (10.2010) VOL: 78 No: 8 Págs: 737-744 ISSN 0085-2538 Doi: doi:10.1038/ki.2010.270.	1-4

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.01.2015

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, BUSQUEDA SECUENCIAS (EBI SITE)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.01.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 5	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-5	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DOLORES SANCHEZ-NINO MARIA et al. <i>BASP1 Promotes Apoptosis in Diabetic Nephropathy</i> . Journal of the American Society of Nephrology ABR 2010 (04.2010) VOL: 21 No: 4 Págs: 610-621 ISSN 1046-6673 Doi: doi:10.1681/ASN.2009020227.	31.03.2010
D02	SANCHEZ-NINO MARIA-DOLORES et al. <i>New paradigms in cell death in human diabetic nephropathy</i> . Kidney International OCT 2010 (10.2010) VOL: 78 No: 8 Págs: 737-744 ISSN 0085-2538 Doi: doi:10.1038/ki.2010.270.	30.09.2010

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

La presente invención divulga el uso de los ARNs de silenciamiento (siRNA) SEQ.ID.Nº 1-3, frente al gen *BASP1* para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica, basándose en la capacidad que tienen esos ARNs de reducir la expresión de *BASP1* y de proteger contra la apoptosis inducida por la albúmina.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan las secuencias de esos compuestos, ni el uso de los mismos tal y como aparecen en las reivindicaciones 1-4, por lo que el objeto de la invención contenido en tales reivindicaciones cumpliría con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art 6 de la ley 11/1986.

D01 describe que la sobreexpresión de *BASP1* induce la muerte celular por apoptosis, siendo uno de los factores implicados en el desarrollo de la nefropatía diabética; de manera inversa la utilización de ARNs de interferencia (siRNA) reduce la expresión de *BASP1* (figura 9), protegiendo de la muerte por apoptosis a las células tubulares renales. En este estudio in vitro se identificaron algunas condiciones, tales como la privación de suero, las altas concentraciones de glucosa, y las citoquinas proinflamatorias, que indujeron a la apoptosis mediante el aumento de mRNAs de *BASP1* y su proteína en las células epiteliales tubulares humanos.

Así pues, dado que ya se han utilizado siRNAs contra *BASP1* para la inhibición de la apoptosis de células tubulares renales en la nefropatía diabética, para el experto en la materia sería obvio intentar usar siRNAs alternativos a los ya existentes para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal crónica, teniendo muchas probabilidades de éxito en el tratamiento, independientemente de cuales sean las condiciones que se identifiquen como desencadenantes de la apoptosis mediada por *BASP1*. Por tanto, las reivindicaciones 1-3 carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.

Las secuencias reivindicadas en la reivindicación 4 se consideran una alternativa de realización obvia a los siRNAs del documento D01, y no suponen una contribución sobre el estado de la técnica, por lo que tampoco cumplirían con el art. 8 de la ley 11/1986.

El documento D01, figura 9, describe un método donde se incuban células transfectadas con *BASP1* en presencia de siRNAs, identificándose estos compuestos como protectores frente a la muerte celular por apoptosis en células renales. Así pues, el método que aparece en la reivindicación 5 carecería de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.