

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 083**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2005 PCT/IL2005/001035**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2006 WO06035434**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2005 E 05788492 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 1799269**

54 Título: **Oligorribonucleótidos y métodos de uso de los mismos para tratamiento de la alopecia, insuficiencia renal aguda y otras enfermedades**

30 Prioridad:

28.09.2004 US 613991 P
02.03.2005 US 658196 P
26.07.2005 US 703020 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2016

73 Titular/es:

QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
6501 DUMBARTON CIRCLE
FREMONT, CALIFORNIA 94555, US

72 Inventor/es:

FEINSTEIN, ELENA;
ZURR, DANIEL y
EHRlich, SHAI

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 594 083 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

Oligorribonucleotidos y métodos de uso de los mismos para tratamiento de la alopecia, insuficiencia renal aguda y otras enfermedades

5 A lo largo de esta solicitud se citan diversas patentes y publicaciones científicas. Las divulgaciones para estas publicaciones en su totalidad se incorporan en la presente invención como referencia en esta solicitud para describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Antecedentes de la invención

ARNsi y ARN de interferencia

10 El ARN de interferencia (ARNi) es un fenómeno que incluye un gen dependiente del ARN de cadena doble (ds - por sus siglas en inglés) específico del silenciamiento post-transcripcional. Originalmente, los intentos para estudiar este fenómeno y para manipular a las células de mamífero de manera experimental fueron frustrados por un mecanismo de defensa activo, antiviral no específico el cual se activó en respuesta a las moléculas de ARNs demasiado largas; véase Gil et al. 2000, Apoptosis, 5: 107-114. Posteriormente se descubrió que los duplex sintéticos de ARNs de 21 nucleótidos podrían mediar el ARNi específico del gen en células de mamífero, sin la estimulación de los
15 mecanismos genéricos de defensa antiviral (véase Elbashir et al. Nature 2001, 411: 494-498 y Caplen et al. Proc Natl Acad Sci 2001, 98: 9742-9747). Como un resultado, los ARN pequeños de interferencia (ARNsi), que son ARN cortos de cadena doble, se han vuelto herramientas poderosas en el intento por entender la función del gen.

20 Por lo tanto, el ARN de interferencia (ARNi) se refiere al proceso de silenciamiento del gen post-transcripcional específico de la secuencia en mamíferos mediado por los ARN pequeños de interferencia (ARNsi) (Fire et al, 1998, Nature 391, 806) o microARN (miARN) (Ambros V. Nature 431: 7006, 350-355 (2004); y Bartel DP. Cell. 2004 Enero 23; 116 (2): 281-97 MicroARNs: genomics, biogenesis, mechanism, and function). El proceso correspondiente en plantas se refiere comúnmente como un silenciamiento del gen post-transcripcional específico o silenciamiento del ARN y también se refiere como mitigación en hongos. Un ARNsi es una molécula de ARN de cadena doble que sub-regula o silencia (previene) la expresión de un gen/ARNm de su contraparte endógena (celular). El ARN de interferencia se basa en la capacidad de las especies de ARNs para entrar a un complejo de proteína específico, en donde se dirige entonces al ARN celular complementario y lo degrada específicamente. Por lo tanto, la respuesta del ARN de interferencia caracteriza un complejo de endonucleasa que contiene un ARNsi, comúnmente referido como un complejo para silenciamiento inducido por ARN (RISC), el cual media la escisión del ARN de cadena sencilla que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARNsi duplex. La escisión del ARN
30 objetivo puede tomar lugar en la parte media de la región complementaria a la cadena antisentido del ARNsi duplex (Elbashir et al 2001, Genes Dev., 15, 188). Con mayor detalle, los ARNs más largos se digieren hacia fragmentos cortos de ARNs (17-29 pb) (también referidos como ARN cortos inhibidores - "ARNsi") mediante las ARNsas tipo III (DICER, DROSHA, etc., Bernstein et al., Nature, 2001, v. 409, p. 363-6; Lee et al., Nature, 2003, 425, p. 415-9). El complejo de proteína RISC reconoce estos fragmentos y el ARNm complementario. El proceso completo culmina por la escisión de la endonucleasas del ARNm objetivo (McManus & Sharp, Nature Rev Genet, 2002, v. 3, p. 737-47; Paddison & Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003 Junio; 5 (3): 217-24). Para información sobre estos términos y mecanismos propuestos, véase Bernstein E., Denli AM. Hannon GJ: 2001 The rest is silence. ARN. 1; 7 (11): 1509-21; Nishikura K.: 2001 A short primer on ARNi: ARN-directed ARN polymerase acts as a key catalyst. Cell. 116; 107 (4): 415-8 y la Publicación PCT WO 01/36646 (Glover et al).

40 La selección y síntesis de ARNsi que corresponde a los genes conocidos han sido ampliamente reportados; véase por ejemplo Chalk AM, Wahlestedt C, Sonhammer EL. 2004 Improved and automated prediction of effective siARN Biochem. Biophys. Res. Commun. Junio 18; 319 (1): 264-74; Sioud M, Leirdal M., 2004, Potential design rules and enzymatic synthesis of siARNs, Methods Mol Biol; 252: 457-69; Levenkova N, Gu Q, Rux JJ. 2004, Gene specific siARN selector Bioinformatics. 12; 20 (3): 430-2. y Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K., Guidelines for the selection of highly effective siARN sequences for mammalian and chick ARN interference Nucleic Acids Res. 2004 I 9; 32 (3): 936-48. Véase también Liu Y, Braasch DA, Nulf CJ, Corey DR. Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids, Biochemistry, 2004 I 24; 43 (7): 1921-7. Véase también las publicaciones PCT WO 2004/015107 (Atugen) y WO 02/44321 (Tuschl et al), y también Chiu YL, Rana TM. siARN function in ARNi: a chemical modification analysis, ARN 2003 Septiembre; 9 (9): 1034-48 y Patentes I Nos. 5898031 y 6107094 (Crooke) para la producción de ARNsi modificados/más estables.

55 Varios grupos han descrito el desarrollo de vectores basados en ADN capaces de generar ARNsi en las células. El método generalmente incluye la transcripción de ARN cortos en horquilla que se procesan eficientemente para formar ARNsi dentro de las células. Paddison et al. PNAS 2002, 99: 1443-1448; Paddison et al. Genes & Dev 2002, 16: 948-958; Sui et al. PNAS 2002, 8: 5515-5520; y Brummelkamp et al. Science 2002, 296: 550-553. Estos reportes describen los métodos para generar ARNsi capaces de dirigir específicamente numerosos genes que se expresan endógenamente y exógenamente.

El ARNsi recientemente se ha utilizado exitosamente para la inhibición en primates; para detalles adicionales véase Tolentino et al., Retina 24 (1) Febrero 2004 | 132-138.

El gen y polipéptido p53

5 El gen p53 de humano es un gen bien conocido y altamente estudiado. El polipéptido p53 desempeña un papel clave en los mecanismos de respuesta al estrés celular mediante la conversión de una variedad de diferentes estímulos, por ejemplo condiciones de daño al ADN, tales como irradiación gamma, desregulación de la transcripción o la replicación, y transformación del oncogen, en la detención del crecimiento celular o apoptosis (Gottlieb et al, 1996, Biochem. Biophys. Acta, 1287, p.77). El polipéptido p53 es esencial para la inducción de muerte celular programada o "apoptosis" como una respuesta a tales estímulos. La mayoría de las terapias anticáncer dañan o eliminan a las células normales que contienen la p53 nativa, ocasionando efectos colaterales severos asociados con el daño o la muerte de las células sanas. Puesto que tales efectos colaterales son en gran parte determinados por la muerte de las células normales mediada por p53, la supresión temporal de p53 durante la fase aguda de terapia anticáncer se ha sugerido como una estrategia terapéutica para evitar estos eventos tóxicos severos. Esto se describe en la Patente de E.U.A. No. 6,593,353 y en Komarov PG et al, 1999, A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy., Science, 285 (5434): 1651, 1653. Se ha mostrado que p53 está implicado en la alopecia inducida por quimioterapia y radiación. (Botcharev et al, 2000, p53 is essential for Chemotherapy-induced Hair Loss, Cancer Research, 60, 5002-5006).

Alopecia

20 Recientemente ha habido avances dramáticos en el entendimiento de las moléculas y rutas que regulan la formación del folículo piloso y el crecimiento del cabello. La quimioterapia altera la proliferación de los queratinocitos de la matriz en el bulbo de crecimiento que produce la columna del cabello. Esto fuerza a los folículos pilosos a entrar a un estado de regresión distrófica en el cual la integridad de la columna del cabello se compromete y entonces el cabello se rompe y se cae. Debido a que más del 90% de los folículos del cuero cabelludo se encuentran en etapa de crecimiento en cualquier momento, estos cabellos se pierden rápidamente después de la quimioterapia, y por lo tanto la alopecia es rápida y extensiva (George Cotsarelis y Sarah E. Millar, 2001, Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment, TRENDS in Molecular Medicine Vol. 7 No. 7). Los fármacos para quimioterapia que más probablemente ocasionan pérdida de cabello son: Cisplatina, Citarabina, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Epirubicina, Etopósido, Ifosfamida y Vincristina. La alopecia general inducida por radiación se observa en virtualmente 100% de los pacientes que reciben radiación cerebral total (WBR -por sus siglas en inglés), particularmente de 3000 rad y por arriba de ésta.

35 La pérdida de cabello es uno de los efectos colaterales más temidos de la quimioterapia entre los pacientes con cáncer, aún cuando el cabello perdido después de la terapia eventualmente crece de nuevo. Desde la perspectiva del paciente, la pérdida de cabello (alopecia) se clasifica como segunda solamente después de la náusea como un efecto colateral angustiante de la quimioterapia. Aproximadamente 75% de los pacientes describen la pérdida de cabello inducida por quimioterapia como igual a o más devastadora que el dolor ocasionado por el cáncer.

40 Por lo tanto, aunque los trastornos del cabello no son una amenaza para la vida, su impacto profundo en las interacciones sociales y en el bienestar psicológico de los pacientes es innegable. La demanda de tratamientos para la pérdida del cabello impulsa una industria de múltiples miles de millones de dólares. A pesar de esto, los productos más habitualmente comercializados son ineficientes, evidenciado por el hecho de que la FDA ha aprobado solamente dos tratamientos para la pérdida del cabello. Ninguna de las terapias o remedios conocidos es efectiva sobre la alopecia inducida por terapia para el cáncer.

Insuficiencia renal aguda (ARF)

45 La ARF es un síndrome químico caracterizado por el deterioro rápido de la función renal que ocurre en cuestión de días. La característica principal de la ARF es una declinación abrupta en la velocidad de filtración glomerular (GFR), que resulta en la retención de desechos nitrogenados (urea, creatinina). En la población mundial general anualmente se presentan 170-200 casos de ARF severo por millón de habitantes. Hasta la fecha, no existe un tratamiento específico establecido para la ARF. Se han encontrado varios fármacos para mejorar la ARF tóxica e isquémica, como se manifiesta por los niveles más bajos de creatinina en suero, daño histológico reducido y recuperación más rápida de la función renal en diferentes modelos animales. Estos incluyen antioxidantes, bloqueadores del canal de calcio, diuréticos, sustancias vasoactivas, factores de crecimiento, agentes anti-inflamatorios y más. Sin embargo, aquellos fármacos que se han estudiado en ensayos clínicos no mostraron beneficios, y su uso en la ARF clínica no ha sido aprobado.

55 En la mayoría de los pacientes hospitalizados, la ARF se ocasiona por la necrosis tubular aguda (ATN - por sus siglas en inglés), la cual resulta a partir de ataques isquémicos y/o nefróticos. La hipoperfusión renal se ocasiona por choque hipovolémico, cardiogénico y séptico, mediante la administración de fármacos vasoconstrictores o la lesión renovascular. Las nefrotoxinas incluyen toxinas exógenas tales como medio de contraste y aminoglicósidos así

como toxina endógena tal como mioglobina. Los estudios recientes, sin embargo, apoyan que la apoptosis en los tejidos renales es prominente en la mayoría de los casos de la ARF de humano. El sitio principal de muerte celular apoptótica es la nefrona distal. Durante la fase inicial de la lesión isquémica, la pérdida de integridad del citoesqueleto de actina lleva al aplanamiento del epitelio, con pérdida del borde en cepillo, pérdida de los contactos celulares focales, y separación subsecuente de la célula a partir del sustrato subyacente. Se ha sugerido que la muerte apoptótica de la célula del túbulo puede ser más predictiva de cambios funcionales que la muerte celular necrótica (Komarov et al. Science. 1999 Septiembre 10; 285 (5434): 1733-7); véase también (Supavekin et al. Kidney Int. 2003 Mayo; 63 (5): 1714-24).

La WO03/064625 divulga compuestos de siARN que direccionan a p53; ninguno de estos compuestos, sin embargo es muy eficiente, ya que ninguno de ellos mostró subregulación completa del gen p53, incluso cuando se probó a una concentración de 50 nM.

En conclusión, actualmente no existen modos satisfactorios de terapia para la prevención y/o tratamiento de la alopecia tóxica y de la insuficiencia renal aguda, ni existe un modo satisfactorio de terapia para muchas otras enfermedades y trastornos que se acompañan por un nivel elevado del polipéptido p53, y por lo tanto existe una necesidad para desarrollar compuestos novedosos para este propósito.

Resumen de la invención

La invención provee oligorribonucleótidos novedosos de cadena doble que inhiben el gen p53. Es decir, compuestos ARNsi de doble cadena que tienen la estructura:

5' ugaagguguaauuucuc - Z 3' (cadena antisentido SEQ ID NO:48)

3' Z'-acuuccacuuuaagag (cadena en sentido SEQ ID NO:25);

en donde cada a, c, u y g es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une a la siguiente ribonucleótido por un enlace covalente; y

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y se une covalentemente al extremo 3' de la cadena en donde está presente; y en donde ribonucleótidos que alternan tanto en la cadena antisentido como en la cadena en sentido se modifican en su residuo de azúcar de tal manera que un grupo 2'-O-metilo está presente y ribonucleótidos modificados en el azúcar con 2'-O-metilo están presentes en el terminal 5' y el terminal 3' de la cadena antisentido y ribonucleótidos no modificados están presentes en el terminal 5' y el terminal 3' de la cadena en sentido. La descripción también divulga una composición farmacéutica que comprende uno o más de tales oligorribonucleótidos, y un vector capaz de expresar el oligorribonucleótido. La presente invención también provee dichos oligorribonucleótidos para uso en un método para el tratamiento de un paciente que padece de una enfermedad en la cual la inhibición temporal (reversible) de la actividad de p53 es beneficiosa, que comprende administrar al paciente uno o más oligorribonucleótidos típicamente como una composición farmacéutica, en una dosis terapéuticamente efectiva de manera que se trata así al paciente. La presente invención también contempla dichos oligorribonucleótidos para uso en el tratamiento de otros trastornos los cuales son acompañados por un elevado nivel del polipéptido p53. Puesto que la inactivación de p53 a largo plazo puede incrementar significativamente el riesgo del cáncer, se prefiere que la inhibición de p53 utilizando las moléculas de la presente invención sea temporal

En una realización preferida, las moléculas novedosas de ARNsi divulgadas en la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento de tumores en los casos en donde la supresión temporal de p53 utilizando el ARNsi de p53 podría ser beneficiosa junto con la quimioterapia convencional (como se describe en la presente invención) o radioterapia. Por ejemplo, las moléculas novedosas de ARNsi divulgadas en la presente invención podrían proteger a las células normales que contienen p53 de la apoptosis inducida por quimioterapia o por radioterapia. Las moléculas novedosas de ARNsi divulgadas en la presente invención también se pueden utilizar para la inhibición de la expresión de p53 en células cancerosas específicas en los casos en donde la inhibición de p53 potencia la muerte celular apoptótica en estas células. Específicamente, la terapia por radiación y la quimioterapia pueden ocasionar efectos colaterales severos, tales como daño severo al sistema al linfóide y hematopoyético y al epitelio intestinal, lo cual limita la efectividad de estas terapias, y puede ocasionar pérdida de cabello lo cual ocasiona alteración psicológica. Estos efectos colaterales se ocasionan por la apoptosis mediada por p53. Por lo tanto, para eliminar o reducir los efectos colaterales adversos asociados con el tratamiento del cáncer, podría ser beneficioso inducir la inhibición temporal de la actividad de p53 en células normales utilizando las moléculas de ARNsi de la presente invención, protegiendo así al tejido normal.

En otra realización preferida, las moléculas novedosas de ARNsi divulgadas en la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento de la insuficiencia renal aguda (ARF), la cual se caracteriza por el rápido deterioro de la función renal asociada con la muerte celular apoptótica en el tejido renal.

5 Las moléculas novedosas de ARNsi divulgadas en la presente invención también se pueden utilizar en otras condiciones en las cuales p53 se activa como una consecuencia de una variedad de tensiones asociadas con lesiones tales como una quemadura, hipertermia, hipoxia asociada con un suministro sanguíneo bloqueado tal como un infarto al miocardio, accidente cerebrovascular, e isquemia. La inhibición temporal de p53 utilizando las moléculas de ARNsi de la presente invención puede ser terapéuticamente efectiva en la reducción o eliminación de la muerte neuronal dependiente de p53 en el sistema nervioso central, por ejemplo, lesión cerebral y de la médula espinal, la preservación de tejidos y órganos antes del trasplante, preparación de un huésped para un trasplante de médula ósea, y reducción o eliminación del daño neuronal durante un ataque.

10 p53 también desempeña un papel en el envejecimiento celular. En particular, las alteraciones morfológicas y fisiológicas de los tejidos normales asociadas con el envejecimiento se pueden relacionar con la actividad de p53. Se sabe que las células senescentes que se acumulan en los tejidos durante el tiempo mantienen niveles muy elevados de transcripción dependiente de p53. La secreción de los inhibidores del crecimiento dependiente de p53 por las células senescentes se acumula en los tejidos envejecidos. Por lo tanto, las moléculas de ARNsi divulgadas en la presente invención también se pueden utilizar en la supresión del envejecimiento del tejido.

15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Esta figura representa la secuencia nucleotídica del gen p53 de humano- SEQ ID NO: 1.

Figura 2. Esta figura representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido p53 de humano - SEQ ID NO: 2.

Figura 3. Esta figura muestra los resultados de Inmunoprecipitación Western que demuestran el efecto de diversos ARNsi de p53 de humano sobre la expresión de p53.

20 Figuras 4. Esta figura muestra los resultados de de Inmunoprecipitación Western que demuestran el efecto de diversos ARNsi de p53 de ratón sobre la expresión de p53.

Figura 5. Esta figura muestra el nivel de la creatinina en suero como un indicador para la insuficiencia renal aguda en animales que se someten a fijación bilateral arterial del riñón y fueron tratados con un compuesto de ARNsi p53 o un control, como se indica.

25 Figura 6. Esta figura muestra el grado de necrosis tubular en el tejido renal en animales que se someten a fijación bilateral arterial del riñón y fueron tratados con el compuesto de ARNsi de p53.

Figura 7. Esta figura demuestra que el tratamiento con ARNsi p53 subregula la expresión del gen proapoptótico Puma en el compartimiento cortical del riñón en un animal sometido a lesión renal por isquemia-reperfusión.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere generalmente a compuestos que subregulan la expresión del gen p53 particularmente hacia ARN de interferencia pequeños novedosos (siARNs), y al uso de estos ARNsi novedosos en el tratamiento de diversas enfermedades y condiciones médicas en particular alopecia o insuficiencia renal aguda o un trastorno acompañado por un nivel elevado del polipéptido p53. Los compuestos ARNsi de doble cadena de la invención tienen la estructura:

35 5' ugaagggugaaauaucuc - Z 3' (cadena antisentido SEQ ID NO:48)

3' Z'-acuuccacuuuaagag (cadena en sentido SEQ ID NO:25);

en donde cada a, c, u y g es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido por un enlace covalente; y

40 en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y se une covalentemente al extremo 3' de la cadena en donde está presente; y

en donde ribonucleótidos que alternan tanto en la cadena antisentido como en la cadena en sentido se modifican en su residuo de azúcar de tal manera que un grupo 2'-O-metilo está presente y ribonucleótidos modificados en el azúcar con 2'-O-metilo están presentes en el terminal 5' y el terminal 3' de la cadena antisentido y ribonucleótidos no modificados están presentes en el terminal 5' y el terminal 3' de la cadena en sentido.

45 Los inventores de la presente invención han encontrado que es beneficioso inducir la inhibición temporal de p53 con el objeto de tratar cualesquiera de dichas enfermedades o trastornos.

La presente invención provee métodos y composiciones para inhibir la expresión de un gen p53 objetivo in vivo. En general, el método incluye la administración de ARN pequeños de interferencia (por ejemplo, ARNsi) de la invención que se dirigen a un ARNm particular de p53 e hibridan a, o interactúan con, los ARNm bajo condiciones biológicas (en la célula), o un material de ácido nucleico que puede producir ARNsi en una célula, en una cantidad adecuada para subregular la expresión de un gen objetivo mediante un mecanismo de ARN de interferencia. En particular, el presente método se puede utilizar para inhibir la expresión del gen p53 para el tratamiento de una enfermedad.

De acuerdo con la presente invención, las moléculas de ARNsi o inhibidores del gen p53 se pueden utilizar como fármacos para tratar diversas patologías en particular alopecia o insuficiencia renal aguda u otros trastornos acompañados por un elevado nivel del polipéptido p53. Puesto que la inactivación a largo plazo de p53 puede incrementar significativamente el riesgo del cáncer, se prefiere que la inhibición de p53 utilizando las moléculas de la presente invención sea temporal/reversible.

La presente invención provee oligorribonucleótidos de cadena doble (ARNsi), los cuales subregulan la expresión del gen p53. Un ARNsi de la invención es un oligorribonucleótido duplex en el cual la cadena en sentido se deriva a partir de la secuencia de ARNm del gen p53, y la cadena antisentido es complementaria a la cadena en sentido. En general, se tolera cierta desviación a partir de la secuencia de ARNm objetivo sin comprometer la actividad del ARNsi (véase por ejemplo Czauderna et al 2003 *Nucleic Acids Research* 31 (11), 2705-2716). Un ARNsi de la invención inhibe la expresión del gen en un nivel posttranscripcional con o sin destrucción del ARNm. Sin atenerse a la teoría, el siARN puede dirigir la ARNm para escisión específica y degradación y/o puede inhibir la traducción a partir del mensajero dirigido.

Existen al menos cuatro variantes de los polipéptidos p53 (véase Bourdon et al. *Genes Dev.* 2005; 19: 2122-2137). La secuencia dada en la figura 1 es la secuencia de nucleótidos de gi-8400737. La secuencia polipeptídica correspondiente tiene 393 aminoácidos; véase la figura 2. Todas las variantes y cualesquiera otras variantes menores similares se incluyen en la definición del polipéptido p53 y en la definición de los genes p53 que los codifican.

Como se utiliza en la presente invención, el término "gen p53" se define como cualquier homólogo del gen p53 que tiene preferiblemente 90% de homología, más preferiblemente 95% de homología, e incluso más preferiblemente 98% de homología con respecto a la región codificante de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que se unen al gen p53 bajo condiciones de hibridación altamente severas, las cuales se conocen bien en la técnica (por ejemplo, véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), actualizado en 1995 y 1998.

Como se utiliza en la presente invención, el término "p53", o "polipéptido p53" se define como cualquier homólogo del polipéptido p53 que tiene preferiblemente 90% de homología, más preferiblemente 95% de homología, e incluso más preferiblemente 98% de homología con respecto a la SEQ ID NO: 2, ya sea como un elemento de longitud total o un fragmento o un dominio del mismo, como un mutante o el polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos variantes procesada, como una quimera con otros polipéptidos, con la condición de que cualesquiera de los anteriormente mencionados tenga la misma o sustancialmente la misma función biológica que el polipéptido p53.

Generalmente, los ARNsi divulgados en la presente descripción comprenden un ácido ribonucleico que comprende una estructura en cadena doble, por medio de la cual la estructura de cadena doble comprende una primera cadena y una segunda cadena, por medio de la cual la primera cadena comprende una primera extensión de nucleótidos contiguos y por medio de la cual dicha primera extensión es al menos parcialmente complementaria a un ácido nucleico objetivo, y la segunda cadena comprende una segunda extensión de nucleótidos contiguos y por medio de la cual dicha segunda extensión es al menos parcialmente idéntica a un ácido nucleico objetivo, por medio de la cual dicha primera cadena y/o dicha segunda cadena comprenden una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2' por medio de la cual dentro de la cadena cada grupo de nucleótidos modificados esta flanqueado en uno o ambos lados por un grupo flanqueante de nucleótidos por medio del cual los nucleótidos flanqueantes que forman el grupo flanqueante de nucleótidos es ya sea un nucleótido no modificado o un nucleótido que tiene una modificación diferente en comparación con la modificación de los nucleótidos modificados. Además, dicha primera cadena y/o dicha segunda cadena pueden comprender dicha pluralidad de nucleótidos modificados y pueden comprender dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.

El grupo de nucleótidos modificados y el grupo de nucleótidos flanqueantes comprenden un nucleótido

El patrón de nucleótidos modificados de dicha primera cadena se desplaza por un nucleótido con relación al patrón de los nucleótidos modificados de la segunda cadena.

Las modificaciones descritas anteriormente son modificaciones metoxi.

La estructura en cadena doble del ARNsi puede tener extremos romos, en uno o ambos lados. Más específicamente, la estructura en cadena doble puede tener extremos romos en los lados de la estructura de doble

cadena que se define por el extremo hacia 5' de la primera cadena y el extremo hacia 3' de la segunda cadena, o la estructura en cadena doble puede tener extremos romos en las partes laterales de la estructura en cadena doble que se define por el extremo 3' de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena.

- 5 Adicionalmente, al menos una de las dos cadenas puede tener un extremo colgante de al menos un nucleótido en el extremo 5'; el extremo colgante puede consistir de al menos un desoxirribonucleótido. Al menos una de las cadenas también puede tener opcionalmente un extremo colgante de al menos un nucleótido en el extremo 3'.

La longitud de la estructura de cadena doble del ARNsi típicamente es de 19 bases

- 10 La primera cadena y la segunda cadena pueden estar enlazadas por una estructura de bucle, que puede estar compuesta de un polímero de ácido no nucleico tales como, entre otros, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura de bucle puede estar compuesta de un ácido nucleico.

Además, el extremo hacia 5' de la primera cadena del ARNsi se puede enlazar al extremo hacia 3' de la segunda cadena, o el extremo hacia 3' de la primera cadena se puede enlazar al extremo hacia 5' de la segunda cadena, dicha unión siendo a través de un enlazador de ácido nucleico que típicamente tiene una longitud de entre 10-2000 nucleobases.

- 15 En particular, la invención provee un compuesto que tiene la estructura A:

5' (N)_x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')_y 5' (cadena en sentido)

en donde cada N y N' es un ribonucleótido el cual puede estar modificado o no modificado en su residuo de azúcar y (N)_x y (N')_y es oligómero en el cual cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

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

en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y está covalentemente unido en el extremo 3' de la cadena en la cual está presente;

y en donde la secuencia de (N)_x es SEQ ID NO:48 y (N')_y es SEQ ID NO:25.

- 25 Se entenderá fácilmente por aquellos expertos en la técnica que los compuestos de la presente invención consisten de una pluralidad de nucleótidos, los cuales están enlazados a través de enlaces covalentes. Cada uno de dichos enlaces covalentes puede ser un enlace fosfodiéster, un enlace de fosfotioato, o una combinación de ambos, a lo largo de la longitud de la secuencia nucleotídica de la cadena individual. Otras modificaciones posibles de la estructura base se describen entre otras en las Patentes de E.U.A. Nos. 5,587,361; 6,242,589; 6,277,967; 6,326,358; 5,399,676; 5,489,677; y 5,596,086.

- 30 De acuerdo con la invención x = y = 19.

En una realización del compuesto de la invención, Z y Z' están ambos ausentes; en otra realización uno de Z o Z' está presente.

- 35 En la invención, los ribonucleótidos alternos se modifican tanto en las cadenas antisentido como sentido del compuesto. En particular los ARNsi utilizados en los ejemplos han sido modificados de tal manera que un grupo 2'-O-Me estaba presente en el primer, tercer, quinto, séptimo, noveno, onceavo, treceavo, quinceavo, decimoséptimo y decimonoveno nucleótido de la cadena antisentido, por medio del cual la misma modificación, esto es un grupo 2'-O-Me estaba presente en el segundo, cuarto, sexto, octavo, décimo, doceavo, catorceavo, decimosexto y décimo octavo nucleótido de la cadena en sentido.

La secuencia del ARNsi es aquella de I5 en la Tabla A.

- 40 De acuerdo con una realización preferida de la invención, las cadenas antisentido y sentido de la molécula de ARNsi están ambas fosforiladas solamente en el extremo hacia 3' y no en el extremo hacia 5'. De acuerdo con otra realización preferida de la invención, las cadenas antisentido y sentido están ambas no fosforiladas tanto en el extremo hacia 3' como también en el extremo hacia 5'.

En el compuesto de la invención, los ribonucleótidos en los extremos hacia 5' y 3' de la cadena antisentido se modifican en sus residuos azúcar, y los ribonucleótidos en los extremos hacia 5' y 3' de la cadena en sentido no están modificados en sus residuos azúcar.

5 La descripción provee adicionalmente un vector capaz de expresar cualesquiera de los oligorribonucleótidos anteriormente mencionados en forma no modificada en una célula después de lo cual se puede realizar una modificación adecuada.

La invención también provee una composición que comprende uno o más de los compuestos de la invención en un vehículo, preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más ARNs diferentes.

10 La invención también provee una composición que comprende el compuesto anteriormente mencionado de la invención covalentemente o no covalentemente unido a uno o más compuestos de la invención en una cantidad efectiva para inhibir la p53 de humano y un vehículo. Esta composición se puede procesar intracelularmente mediante complejos celulares endógenos para producir uno o más oligorribonucleótidos de la invención.

15 La invención también provee una composición que comprende un vehículo y uno o más de los compuestos de la invención en una cantidad efectiva para subregular la expresión en una célula de un p53 de humano, dicho compuesto comprende una secuencia sustancialmente complementaria a la secuencia de (N)_x.

Adicionalmente la descripción divulga un método para subregular la expresión del gen p53 en al menos 50% en comparación con un control que comprende poner en contacto un transcrito de ARNm del gen p53 con uno o más de los compuestos de la invención.

20 En una realización el oligorribonucleótido subregula p53, por medio del cual la subregulación de p53 se selecciona a partir del grupo que comprende la subregulación de la función de p53, subregulación del polipéptido p53 y subregulación de la expresión del ARNm de p53.

25 En una realización el compuesto subregula un polipéptido p53, por medio del cual la subregulación de p53 se selecciona a partir del grupo que comprende subregulación de la función de p53 (lo cual se puede examinar mediante un ensayo enzimático o un ensayo de unión con un interactor conocido del gen/polipéptido nativo, entre otros), subregulación de la proteína p53 (lo cual se puede examinar por inmunoprecipitación Western, ELISA o inmunoprecipitación, entre otros) y subregulación de la expresión del ARNm de p53 (lo cual se puede examinar por Inmunoprecipitación Northern, RT-PCR cuantitativa, hibridación in-situ o hibridación en microarreglo, entre otros).

30 La invención también provee una composición para uso en un método de tratamiento de un paciente que padece de una enfermedad acompañada por un nivel elevado del polipéptido p53, el método que comprende administrar al paciente una composición de la invención en una dosis terapéuticamente efectiva tratando así al paciente. Preferiblemente, la presente invención provee dicho uso en un método para el tratamiento de un paciente que padece de una enfermedad en la cual la inhibición temporal de p53 es beneficiosa. En una realización preferida, las composiciones de la presente invención se utilizan para el tratamiento de tumores junto con la quimioterapia o radioterapia convencional con el objeto de prevenir la alopecia asociada con quimioterapia o radioterapia. En otra realización preferida, las composiciones de la presente invención se utilizan para el tratamiento de insuficiencia renal aguda. En aún otra realización preferida, las composiciones de la presente invención se utilizan en condiciones en las cuales p53 se activa como una consecuencia de una variedad de tensiones asociadas con lesiones tales como una quemadura, hipertermia, hipoxia asociada con un suministro sanguíneo bloqueado tal como en un infarto al miocardio, accidente cerebrovascular, e isquemia. La inhibición temporal de p53 utilizando las moléculas de ARNs de la presente invención puede ser terapéuticamente efectiva para reducir o eliminar la muerte neuronal dependiente de p53 en el sistema nervioso central, esto es, lesión cerebral y de la médula espinal, en la preservación de tejido y de un órgano antes del trasplante, preparación de un huésped para un trasplante de médula ósea, reducción o eliminación del daño neuronal durante un ataque y en la supresión del envejecimiento del tejido.

45 La invención también provee una dosis terapéuticamente efectiva de uno o más compuestos de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad acompañada por un nivel elevado del polipéptido p53, tal como en un paciente que padece de alopecia o insuficiencia renal aguda.

50 Más particularmente, la descripción divulga un oligorribonucleótido en donde una cadena comprende nucleótidos consecutivos que tienen, a partir de 5' hacia 3', la secuencia establecida en SEQ ID NOS: 3-25 (Tabla A, cadenas en sentido) o en SEQ ID NOS: 49-119 (Tabla B, cadenas en sentido) o en SEQ ID NOS: 191-253 (Tabla C, cadenas en sentido) o un homólogo de la misma en donde se alteran hasta 2 de los nucleótidos en cada región terminal base.

La región terminal del oligonucleótido se refiere a las bases 1-4 y/o 16-19 en la secuencia de 19 elementos y las bases 1-4 y/o 18-21 en la secuencia de 21 elementos.

Adicionalmente, la descripción divulga oligorribonucleótidos en donde una cadena comprende nucleótidos consecutivos que tienen, a partir de 5' hasta 3', la secuencia establecida en SEQ ID NOS: 26-48 (Tabla A, cadenas antisentido) o SEQ ID NOS: 120-190 (Tabla B, cadenas antisentido) o SEQ ID NOS: 254-316 (Tabla C, cadenas antisentido) o un homólogo de la misma en donde se alteran hasta 2 de los nucleótidos en cada región terminal base.

Los oligonucleótidos preferidos de la descripción son oligonucleótidos p53 de humano números de serie 3, 5, 20 y 23 en la Tabla D y oligonucleótidos p53 de ratón números de serie 1 11, 12, 14, 17 y 18 en la Tabla E. Estos son idénticos a los números de serie 3, 5, 20 y 23 (de humano) y también 11, 12, 14, 17 y 18 (de ratón) en la Tabla A. Los oligonucleótidos más preferidos de la invención son oligonucleótidos p53 de humano que tienen la secuencia de número de serie 23 en la Tabla A.

El compuesto actualmente más preferido de la invención es un oligonucleótido de 19 elementos que tiene extremos romos, esto es $x=y=19$ y Z y Z' están ambos ausentes. La molécula de oligonucleótido está ya sea fosforilada en los extremos hacia 3' de ambas cadenas en sentido y antisentido, o no están fosforiladas; o que tienen el 1er nucleótido en la posición hacia 5' en la cadena en sentido específicamente modificada para eliminar cualquier posibilidad de fosforilación in vivo hacia 5'. Los nucleótidos alternos están modificados en la posición 2' en ambas cadenas antisentido y sentido, en donde la unidad estructural en la posición 2' es metoxi (2'-O-metilo) y en donde los ribonucleótidos en los extremos 5' y 3' de la cadena antisentido se modifican en sus residuos azúcar, y los ribonucleótidos en los extremos 5' y 3' de la cadena en sentido no están modificados en sus residuos azúcar. Los compuestos actualmente más preferidos son tales oligonucleótidos modificados que comprenden las secuencias que tienen el número de serie 23 en la Tabla A.

Administración: Se han desarrollado sistemas de administración que se dirigen específicamente a la administración potenciada y mejorada del ARNsi dentro de células de mamíferos, véase, por ejemplo, Shen et al (FEBS letters 539: 111-114 (2003)), Xia et al., Nature Biotechnology 20: 1006-1010 (2002), Reich et al., Molecular Vision 9: 210-216 (2003), Sorensen et al. (J.Mol.Biol. 327: 761-766 (2003), Lewis et al., Nature Genetics 32: 107-108 (2002) y Simeoni et al., Nucleic Acids Research 31, 11: 2717-2724 (2003). El ARNsi recientemente se ha utilizado exitosamente para la inhibición en primates; para detalles adicionales véase Tolentino et al., Retina 24 (1) Febrero 2004 I 132-138. Las formulaciones respiratorias para ARNsi se describen en la Solicitud de Patente de E.U.A. No. 2004/0063654 de Davis et al. Los ARNsi conjugados a colesterol (y otros ARNsi conjugados a esteroide y a lípido) se pueden utilizar para administración véase Soutschek et al Nature 432: 173-177 (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siARNs; y Lorenz et al. Bioorg. Med. Chemistry. Lett. 14: 4975-4977 (2004) Steroid and lipid conjugates of siARNs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells.

Los ARNsi o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran y dosifican de acuerdo con la buena práctica médica, tomando en consideración la condición clínica del paciente individual, la enfermedad que se va a tratar, el sitio y método de administración, programa de administración, edad del paciente, sexo, peso corporal y otros factores conocidos por los médicos practicantes.

La "dosis terapéuticamente efectiva" para propósitos en la presente invención se determina así por tales consideraciones como se conocen en la técnica. La dosis debe ser efectiva para lograr una mejoría incluyendo pero no limitada a relación de supervivencia mejorada o recuperación más rápida, o mejoría o eliminación de síntomas y otras indicaciones como se seleccionan como medidas adecuadas por aquellos expertos en la técnica. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar mediante cualesquiera de las rutas de administración convencionales. Se debe mencionar que el compuesto se puede administrar como el compuesto o como una sal farmacéuticamente aceptable y se puede administrar sólo o como un ingrediente activo en combinación con vehículos, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos se pueden administrar oralmente, subcutáneamente o parenteralmente incluyendo administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitonealmente, 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 rutas de administración subcutáneas, transdérmicas, intravenosas, intramusculares, intratecales, y otras rutas de administración parental. Las composiciones líquidas incluyen soluciones acuosas, con y sin cosolventes orgánicos, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones con aceites comestibles, así como vehículos farmacéuticamente similares. Además, bajo ciertas circunstancias las composiciones para uso en los tratamientos novedosos de la presente invención se pueden formar como aerosoles, para administración intranasal y similares. El paciente que se va a tratar es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos incluyendo el hombre. Los vehículos, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables así como los vehículos del implante generalmente se refieren a agentes de relleno, diluyentes o material encapsulante inerte, no tóxico sólido o líquido, que no reacciona con los ingredientes activos de la invención e incluyen liposomas y microsferas. Los ejemplos de sistemas para administración útiles en la presente invención incluyen las Patentes de E.U.A Nos. 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos otros de tales implantes, sistemas de administración, y módulos se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. En una realización específica de esta invención se prefieren particularmente las formulaciones tópicas y transdérmicas.

En general, la dosis activa del compuesto para humanos se encuentra en el intervalo de 1 ng/kg a aproximadamente 20-100 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 2-10 mg/kg de peso corporal por día, en un régimen de una dosis por día o dos o tres o más veces por día por un período de 1 -4 semanas o mayor.

5 Se debe mencionar que la administración de los compuestos de ARNsi de conformidad con la presente invención a las células objetivo en los túbulos proximales del riñón es particularmente efectiva en el tratamiento de la insuficiencia renal aguda. Sin atenerse a la teoría, esto se puede deber al hecho de que normalmente las moléculas de ARNsi se excretan a partir del cuerpo a través de las células de los túbulos proximales del riñón. Así, las moléculas desnudas de ARNsi se concentran naturalmente en las células que se dirigen para la terapia en la
10 insuficiencia renal aguda.

El término "tratamiento" como se utiliza en la presente invención se refiere a la administración de una sustancia terapéutica efectiva para mejorar los síntomas asociados con una enfermedad, para aminorar la severidad o curar la enfermedad, o para prevenir que se presente la enfermedad.

15 En una realización particular, la administración comprende administración intravenosa. En otra realización particular la administración comprende administración tópica o local. Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica de la invención para uso en un método para el tratamiento de un paciente que padece de alopecia o de insuficiencia renal aguda o de un trastorno que se acompaña por un nivel elevado del polipéptido p53, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva de manera que se trata así al paciente.

20 En una realización preferida para el tratamiento de la alopecia, la administración comprende la administración tópica o local. En otra realización preferida la administración comprende administración transdérmica. En una realización particular la composición farmacéutica se aplica al cuero cabelludo del paciente. En una realización preferida para el tratamiento de ARF, la administración comprende administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal

25 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica de la invención para uso en un método para prevenir la alopecia en un paciente que se somete a un tratamiento el cual ocasiona alopecia, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva de manera que se trata así al paciente.

30 En otro aspecto de la invención se provee una composición farmacéutica que comprende cualesquiera de los oligorribonucleótidos anteriormente mencionados de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otro aspecto de la invención es el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de cualesquiera de los oligorribonucleótidos anteriormente mencionados para la preparación de un medicamento para promover la recuperación en un paciente que padece de alopecia o de insuficiencia renal aguda o de un trastorno que se acompaña por un nivel elevado de p53.

35 En una realización preferida, el medicamento comprende un medicamento tópico. En una realización particular el medicamento se aplica al cuero cabelludo del paciente. En otra realización preferida el medicamento comprende administración transdérmica

40 En todos los aspectos de la invención anteriormente mencionados la alopecia se puede inducir mediante quimioterapia o mediante radioterapia y se denomina entonces "alopecia tóxica". Con mayor detalle, la alopecia tóxica se puede ocasionar por la irradiación tal como irradiación gamma o mediante agentes quimioterapéuticos tales como etopósido, 5-FU (5-fluorouracilo), cis-platino, doxorubicina, con alcaloide vinca, vincristina, vinblastina, vinorelbina, taxol, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfan, mecloretamina, mitomicina, dacarbazina, carboplatino, tiotepa, daunorubicina, idarubicina, mitoxantrona, bleomicina, esperamicina A1, dactinomina, plicamicina, carmustina, lomustina, tauromustina, estreptozocina, melfalan, dactinomina, procarbazona, dexametasona, prednisona, 2-clorodesoxiadenosina, citarabina, docetaxel, fludarabina, gemcitabina, herceptina,
45 hidroxiaurea, irinotecan, metotrexato, oxaliplatina, rituxina, semustina, epirubicina, etopósido, tomudex y topotecano, o un análogo químico de uno de estos agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos que más probablemente ocasionan pérdida de cabellos son: cis-platino, citarabina, ciclofosfamida, doxorubicina, epirubicina, etopósido, ifosfamida y vincristina.

50 Los compuestos de la invención preferiblemente se utilizan para el tratamiento de la insuficiencia renal aguda, en particular la insuficiencia renal aguda debida a isquemia en pacientes después de la cirugía, y la insuficiencia renal aguda debida al tratamiento por quimioterapia tal como la administración de cisplatina o la insuficiencia renal aguda asociada con sepsis. Un uso preferido de los compuestos de la invención es para la prevención de la insuficiencia renal aguda en pacientes con alto riesgo que se someten a cirugía cardíaca mayor o cirugía vascular. Los pacientes con alto riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda se pueden identificar utilizando diversos métodos de
55 evaluación tales como el algoritmo de Cleveland Clinic o aquel desarrollado por US Academic Hospitals (QMMI) y

5 por la Veterans' Administration (CICSS). Otros usos preferidos de los compuestos de la invención son para la prevención de la insuficiencia renal aguda isquémica en pacientes con trasplante renal o para la prevención de la insuficiencia renal aguda tóxica en pacientes que recibieron quimioterapia. Otros usos son para cicatrización de
 10 células madre hematopoyéticas, preservación de órganos/tejidos para donación antes del trasplante al sumergirlos en una solución de ARNsi (tal vez mediante electroporación) y mejoría subsecuente de la supervivencia del tejido de injerto después del trasplante. Otras indicaciones pueden ser accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cardiotoxicidad inducida por doxorubicina, infarto del miocardio/insuficiencia cardíaca y mejoría de la supervivencia del tejido de injerto después del trasplante (mediante administración sistémica). Sin atenerse a la teoría todos estos trastornos se acompañan por un nivel elevado del polipéptido p53.

La presente invención también se provee para un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica, el cual comprende:

obtener uno o más compuestos de cadena doble de la invención; y

mezclar dicho compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La presente descripción también se provee para un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica, que comprende mezclar uno o más compuestos de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, el compuesto utilizado en la preparación de una composición farmacéutica se mezcla con un vehículo en una dosis farmacéuticamente efectiva. En una realización particular el compuesto de la presente
 20 invención se conjuga con un esteroide o con un lípido o con otra molécula adecuada por ejemplo con colesterol.

Las modificaciones o análogos de nucleótidos se pueden introducir para mejorar las propiedades terapéuticas de los nucleótidos. Las propiedades mejoradas incluyen resistencia incrementada a la nucleasa y/o capacidad incrementada para permear las membranas celulares.

25 Por consiguiente, la presente descripción también incluye todos los análogos de, o modificaciones a, un oligonucleótido de la invención que no afecta sustancialmente la función del polinucleótido u oligonucleótido. En una realización preferida tal modificación se relaciona con la unidad estructural base del nucleótido, con la unidad estructural de azúcar del nucleótido y/o con la unidad estructural fosfato del nucleótido.

30 En realizaciones de la descripción, los nucleótidos se pueden seleccionar a partir de bases que se presentan de manera natural o que están sintéticamente modificadas. Las bases que se presentan de manera natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de los oligonucleótidos incluyen inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo-, 2-propilo- y otras alquiloadeninas, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 6-aza citosina y 6-aza timina, pseudo uracilo, 4-tiuracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tioalquilo adenina, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halo guanina, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquilo guanina, 8-hidroxil guanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y desaza adeninas, otras aza y desaza
 35 guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina.

Además, se pueden preparar los análogos de nucleótidos en donde las estructuras de los nucleótidos se alteran fundamentalmente y son más adecuadas como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un péptido ácido nucleico (PNA) en donde la estructura base del desoxiribosa (o ribosa) fosfato en el ADN (o ARN) se reemplaza con una estructura base de poliamida similar a aquella encontrada en los péptidos. Se
 40 ha mostrado que los análogos de PNA son resistentes a la degradación por enzimas y tienen vidas extendidas in vivo e in vitro. Además, se ha mostrado que los PNAs se unen más fuertemente a una secuencia de ADN complementario que a una molécula de ADN. Esta observación se atribuye a la carencia de repulsión de carga entre la cadena de PNA y la cadena de ADN. Otras modificaciones que se pueden elaborar a los oligonucleótidos incluyen estructuras base de polímero, estructuras base cíclicas, o estructuras base acíclicas.

45 En una realización la modificación es una modificación de la unidad estructural fosfato, por medio de la cual la unidad estructural fosfato modificada se selecciona a partir del grupo que comprende fosfotioato.

Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar mediante cualesquiera de los métodos que se conocen bien en la técnica para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxiribonucleicos). Dicha síntesis, se describe, entre otros en Beaucage S. L. y Iyer R. P., Tetrahedron 1992; 48: 2223-2311, Beaucage S. L. y Iyer R. P., Tetrahedron 1993; 49: 6123-6194 y Caruthers M. H. et. al., Methods Enzymol. 1987; 154: 287-313; la síntesis de tioatos se describe, entre otros en Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 367-402, la síntesis de moléculas de ARN se describe en Sproat B., en Humana Press 2005 editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y se describen procesos respectivos corriente abajo, entre otros, en Pingoud A. et. al., en IRL Press 1989 editado por Oliver R.W.A.;

Kap. 7: 183-208 y Sproat B., en Humana Press 2005 editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 (anteriormente mencionado).

Otros procedimientos sintéticos se conocen en la técnica por ejemplo los procedimientos como se describen en Usman et al., 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe et al., 1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433; Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2684; y Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, y estos procedimientos pueden hacer uso de grupos comunes para protección y acoplamiento de ácidos nucleicos, tal como dimetoxitritilo en el extremo hacia 5', y fosforamiditas en el extremo hacia 3'. Los nucleótidos modificados (por ejemplo 2'-O-metilados) y los nucleótidos no modificados se incorporan como sea deseable.

Los oligonucleótidos de la presente invención se pueden sintetizar separadamente y se pueden unir post-sintéticamente, por ejemplo, mediante ligación (Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al., Publicación InteARNcional PCT No. WO 93/23569; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), o mediante hibridación después de la síntesis y/o desprotección.

Se debe mencionar que se puede utilizar una máquina comercialmente disponible (disponible, entre otros, a partir de Applied Biosystems); los oligonucleótidos se preparan de acuerdo con las secuencias divulgadas en la presente invención. La superposición de los pares de fragmentos químicamente sintetizados se puede ligar utilizando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la Patente de E.U.A. No. 6,121,426). Las cadenas se sintetizan separadamente y luego se fusionaron entre sí en el tubo. Luego, los ARNsi de cadena doble se separan a partir de los oligonucleótidos de cadena sencilla que no se fusionaron (por ejemplo debido al exceso de uno de ellos) mediante HPLC. En relación con los ARNsi o los fragmentos de ARNsi de la presente invención, dos o más de dichas secuencias se pueden sintetizar y asociar para uso en la presente invención.

Los compuestos de la invención también se pueden sintetizar a través de una metodología de síntesis en tándem, como se describe en la Solicitud de Publicación de Patente de E.U.A. No. US2004/0019001 (McSwiggen), en donde ambas cadenas de ARNsi se sintetizan como un fragmento o cadena particular de oligonucleótido contiguo separado por un enlazador escindible el cual se escinde subsecuentemente para proveer fragmentos o cadenas separadas de ARNsi que hibridan y permiten la purificación del dúplex de ARNsi. El enlazador puede ser un enlazador polinucleotídico o un enlazador no nucleotídico.

La presente descripción provee adicionalmente una composición farmacéutica que comprende dos o más moléculas de ARNsi para el tratamiento de cualesquiera de las enfermedades y condiciones mencionadas en la presente invención, por medio de las cuales dichas dos moléculas se pueden mezclar físicamente en la composición farmacéutica en cantidades que generan una actividad beneficiosa igual o una actividad beneficiosa de otra manera, o se pueden unir covalentemente o no covalentemente, o se pueden unir mediante un enlazador de ácido nucleico de una longitud que tiene un intervalo de 2-100, preferiblemente 2-50 o 2-30 nucleótidos. En un aspecto, las moléculas de ARNsi están comprendidas de una estructura de ácido nucleico de cadena doble como se describe en la presente invención, en donde las dos secuencias de ARNsi se seleccionan a partir de los Tablas A-C, preferiblemente a partir de la Tabla A, ID Nos: 3, 5, 20 y 23 (secuencias de humano) y 11, 12, 14, 17 y 18 (secuencias de ratón).

En otro aspecto, las moléculas de ARNsi están comprendidas de una estructura de ácido nucleico de cadena doble, en donde la primera secuencia de ARNsi se selecciona a partir de los Tablas A-C, preferiblemente a partir de la Tabla A, ID Nos: 3, 5, 20 y 23 (secuencias p53 de humano) u 11, 12, 14, 17 y 18 (secuencias p53 de ratón) y la segunda moléculas de ARNsi dirige un gen pro-apoptótico, proviendo así actividad beneficiosa. La estructura en tándem de cadena doble que comprende dos o más secuencias de ARNsi se procesa de manera intracelular para formar dos o más ARNsi diferentes. Dicha segunda molécula de ARNsi preferiblemente es una molécula de ARNsi que dirige a un gen pro-apoptótico.

Las moléculas de ARNsi están unidas covalentemente o no covalentemente o están unidas mediante un enlazador para formar una molécula de ARNsi en tándem. Dichas moléculas de ARNsi en tándem que comprenden dos secuencias de ARNsi típicamente son de 38-150 nucleótidos en longitud, más preferiblemente 38 o 40- 60 nucleótidos en longitud, y más larga dependiendo de si se incluyen más de dos secuencias de ARNsi en la moléculas en tándem. Una molécula en tándem más larga comprende dos o más secuencias más largas que codifican el ARNsi producido a través del procesamiento celular interno, por ejemplo, el ARNds largo, también se considera, puesto que es una molécula en tándem que codifica dos o más ARNsh. Tales moléculas en tándem también se consideran parte de la presente invención.

Las moléculas de ARNsi que dirigen p53 pueden ser el componente activo principal en una composición farmacéutica, o puede ser un componente activo de una composición farmacéutica que contiene dos o más ARNsi (o moléculas que codifican o que producen endógenamente dos o más ARNsi, ya sea en una mezcla de moléculas o en una o más moléculas en tándem que codifican dos o más ARNsi), dicha composición farmacéutica está comprendida adicionalmente de una o más moléculas adicionales de ARNsi que dirigen uno o más genes

adicionales. La inhibición simultánea de p53 y dicho(s) gen(es) adicional(es) probablemente tendrá un efecto aditivo o sinérgico para el tratamiento de las enfermedades divulgadas en la presente invención.

En un ejemplo específico, la composición farmacéutica para el tratamiento de las enfermedades divulgadas en la presente invención puede estar comprendida de las siguientes combinaciones de compuestos: 1) ARNsi de p53 y ARNsi de Fas; 2) ARNsi de p53 y ARNsi de Bax; 3) ARNsi de p53 y ARNsi de Noxa; 4) ARNsi de p53 y ARNsi de Puma; 5) ARNsi de p53 y ARNsi de RTP801; 6) ARNsi de p53 y ARNsi de PIDD; 7) ARNsi de p53, ARNsi de Fas y cualesquiera de ARNsi de RTP801, ARNsi de Bax, ARNsi de Noxa o ARNsi de Puma o ARNsi de PIDD para formar trímeros o polímeros (por ejemplo, moléculas en tándem de codifican tres ARNsi). Otras opciones preferidas de genes proapoptóticos para ser combinados con el ARNsi de p53 son TNF α , caspasa 2, caspasa 3, caspasa 9, E2F1, y PARP-1. Una combinación preferida de acuerdo con la presente invención es ARNsi de p53 y ARNsi de RTP801. (Véase la Solicitud de Patente PCT PCT/EP 2005/008891).

Adicionalmente, el ARNsi de p53 o cualquier molécula de ácido nucleico que comprende o que codifica el ARNsi de p53 se puede asociar (covalentemente o no covalentemente) a anticuerpos en contra de moléculas que se internalizan en la superficie celular expresadas en las células objetivo, con el objeto de lograr un direccionamiento potenciado para el tratamiento de las enfermedades divulgadas en la presente invención. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Fas (preferiblemente un anticuerpo neutralizante) se puede combinar con una molécula de ARNsi de p53.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar ya sea directamente o con vectores virales o no virales. Cuando se administran directamente generalmente las secuencias se vuelven resistentes a nucleasa. Alternativamente se pueden incorporar las secuencias dentro de casetes de expresión o de constructos de tal manera que la secuencia se expresa en la célula como se discute en la presente invención a continuación. Generalmente el constructo contiene la secuencia reguladora adecuada o promotor para permitir que la secuencia se exprese en la célula dirigida. Los vectores opcionalmente utilizados para la administración de los compuestos de la presente invención están comercialmente disponibles, y se pueden modificar para el propósito de la administración de los compuestos de la presente invención mediante métodos conocidos por un experto en la técnica.

También se considera que un oligonucleótido largo (típicamente de 25-500 nucleótidos en longitud) que comprende una o más estructuras tallo y bucle, en donde las regiones tallo comprenden las secuencias de los oligonucleótidos de la invención, se puede administrar en un vehículo, preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se puede procesar intracelularmente mediante complejos celulares endógenos (por ejemplo mediante DROSHA y DICER como se describió anteriormente) para producir uno o más oligonucleótidos más pequeños de cadena doble (ARNsi) los cuales son oligonucleótidos de la invención. Este oligonucleótido se puede denominar como un constructo de ARNsh en tándem. Se considera que este oligonucleótido largo es un oligonucleótido de cadena sencilla que comprende una o más estructuras tallo y bucle, en donde cada región tallo comprende una secuencia sentido y antisentido del ARNsi correspondiente de un gen p53. En particular, se considera que este oligonucleótido comprende secuencias del ARNsi sentido y antisentido como se ilustra en cualesquiera de los Tablas A, B o C.

Como se utiliza en la presente invención, el término "polipéptido" se refiere a, además de un polipéptido, un oligopéptido, péptido y una proteína completa.

Selección de los compuestos para inactivación de p53:

Algunos de los compuestos y composiciones de la presente invención se pueden utilizar en un ensayo de selección para identificar y aislar compuestos que modulan la actividad de p53, en particular compuestos que modulan la alopecia o la insuficiencia renal aguda o un trastorno acompañado por un nivel elevado del polipéptido p53. Los compuestos a ser seleccionados comprenden entre otros, sustancias tales como moléculas químicas pequeñas y oligonucleótidos antisentido.

La actividad inhibidora de los compuestos de la presente invención sobre la actividad del polipéptido p53 o sobre la unión de los compuestos de la presente invención a p53 se puede utilizar para determinar la interacción de un compuesto adicional con el polipéptido p53, por ejemplo, si el compuesto adicional compite con los oligonucleótidos de la presente invención para la inhibición de p53, o si el compuesto adicional rescata de dicha inhibición. La inhibición o activación se puede evaluar mediante diversos medios, tales como, entre otros, ensayo para la producción de la actividad del polipéptido p53 o desplazamiento del compuesto de unión a partir del polipéptido p53 en ensayos de competencia por el elemento radiactivo o fluorescente.

La presente invención se ilustra en detalle a continuación con referencia a los ejemplos, pero no se considera como limitada a la misma.

No se pretende que la cita de cualquier documento en la presente invención sea una admisión de que dicho documento es una técnica anterior pertinente, o se considera material para la patentabilidad de cualquier

reivindicación de la presente solicitud. Cualquier aseveración con respecto al contenido o un dato de cualquier documento se basa en la información disponible al solicitante en el momento de presentación y no constituye una admisión con respecto a la exactitud de dicha aseveración.

Ejemplos

5 Métodos generales en biología molecular

Las técnicas estándares de biología molecular conocidas en la técnica y no específicamente descritas se siguieron generalmente como se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), y como se describe en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) y como se describe en Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons, New York (1988), y como se describe en Watson et al., *Recombinant ADN*, Scientific American Books, New York y en Birren et al (eds) *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) y metodología como se establece en las Patentes de Estados Unidos 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo generalmente como se describe en *PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, CA (1990). La PCR in situ (en célula) en combinación con la citometría de flujo se puede utilizar para la detección de células que contienen secuencias específicas de ADN y de ARNm (Testoni et al., 1996, *Blood* 87: 3822.) Los métodos para llevar a cabo RT-PCR también se conocen bien en la técnica.

Ejemplo 1: Generación de secuencias para compuestos de ARNsi activo

20 Utilizando algoritmos propietarios y la secuencia conocida del gen p53 (SEQ ID NO: 1), se generaron las secuencias de muchos ARNsi potenciales. La Tabla A muestra 23 ARNsi los cuales se han seleccionado hasta ahora, se han sintetizado químicamente y se han evaluado para actividad (véase el Ejemplo 2). Todos los ARNsi son de 19 elementos.

Tabla A

Número	Índice	Cadena sentido	Cadena antisentido	especies	NM_000546 (humano)	NM_011640 (ratón)	NM_030989 (rata)
1	Mo3	GUACAUGUGAAUAGCUCC	GGAGCUAUUACACAUGUAC	ratón	3 mis	1232-1250	2 mis
2	Hu2	GACUCCAGUGGUAUCUAC	GUAGAUUACCACUGGAGUC	humano*	1026-1044	3 mis	2 mis
3	QHMon1	CAGACCUAUGGAAACUACU	AGUAGUUUCCAUAGGUCUG	hum, mon	310-328	3 mis	4 mis
4	QMMOn2	CUACCUCCGCCAUAAAA	UUUUUUGCGGGAGGUAG	hum, mon	1378-1396	1 mis	1 mis
5	QH1	CCCAGCAUUGGAUGAUUU	AAUCAUCCAUUGCUUGGG	humano	361-379	No	No
6	QH2	CCCGGACGAUUUGAACAA	UUGUUCAAUAUCGUCCGGG	humano	389-407	No	No
7	QM1	GAGUCACAGUCGGAUACA	UGAUUCCGACUGUGACUC	ratón	No	552-570	2 mis
8	QM2	GGAUGUUGAGGAGUUUUUU	AAAAACUCCUCAACAUCC	ratón	No	680-698	4 mis
9	QM3	CAUCUUUUGUCCCUUCUCA	UGAGAAGGGACAAAAGAUG	ratón	2 mis	808-826	2 mis
10	QM6	GGAUAGGUUGAUAGUUUGU	ACAACUAUCAACCUAUUCC	ratón, rata	No	1870-1888	No
11	QM4	GGACAGCCAAGUCUGUUUU	AUAACAGACUUUGGCUGUCC	ratón, rata	2 mis	877-895	527-545
12	QM5	GAAGAAAAUUUCCGCAAAA	UUUUGCGGAAUUUUUCUUC	ratón, rata	3 mis	1383-1401	1033-1051
13	A17	CUGGACAGCCAAGUCUGU	ACAGACUUUGGCUGUCCCGAG	hum, mus	598-616	874-892	2 mis
14	E2	UCAUCACACUGGAAGACUC	GAGUCUUCCAGUGUGAUGA	Hum, mus, rata	1012-1030	1288-1306	938-956
15	E6	CACACUGGAAGACUCCAGU	ACUGGAGUCUUCAGUGUG	Hum, mus, rata	1016-1034	1292-1310	942-960
16	B1	GCGCCAUGGCCAUUACAA	UUGUAGAUGGCCAUUGCCGC	Hum, mon, mus	724-742	1000-1018	652-668 (17)
17	B2	CGCCAUGGCCAUUACAAAG	CUUGUAGAUGGCCAUUGCCGC	Hum, mon, mus	725-743	1001-1019	652-669 (18)

Número	Indice	Cadena sentido	Cadena antisentido	especies	NM_000546 (humano)	NM_011640 (ratón)	NM_030989 (rata)
18	C1	AGUCACAGCACAUACGGGA	UCCGUAUGUGCUGUGACU	Hum, mon, mus	745-763	1021-1039	2 mis
19	F2	UCCGAGUGGAAGGAAUUUU	AAUUUUCCUCCACUCGGA	Hum, mon, perro	835-853	1 mis	3 mis
20	F3	CCGAGUGGAAGGAAUUUUG	CAUUUUCCUCCACUCGCG	Hum, mon, perro	836-854	1 mis	3 mis
21	G1	GACAGAAACACUUUUCGAC	GUCGAAAAGUGUUUCUGUC	Hum, mon, perro	873-891	No	No
22	H2	GUGUGUGGGUCCCCUAUGA	UCAUAGGGCACCCACACAC	Hum, mon, perro	895-913	3 mis	3 mis
23	I5	GAGAAUUUUUCACCCCUUCA	UGAAGGGUGAAAUAUUCUC	Hum, mon, perro	1225-1243	2 mis	1 mis

Nótese que en la Tabla A anterior, las cadenas en sentido de ARNsi 1-23 tienen SEQ ID NOS: 3-25 respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNsi 1-23 tienen SEQ ID NOS: 26- 48 respectivamente. El compuesto de ARNsi No 1 (SEQ ID NOS: 3 y 26) se conoce a partir de la literatura (Dirac y Berards, Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of P53. J. Biol. Chem. (2003) 278: 11731) y el ARNsi No 2 (SEQ ID NOS: 4 y 27) también se conoce a partir de la literatura (Brummelkamp et al. Science 2002, 296: 550-553). Sin embargo, el uso de estos compuestos en los métodos de tratamiento descritos en la presente invención no se ha divulgado previamente y por lo tanto es novedoso.

La Tabla B a continuación muestra 71 ARNsi adicionales de 19 elementos los cuales han sido generados por los algoritmos patentados.

TABLA B

No.	Fuente	Sentido	Antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
1	Humano	GUACCACCAUCCACUACAA	UUGUAGUGGAUGGUGGUAC	[806-824]	[835-852]		
2	Humano	GGAAAACUACUCCUGAAAA	UUUUCAGGAAGUAGUUCC	[188-206]	[234-247]		
3	Humano	AGACUCCAGUGGUAUCUA	UAGAUUACCACUGGAGUCU	[894-912]	[922-933]		
4	Humano	CCAUCCACUACAACUAU	AUGUAGUUGUAGUGGAUGG	[812-830]	[840-858]		
5	Humano	CCACCAUCCACUACAACUA	UAGUUGUAGUGGAUGGUGG	[809-827]	[837-852]		
6	Humano	AAACACUUUUCGACAUAGU	ACU AUGUCGAAAAGUUGUU	[747-765]	-		
7	Humano	CAUGAGCGCUCUCAGAU	UAUCUGAGCAGCGCUCUAG	[655-673]	[683-696]		
8	Humano	CCAUUGGCAUCUACAAGCA	UGCUUGUAGAUUGGCCAUGG	[596-614]	[624-640]		
9	Humano	CCAAGUCUGUGACUUGCAC	GUGCAAGUCACAGACUUGG	[476-494]	-		
10	Humano	AAACUUUGCUGCCAAAAAA	UUUUUUGGCAGCAAAGUUU	[2476-2494]	-		
11	Humano	CCCUCUUCUCCCUUUUUA	UAAAAAGGAGAAAGGAGGG	[2421-2439]	-		
12	Humano	GCAAGCACAUUCGCAUUUU	AAAUGCAGAUUGUCUUGC	[2389-2407]	-		
13	Humano	GGGUCAACAUUUUUACAU	AUGUAAAAAGAUUUUGACCC	[2367-2385]	-		
14	Humano	GAAGGUCAACAUUUUUUA	UAAAAGAUUUUGACCCUUC	[2364-2382]	-		
15	Humano	CUGGAAGGGUCAACAUCUU	AAGAUGUUUGACCCUUCGAG	[2361-2379]	-		
16	Humano	CCAGAGUCUGGGAUUACA	UGUAAUCCAGCACUCUUGG	[2321-2339]	-		
17	Humano	GAUGGGUUCUCACAGUGUU	AACACUGUGAGACCCCAUC	[2249-2267]	-		
18	Humano	GCCAAUUUUGCAUGUUUU	AAAACAUUAAAAAGUUUGG	[2225-2243]	-		
19	Humano	CCAUGGCCAGCCAAACUUUU	AAAAGUUGGCUGGCCAUGG	[2216-2234]	-		
20	Humano	AGACCCAGGUCCAGAUAA	UUCAUCUGGACCCUGGGUCU	[288-306]	-		
21	Humano, ratón	CCAUCAUCACACUUGAAGA	UCUUCAGUGUGAUGAUGG	[878-896]	[906-924]		

No.	Fuente	Sentido	Antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
22	Humano, ratón	CAUCACACUGGAAGACUCC	GGAGUCUCCAGUGUGAUG	[882-900]		[910-928]	
23	Humano, ratón	CAUCAUCACACUGGAAGAC	GUCUCCAGUGUGAUGAUG	[879-897]		[907-925]	
24	Humano, ratón	ACCAUCAUCACACUGGAAG	CUUCCAGUGUGAUGGUG	[877-895]		[905-923]	
25	Humano, ratón	AUCAUCACACUGGAAGACU	AGUCUCCAGUGUGAUGAU	[880-898]		[908-926]	
26	Humano, ratón	CACUGGAAGACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUCCAGUG	[887-905]		[915-933]	
27	Humano, cynomolgus, ratón	ACACUGGAAGACUCCAGUG	CACUGGAGUCUCCAGUGU	[886-904]	[766-784]	[914-932]	
28	Humano, cynomolgus, ratón	UCACACUGGAAGACUCCAG	CUGGAGUCUCCAGUGUGA	[884-902]	[764-782]	[912-930]	
29	Humano, cynomolgus, ratón	AUCACACUGGAAGACUCCA	UGGAGUCUCCAGUGUGAU	[883-901]	[763-781]	[911-929]	
30	Humano, cynomolgus, ratón	CACAGCACAUAGACGGAGGU	ACCUCGGUCAUGUCUGUG	[617-635]	[497-515]	[645-663]	
31	Humano, cynomolgus, ratón	CACUGGAAGACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUCCAGUG	[887-905]	[767-785]	[915-933]	

No.	Fuente	Sentido	Antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gj2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02_0761.1 (Canis familiaris)
32	Humano, cynomoglus, ratón	UCACAGCACAUAGACGGAGG	CCUCCGUCAUGUGCCUGUGA	[616-634]	[496-514]	[644-662]	
33	Humano, cynomoglus, ratón	GUCACAGCACAUAGACGGAG	CUCCGUCAUGUGCCUGUGAC	[615-633]	[495-513]	[643-661]	
34	Humano, cynomoglus, perro	CCAUCCACUACAACUACAU	AUGUAGUUGUAGUGGAUGG	[812-830]	[692-710]		[702-720]
35	Humano, cynomoglus, perro	CCACCAUCCACUACAACUA	UAGUUGUAGUGGAUGGUGG	[809-827]	[689-707]		[699-717]
36	Humano, cynomoglus, perro	GAUUUUUCACCCUUCAGA	UCUGAAGGGUGAAAUAUUC	[1096-1114]	[976-994]		[986-1004]
37	Humano, cynomoglus, perro	CGAGUGGAAGGAAAUUUGC	GCAUUUUCCUCCACUCG	[706-724]	[586-604]		[596-614]
38	Humano, cynomoglus, perro	GAGAAUUUUCACCCUUCA	UGAAGGGUGAAAUAUUCUC	[1094-1112]	[974-992]		[984-1002]
39	Humano, cynomoglus, perro	CUACAUGUGUACAGUUC	GGAACUGUUACACAUGUAG	[825-843]	[705-723]		[715-733]
40	Humano, cynomoglus, perro	AACUACAUGUGUACAGUU	AACUGUUACACAUGUAGUU	[823-841]	[703-721]		

No.	Fuente	Sentido	Antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02_0761.1 (Canis familiaris)
41	Humano, cynomoglus, perro	CAACUACAUGUGUAAACAGU	ACUGUUACACAUGUAGUUUG	[822-840]	[702-720]		[712-730]
42	Humano, cynomoglus, perro	CACUACAACUACAUGUGUA	UACACAUGUAGUUGUAGUG	[817-835]	[697-715]		[707-725]
43	Humano, cynomoglus, perro	CCACUACAACUACAUGUGU	ACACAUGUAGUUGUAGUGG	[816-834]	[696-714]		[706-724]
44	Humano, cynomoglus, perro	GACAGAAACACUUUUUCGAC	GUCGAAAAGUGUUUCUGUC	[742-760]	[622-640]		[632-650]
45	Humano, cynomoglus, perro	GGAGAAUUUUACACCCUUC	GAAAGGGUGAAAUAUUCUCC	[1093-1111]	[973-991]		[983-1001]
46	Humano, cynomoglus, perro	GUGUAAACAGUCCUGCAUG	CAUGCAGGAACUGUUACAC	[831-849]	[711-729]		[721-739]
47	Humano, cynomoglus, perro	ACAACUACAUGUGUAAACAG	CUGUUACACAUGUAGUUUGU	[821-839]	[701-719]		[711-729]
48	Humano, cynomoglus, perro	ACUACAACUACAUGUGUAA	UUACACAUGUAGUUGUAGU	[818-836]	[698-716]		[708-726]
49	Humano, cynomoglus, perro	ACCAUCCACUACAACUACA	UGUAGUUGUAGUGGAUGGU	[811-829]	[691-709]		[701-719]
50	Humano, cynomoglus, perro	ACCACCAUCCACUACAACU	AGUUGUAGUGGAUGGUGGU	[808-826]	[688-706]		[698-716]

No.	Fuente	Sentido	Antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02_0761.1 (Canis familiaris)
51	Humano, cynomoglus, perro	UACCACCAUCCACUACAAC	GUUGUAGUGGAUGGGUGUA	[807-825]	[687-705]		[697-715]
52	Humano, cynomoglus, perro	ACAGAAACACUUUUCGACA	UGUCGAAAAGUGUUUCUGU	[743-761]	[623-641]		[633-651]
53	Humano, cynomoglus, perro	GAGUGGAAGGAAUUUGCG	CGCAAAUUUCCUUCACUC	[707-725]	[587-605]		[597-615]
54	Humano, cynomoglus, perro	AUAUUACCCUUCAGAUC	GAUCUGAAGGUGAAAAUUAU	[1098-1116]	[978-996]		[988-1006]
55	Humano, cynomoglus, perro	AAUAUUACCCUUCAGAU	AUCUGAAGGUGAAAAUUAU	[1097-1115]	[977-995]		[987-1005]
56	Humano, cynomoglus, perro	AGAAUUUUCACCCUUCAG	CUGAAGGUGAAAAUUAUCU	[1095-1113]	[975-993]		[985-1003]
57	Humano, cynomoglus, perro	UGGAGAAUUUUCACCCUU	AAGGUGAAAAUUAUCUCCA	[1092-1110]	[972-990]		[982-1000]
58	Humano, cynomoglus, perro	ACAUGUGUAAACAGUUCUG	CAGGAACUGUACACAUGU	[827-845]	[707-725]		[717-735]
59	Humano, cynomoglus, perro	UACAACUACAUGUGUAACA	UGUUACACAUGUAGUUGUA	[820-838]	[700-718]		[710-728]
60	Humano, cynomoglus, perro	CUACAACUACAUGUGUAAC	GUUACACAUGUAGUUGUAG	[819-837]	[699-717]		[709-727]

No.	Fuente	Sentido	Antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
61	Humano, cynomoglus, perro	UCCACUACAACUACAUGUG	CACAUGUAGUUGUAGUGGA	[815-833]	[695-713]		[705-723]
62	Humano, cynomoglus, perro	AUCCACUACAACUACAUGU	ACAUGUAGUUGUAGUGGAU	[814-832]	[694-712]		[704-722]
63	Humano, cynomoglus, perro	CAUCCACUACAACUACAUG	CAUGUAGUUGUAGUGGAUG	[813-831]	[693-711]		[703-721]
64	Humano, cynomoglus, perro	CACCAUCCACUACAACUAC	GUAGUUGUAGUGGAUGGUG	[810-828]	[690-708]		[700-718]
65	Humano, cynomoglus, perro	UGUGUAACAGUUCUUGCAU	AUGCAGGAACUGUUACACA	[830-848]	[710-728]		[710-738]
66	Humano, cynomoglus, perro	CAUGUGUAACAGUUCUUGC	GCAGGAACUGUUACACAUG	[828-846]	[708-726]		[718-736]
67	Humano, cynomoglus, perro	UACAUGUGUAACAGUUCU	AGGAACUGUUACACAUGUA	[826-844]	[706-724]		[716-734]
68	Humano, cynomoglus, perro	ACUACAUGUGUAACAGUUC	GAACUGUUAACACAUGUAGU	[824-842]	[704-722]		[714-732]
69	Humano, cynomoglus, perro	AUCCGAGUGGAAGGAAU	AAUUUCCUCCACUCGGAU	[703-721]	[583-601]		[593-611]

No.	Fuente	Sentido	Antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
70	Humano, cynomolgus, perro	UCACUCCAGCCACCUGAAG	CUUCAGGUGGCUGGAGUGA	[1212-1230]	[1092-1110]		[1102-1120]
71	Humano, cynomolgus, perro	CUCACUCCAGCCACCUGAA	UUCAGGUGGCUGGAGUGAG	[1211-1229]	[1091-1109]		[1101-1119]

Nótese que en la Tabla B anterior, las cadenas en sentido de siARNs 1-71 tienen SEQ ID NOS: 49-119 respectivamente, y las cadenas antisentido de siARNs 1-71 tienen SEQ ID NOS: 120- 190 respectivamente

La Tabla C a continuación muestra 63 ARNsi adicionales de 21 elementos los cuales han sido generados por los algoritmos patentado

Tabla c

No.	Fuente	ARNsi sentido	ARNsi antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
1	Humano	GGAAGAGAAUUCUCCGCAAGAA	UUUUUGCGGAGAUUCUCUUCC	[975-995]	-	-	-
2	Humano	GUACCACCAUCCACUACAACU	AGUUUAGUGGAGUUGGUAC	[806-826]	[686-706]	[835-852]	[697-716]
3	Humano	GGACGAUUAUUGAACAAUUGUU	AACCAUUUUUCAAUAUCGUCC	[261-281]	-	-	-
4	Humano	CCAGCCACCUGAAGUCCAAA	UUUUUGGACUUUCCAGGUGGCUCC	[1217-1237]	[1097-1115]	-	[1107-1120]
5	Humano	GAGAAUUUUUACACCCUUCAGA	UCUGAAGGUGGAAUUAUUCUC	[1094-1114]	[971-994]	[1122-1137]	[984-1004]
6	Humano	AGAAACCACUGGAGUUGGAGAAU	AUUCUCCAUCCAGUGGUUUUCU	[1079-1099]	[959-979]	-	-
7	Humano	CUACUGGGACGGAACAGCUUU	AAAGCUGUUUCCGUCUCCAGUAG	[910-930]	[790-810]	-	-
8	Humano	AGACUCCAGUGGUAUUCUACU	AGUAGAUUACCACUGGACUCU	[894-914]	[774-794]	[922-933]	[784-795]
9	Humano	CUGGAGACUCCAGUGGUAU	AUUACCACUGGAGUCUUCUCCAG	[889-909]	[769-789]	[917-933]	[779-795]
10	Humano	GAAACUACUCCUGAAAACAA	UUUUUUUUCAGGAAGUAGUUUC	[189-209]	[69-87]	[235-247]	[122-135]
11	Humano	GGAAACUACUCCUGAAAACA	UGUUUUUUCAGGAAGUAGUUUCC	[188-208]	[68-87]	[234-247]	[122-134]
12	Humano	AAACACUUUUCGACAUAGUGU	ACACUAGUCGAAAAGUGUUU	[747-767]	[627-647]	-	[637-657]
13	Humano	GGAGUUUUUGGAGACAGAAA	UUUCUGUCAUCCAAAUCUCC	[729-749]	[609-629]	-	-
14	Humano	UCAGACCUAUGGAAACUACUU	AAGUAGUUUCCAUAGGUCUGA	[178-198]	[58-78]	[231-244]	-
15	Humano	CCAUGGCCAUUCACAAGCAGU	ACUGCUUUGUAGUAGGCGCAUGG	[596-616]	[476-496]	[624-640]	[485-495]

No.	Fuente	ARNsi sentido	ARNsi antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
16	Humano	CCAAGUCUGGACUUGCACGU	ACGUGCAAGUCACAGACUUGG	[476-496]	[356-376]	-	-
17	Humano	GGACAGCCAAGUCUGGACUU	AAGUCACAGACUUGGCUGUCC	[470-490]	[352-370]	[498-513]	[357-377]
18	Humano, cynomoglus, perro	CCCUCCUUCUCCUUUUUAUA	UAUAAAAAGGAGAAAGGAGGG	[2421-2441]	-	[1721-1731]	-
19	Humano, cynomoglus, perro	CCAUCCACUACAACAUGU	ACAUGUAGUUUAGUGGAUGG	[812-832]	[692-712]	[840-860]	[702-722]
20	Humano, cynomoglus, perro	CCACCAUCCACUACAACUACA	UGUAGUUGUAGUGGAUGGUGG	[809-829]	[689-709]	[837-857]	[699-719]
21	Humano, cynomoglus, perro	GAGAAUUUUACCCUUCAGA	UCUGAAGGGUGAAAUUUCUC	[1094-1114]	[974-994]		[984-1004]
22	Humano, cynomoglus, perro	GGAGAAUUUUCACCCUUCAG	CUGAAGGGUGAAAUUUCUCC	[1093-1113]	[973-993]		[983-1003]
23	Humano, cynomoglus, perro	CUACAUGUGUAACAGUUCUG	CAGGAACUGUACACAUGUAG	[825-845]	[705-725]		[715-735]
24	Humano, cynomoglus, perro	ACAACUACAUGUGUAACAGUU	AACUGUUACACAUGUAGUUGU	[821-841]	[701-721]		[711-731]
25	Humano, cynomoglus, perro	CCACUACAACAUGUGUAA	UUACACAUGUAGUAGUAGUGG	[816-836]	[696-716]		[706-726]

No.	Fuente	ARNsi sentido	ARNsi antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
26	Humano, cynomoglus, perro	CACCAUCCACUACAACUACAU	AUGUAGUUUAGUGGUAUGGUG	[810-830]	[690-710]		[700-720]
27	Humano, cynomoglus, perro	GAUAUUUACACCCUUCAGAU	GAUCUGAAGGGUGAAAUUUC	[1096-1116]	[976-996]		[986-1006]
28	Humano, cynomoglus, perro	AGAAUAUUUACACCCUUCAGAU	AUCUGAAGGGUGAAAUUUCU	[1095-1115]	[975-995]		[985-1005]
29	Humano, cynomoglus, perro	UACCACCAUCCACUACAACUA	UAGUUUUAUGUGGUAUGGUA	[807-827]	[687-707]		[697-717]
30	Humano, cynomoglus, perro	GAUGGAGAAUUAUUACCCUU	AAGGGUGAAAUUUCUCCAUC	[1090-1110]	[970-990]		[980-1000]
31	Humano, cynomoglus, perro	CCGAGUGGAAAGGAAUUUGCG	CGCAAUUUCCUCCACUCGG	[705-725]	[585-605]		[595-615]
32	Humano, cynomoglus, perro	AACUACAUGUGUACAGUUC	GGAACUGUUAACACAUAGUU	[823-843]	[703-723]		[713-733]
33	Humano, cynomoglus, perro	CAACUACAUGUGUACAGUUC	GAACUGUUAACACAUAGUU	[822-842]	[702-722]		[712-732]
34	Humano, cynomoglus, perro	ACUACAACUACAUGUGUACA	UGUUACACAUAGUUGUAGU	[818-838]	[698-718]		[708-728]

No.	Fuente	ARNsi sentido	ARNsi antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
35	Humano, cynomoglus, perro	CACUACAACUACUGUGAAC	GUUACACAUGUAGUUUGUAGUG	[817-837]	[697-717]		[707-727]
36	Humano, cynomoglus, perro	UCCACUACAACUACUGUGUA	UACACAUGUAGUUUGUAGUGGA	[815-835]	[695-715]		[705-725]
37	Humano, cynomoglus, perro	CAUCCACUACAACUACUGUG	CACAUGUAGUUUGUAGUGGAUG	[813-833]	[693-713]		[703-723]
38	Humano, cynomoglus, perro	ACCAUCCACUACAACUACAUG	CAUGUAGUUUGUAGUGGAUGGU	[811-831]	[691-711]		[701-721]
39	Humano, cynomoglus, perro	UGGAGAAUUAUUCACCCUUCA	UGAAGGGUGAAAUUUCUCCA	[1092-1112]	[972-992]		[982-1002]
40	Humano, cynomoglus, perro	AUGUGUAAACAGUUCUUGCAUG	CAUGCAGGAACUGUUAACACAU	[829-849]	[709-729]		[719-739]
41	Humano, cynomoglus, perro	CAUGUGUAAACAGUUCUUGCAU	AUGCAGGAACUGUUAACACAU	[828-848]	[708-728]		[718-738]
42	Humano, cynomoglus, perro	UACAACUACUAGUGUAAACAGU	ACUGUUACACAUGUAGUUGUA	[820-840]	[700-720]		[710-730]
43	Humano, cynomoglus, perro	CUACAACUACUAGUGUAAACAG	CUGUUAACACAUGUAGUUGUAG	[819-839]	[699-719]		[709-729]
44	Humano, cynomoglus, perro	AUCCACUACAACUACAUGUGU	ACACAUGUAGUUUGUAGUGGAU	[814-834]	[694-714]		[704-724]

No.	Fuente	ARNsi sentido	ARNsi antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
45	Humano, cynomoglus, perro	ACCACCAUCCACUACAACUAC	GUAGUUGUAGUGGAGUGGU	[808-828]	[688-708]		[698-718]
46	Humano, cynomoglus, perro	AAUAAUUCACCCUUCAGAUCC	GGAUCUGAAGGGUGAAAAUUAU	[1097-1117]	[977-997]		[987-1007]
47	Humano, cynomoglus, perro	ACUACAUGUGUAACAGUUCU	AGGAACUGUUACACAUJUGU	[824-844]	[704-724]		[714-734]
48	Humano, cynomoglus, perro	AUGGAGAAUAAUUCACCCUUC	GAAGGGUGAAAAUUAUCUCCAU	[1091-1111]	[971-991]		[981-1001]
49	Humano, cynomoglus, perro	UGUGUAAACAGUUCUGCAUGG	CCAUGCAGGAACUGUUAACACA	[830-850]	[710-730]		[720-740]
50	Humano, cynomoglus, perro	UCCGAGUGGAAAGAAAAUUUGC	GCAAAUUUCCUUCACUCGGA	[704-724]	[584-604]		[594-614]
51	Humano, cynomoglus, perro	AUCCGAGUGGAAAGAAAAUUUG	CAAAUUUCCUUCACUCGGAU	[703-723]	[583-603]		[593-613]
52	Humano, cynomoglus, ratón	UCACACUGGAAACUCCAGUG	CACUGGAGUCUUCACAGUGA	[884-904]	[764-784]	[912-932]	
53	Humano, cynomoglus, ratón	AUCACACUGGAAACUCCAGU	ACUGGAGUCUUCACAGUGAU	[883-903]	[763-783]	[911-931]	
54	Humano, cynomoglus, perro	CACACUGGAAACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUUCACAGUG	[885-905]	[765-785]	[913-933]	

No.	Fuente	ARNsi sentido	ARNsi antisentido	gi13097806 gbBC003596.1 (Homo sapiens)	gi2689466 gbU48957.1 U48957 (Macaca fascicularis)	gi53575emb x01237.1 MMP53R (ARNm de ratón)	gi499622 9dbjAB02 0761.1 (Canis familiaris)
55	Humano, ratón	UCAUCACACUGGAAGACUCCA	AGGAGUCUCCAGUGUGAUGA	[881-901]		[909-929]	
56	Humano, ratón	CCAUCAUCACACUGGAAGACU	AGUCUCCAGUGUGAUGAUGG	[878-898]		[906-926]	
57	Humano, ratón	CAUCACACUGGAAGACUCCAG	CUGGAGUCUCCAGUGUGAUG	[882-902]		[910-930]	
58	Humano, ratón	CAUCAUCACACUGGAAGACUC	GAGUCUCCAGUGUGAUGAUG	[879-899]		[907-927]	
59	Humano, ratón	ACCAUCAUCACACUGGAAGAC	GUCUCCAGUGUGAUGAUGGU	[877-897]		[905-925]	
60	Humano, ratón	UCACACUGGAAGACUCCAGUG	CACUGGAGUCUCCAGUGUGA	[884-904]		[912-932]	
61	Humano, ratón	AUCACACUGGAAGACUCCAGU	ACUGGAGUCUCCAGUGUGAU	[883-903]		[911-931]	
62	Humano, ratón	AUCAUCACACUGGAAGACUCC	GGAGUCUCCAGUGUGAUGAU	[880-900]		[908-928]	
63	Humano, ratón	CACACUGGAAGACUCCAGUGG	CCACUGGAGUCUCCAGUGUG	[885-905]		[913-933]	

Nótese que en la Tabla C anterior, las cadenas en sentido de siARNs 1-63 tienen SEQ ID NOS: 191- 253 respectivamente, y las cadenas antisentido de siARNs 1-63 tienen SEQ ID NOS: 254-316 respectivamente.

Ejemplo 2: Evaluación de los compuestos de ARNsi para actividad anti-p53

Protocolos

I. Preparación de los ARNsi (oligonucleótidos de cadena doble)

5 Los oligonucleótidos liofilizados se disolvieron en el agua destilada libre de ARNsa para producir una concentración final de 100 uM. Los oligonucleótidos diluidos se mantuvieron a temperatura ambiente por 15 minutos e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Los oligonucleótidos se almacenaron a -80°C y se diluyeron antes de su uso con PBS.

II. Transfección del ARNsi en células de humano con el reactivo Lipofectamine 2000:

10 2 x 10⁵ células HCTI p53-wt 16 o células SW480 se sembraron por pozo en una placa de 6 pozos. 24 horas subsecuentemente, las células se transfectaron con oligonucleótidos p53 utilizando el reactivo lipofectamine 2000 (obtenido a partir de Invitrogen). Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Antes de la transfección, el medio de las células se reemplazó por 1500 ul de medio recientemente preparado sin antibióticos.

15 2. En un tubo de plástico, estéril, el reactivo Lipofectamine 2000 (la cantidad se calculó de acuerdo con 5 ul por pozo) se añadió a 250 ul de medio libre de suero, y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

3. En otro tubo se añadieron los oligonucleótidos anti-p53 de humano (cantidades variables para ajustar la concentración final deseada por pozo) a 250 ul de medio libre de suero.

4. Se combinó el complejo de Lipofectamine 2000 con la solución de oligonucleótido p53 y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.

20 5. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células, y las células se incubaron a 37°C.

6. Células SW480: 48 horas después de la transfección las células se recolectaron y las proteínas se extrajeron utilizando el regulador RIPA.

7. Células HCTI 16: -

25 ■ 40 horas después de la transfección, 5Fu (Sigma) se añadió a células para producir una concentración final de 25 ug/ml. 48 horas después de la transfección de las células (8 horas después del tratamiento con 5Fu), las células se recolectaron y las proteínas se extrajeron utilizando el regulador RIPA.

8. La expresión de p53 se determinó mediante análisis de Inmunoprecipitación Western utilizando anticuerpo monoclonal (Do-1 clone, Santa Cruz). Para la normalización, la inmunoprecipitaciones se examinaron para expresión de tubulina.

30 III Co-transfección del gen p53 de ratón y de los oligonucleótidos p53 de ratón dentro de las células PC3 utilizando el reactivo Lipofectamine 2000:

2 x 10⁵ células PC3 nulas a p53 se sembraron por pozo en una placa de 6 pozos. 24 horas subsecuentemente, las células se cotransfectaron con el gen p53 de ratón y el gen GFP y los oligonucleótidos p53 de ratón utilizando el reactivo lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

35 1. Antes de la transfección el medio de las células se reemplazó por 1500 ul de medio recientemente preparado sin antibióticos.

2. En un tubo de plástico, estéril, se añadió el reactivo Lipofectamine 2000 (5 ul por pozo) a 250 ul de medio libre de suero, y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

40 3. En otro tubo se añadieron 4 ug de ADN (gen p53: gen GFP, 10:1) y oligonucleótidos p53 de humano a 250 ul de medio libre de suero.

4. Se combinó el complejo de Lipofectamine 2000 con la solución de oligonucleótidos p53 y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.

5. La solución mezcla se añadió gota a gota a las células, y las células se incubaron a 37°C.

6. 48 horas después de la transfección, las células se recolectaron y las proteínas se extrajeron utilizando el regulador RIPA.

5 7. Se determinó la expresión de p53 mediante análisis de Inmunoprecipitación Western utilizando anticuerpo monoclonal (Clone240, Chemicon). Para la normalización, las inmunoprecipitaciones se examinaron para expresión de GFP.

Resultados:

A. Oligonucleótidos p53 de humano:

Tabla D:

Número	oligo	Especie	fuente	Resultado de la Prueba	
				SW480	HCT116
2	Hu2	humano	literatura	(-)	(+)
3	QHM on1	Humano, mono	patentado	(++)	(+++)
4	QHM on2	Humano, mono	patentado	(-)	No evaluado
5	QH1	Humano	patentado	(+++)	(+++)
6	QH2	Humano	patentado	(-)	No evaluado
13	A17	Humano, ratón	patentado	(-)	No evaluado
14	E2	Humano, ratón, rata	patentado	(+)	No evaluado
15	E6	Humano, ratón, rata	patentado	(-)	No evaluado
16	B1	Humano, ratón, rata	patentado	(-)	No evaluado
17	B2	Humano, ratón, rata	patentado	(-)	No evaluado
18	C1	Humano, mono, ratón	patentado	(-)	No evaluado
19	F2	Humano, mono, perro	patentado	(-)	No evaluado
20	F3	Humano, mono, perro	patentado	(+++)	(+++)
21	G1	Humano, mono, perro	patentado	(+++)	No evaluado
22	H2	Humano, mono, perro	patentado	(+)	No evaluado
23	I5	Humano, mono, perro	patentado	(+++)	No evaluado

Nota: Los números en la Tabla D corresponden a los números utilizados en la Tabla A, en donde las cadenas sentido de ARNsi 1-23 tienen SEQ ID NOS: 3-25 respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNsi 1-23 tienen SEQ ID NOS: 26- 48 respectivamente.

5 Como se muestra en la Tabla D, se evaluaron cuatro oligonucleótidos de humano en dos sistemas SW480 y HCT116, de acuerdo con los protocolos II anteriormente mencionados. Los resultados representativos (Inmunoprecipitación Western) sobre los cuales se basan los Resultados de la Prueba se muestran en la figura 3.

B. Oligonucleótidos p53 de ratón:

Tabla E:

				Resultados de la Prueba
	oligo	especie	fuentes	Células PC3 nulas/p53 exógeno de ratón
1	Mo3	ratón	literatura	(+++)
7	QM1	ratón	patentado	(-)
8	QM2	ratón	patentado	(-)
9	QM3	ratón	patentado	(-)
10	QM6	ratón	patentado	(-)
11	QM4	Ratón, rata	patentado	(+++)
12	QM5	Ratón, rata	patentado	(+++)
13	A17	Humano, ratón	patentado	(-)
14	E2	Humano, ratón, rata	patentado	(++)
15	E6	Humano, ratón, rata	patentado	(-)
16	B1	Humano, mono, ratón	patentado	(-)
17	B2	Humano, mono, ratón	patentado	(++)
18	C1	Humano, mono, ratón	patentado	(++)
21	G1	Humano, mono, perro	patentado	(++)
20	F3	Humano, mono, perro	patentado	(+++)
23	I5	Humano, mono, perro	patentado	(-)
3	QHMon1	Humano, mono	patentado	(++)

10 Nota: Los números en la Tabla E (como para la Tabla D) corresponden a los números utilizados en la Tabla A, en donde las cadenas en sentido de ARNsi 1-23 tienen SEQ ID NOS: 3-25 respectivamente, y las cadenas antisentido de ARNsi 1-23 tienen SEQ ID NOS: 26- 48 respectivamente. Los resultados representativos de los resultados de Inmunoprecipitación Western sobre los cuales se basan los resultados de la prueba se muestran en la figura 4.

Ejemplo 3: Sistemas modelo de pérdida de cabello

15 La evaluación del ARNsi activo se puede realizar en los siguientes sistemas:

- a. Modelo de pérdida de cabello en ratón
- b. Folículos de cabello de humano cultivados ex-vivo
- c. Injerto de folículos de cabello de humano en ratones desnudos

5 Nota: Los sistemas para la evaluación del ARNsi activo se describen en Botcharev et al, 2000, p53 is essential for Chemotherapy -induced Hair Loss, Cancer Research, 60, 5002-5006).

Ejemplo 4

Sistemas modelo de insuficiencia renal aguda (ARF)

La evaluación del ARNsi activo para el tratamiento de ARF se puede realizar utilizando ARF inducida por sepsis o ARF inducida por isquemia-reperusión.

10 1. ARF inducido por sepsis

Dos modelos predictivos de ARF inducido por sepsis en animales se describen por Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, Kidney Int. Noviembre; 64 (5): 1620-31. Estos dos modelos son administración de lipopolisacárido y punción por ligación cecal en ratones, preferiblemente en ratones envejecidos.

15 2. ARF inducida por isquemia-reperusión

Este modelo predictivo en animal se describe por Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003 enero. P53 meditates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor, J Am Soc Nephrol.; 14 (1): 128-38.

20 La lesión por isquemia-reperusión se indujo en ratas después de 45 minutos de fijación bilateral arterial del riñón y la liberación subsecuente de la fijación para permitir 24 horas de reperusión. 250 ug de ARNsi p53 (secuencia QM5, Tabla A) se inyectaron dentro de la vena yugular 2 horas antes y 30 minutos después de la fijación. Se proporcionaron 250 ug adicionales de ARNsi a través de la vena de la cola a 4 y 8 horas después de la fijación. El ARNsi en contra de GFP sirvió como un control negativo. El ARNsi utilizado en los experimentos descritos en la presente invención tuvo un grupo fosfato en el extremo hacia 3' tanto de la cadena en sentido como de la cadena antisentido. Se ha encontrado que el ARNsi hacia 3' no fosforilado tiene una actividad biológicamente similar en un modelo animal en comparación con una actividad correspondiente del ARNsi hacia 3' fosforilado. La progresión de la ARF se monitorizó mediante la medición de los niveles de creatinina en suero antes y 24 horas después de la cirugía. Al término del experimento, las ratas se perfundieron a través de una línea femoral entrante con PBS caliente seguido por 4% de paraformaldehído. Los riñones izquierdos se removieron y se almacenaron en 4% de paraformaldehído para análisis histológico subsecuente. La insuficiencia renal aguda frecuentemente se define como un incremento agudo en el nivel de creatinina en suero a partir de la línea basal. Un incremento de al menos 0.5 mg por dL o 44.2 umoles por L de creatinina en suero se considera como una indicación para la insuficiencia renal aguda. La creatinina en suero se midió en el tiempo cero antes de la cirugía y a las 24 horas después de la cirugía ARF.

35 Para estudiar la distribución del ARNsi de p53 en el riñón de rata, las moléculas de ARNsi con extremos romos de 19 elementos marcadas con Cy3 (2 mg/kg) que tienen modificaciones alternas de O-metilo en los residuos de azúcar se administraron iv por 3-5 minutos, después de lo cual se llevó a cabo una formación de imagen in vivo utilizando microscopía confocal de fotones. El análisis de microscopía confocal reveló que la mayoría del ARNsi en los riñones se concentró en el compartimiento endosomal de las células tubulares proximales. Tanto la fluorescencia endosomal como citoplásmica del ARNsi fueron relativamente estables durante las primeras 2 horas después de la administración y desaparecieron a las 24 horas.

45 Como es evidente a partir de la figura 5, hubo un incremento de diez veces en el nivel de creatinina en suero después de 45 minutos del tratamiento por fijación bilateral arterial del riñón (tratamiento con PBS). Cuatro inyecciones de ARNsi de p53 (secuencia QM5, Tabla A) (2 horas antes de la fijación y 30 minutos, 4 horas y 8 horas después de la fijación) significativamente redujeron el nivel de creatinina en suero en un 50% ($P < 0.001$). Estos resultados sugieren que el ARNsi de p53 puede proteger al tejido renal a partir de los efectos de lesión por isquemia-reperusión y por lo tanto reduce la severidad de ARF.

50 Adicionalmente se determinó el efecto del tratamiento de ARNsi de p53 sobre la lesión renal por isquemia-reperusión mediante el análisis del grado de necrosis tubular en el tejido renal. La necrosis tubular se puede evaluar como: sin daño (evaluación del daño 0), unicelular, necrosis aislada en forma de parches (evaluación del daño 1),

necrosis tubular en menos del 25% del tejido (evaluación del daño 2), necrosis tubular entre 25 y 50% del tejido (evaluación del daño 3) y necrosis tubular en más del 50% del tejido (evaluación del daño 4). La figura 6 demuestra el daño tubular del riñón expresado como evaluación del daño (eje Y) en animales que no se sometieron a lesión por isquemia-reperfusión (grupo 1) o en animales con lesión por isquemia-reperfusión después del tratamiento ya sea con PBS (grupo 2), dos inyecciones de ARNsi de p53 (grupo 3), tres inyecciones de ARNsi de p53 (grupo 4) o cuatro inyecciones de ARNsi de p53 (grupo 5). Como se revela por la figura 6, cuatro inyecciones de ARNsi de p53 lleva a una disminución significativa en el daño tubular del riñón en comparación con el grupo control tratado con PBS. La figura 7 demuestra que cuatro inyecciones del tratamiento con ARNsi de p53 subregula la expresión del gen pro-apoptótico Puma en el compartimiento cortical del riñón en el animal sometido a lesión por isquemia-reperfusión. Esto indica que el tratamiento con ARNsi de p53 es capaz de inhibir el proceso apoptótico en el riñón después de la lesión por isquemia-reperfusión.

Reivindicaciones

1. Un compuesto de ARNs de doble cadena que tiene la estructura:
 5' ugaaggugaaauaucuc - Z 3' (cadena antisentido SEQ ID NO:48)
 3' Z'-acuucccacuuuaagag (cadena en sentido SEQ ID NO:25);
- 5 en donde cada a, c, u y g es un ribonucleótido y cada ribonucleótido consecutivo se une al siguiente ribonucleótido por un enlace covalente; y
 en donde cada uno de Z y Z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es dTdT y se une covalentemente al extremo 3' de la cadena en donde está presente; y
- 10 en donde ribonucleótidos que alternan tanto en la cadena antisentido como en la cadena en sentido se modifican en su residuo de azúcar de tal manera que un grupo 2'-O-metilo está presente y ribonucleótidos modificados en el azúcar con 2'-O-metilo están presentes en el terminal 5' y el terminal 3' de la cadena antisentido y ribonucleótidos no modificados están presentes en el terminal 5' y el terminal 3' de la cadena en sentido.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el enlace covalente es un enlace fosfodiéster.
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en donde Z y Z' están ambos ausentes.
- 15 4. El compuesto de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el ribonucleótido en el terminal 3' y el ribonucleótido en el terminal 5' en la cadena antisentido y en la cadena en sentido son no fosforilados.
5. El compuesto de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el ribonucleótido en el terminal 3' en la cadena antisentido y el ribonucleótido en el terminal 3' en la cadena en sentido son fosforilados.
- 20 6. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en una cantidad efectiva para subregular la expresión de un gen p53 humano; y un portador.
7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en terapia.
8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso en el tratamiento o prevención de la insuficiencia renal aguda.
- 25 9. El compuesto para uso como en la reivindicación 8, en donde la insuficiencia renal es posterior a cirugía cardíaca mayor o cirugía vascular.
10. El compuesto para uso como en la reivindicación 9, en donde la insuficiencia renal aguda es posterior a cirugía cardíaca mayor.
11. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso en el tratamiento de la alopecia.
- 30 12. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la mejora de la supervivencia del tejido de injerto después del trasplante.
13. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la prevención de la insuficiencia renal aguda isquémica en un paciente con trasplante de riñón.
- 35 14. El compuesto para uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde dicho compuesto es para ser administrado por administración sistémica.
15. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso en el tratamiento de la lesión cerebral y lesión de la médula espinal.
16. El compuesto para uso como en la reivindicación 15, en donde la lesión cerebral es una convulsión.
- 40 17. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para uso en el tratamiento de la sordera inducida por cisplatino.
18. El compuesto para uso como en la reivindicación 11 o 17, en donde dicho compuesto es para ser administrado por administración tópica.

19. El compuesto para uso como en la reivindicación 8, en donde la insuficiencia renal aguda es insuficiencia renal aguda inducida por isquemia-reperfusión.
20. El compuesto para uso como en la reivindicación 8, en donde la insuficiencia renal aguda es la insuficiencia renal aguda asociada a la sepsis.
- 5 21. El compuesto para uso como en la reivindicación 8, en donde la insuficiencia renal aguda es la insuficiencia renal aguda tóxica debido a tratamiento de quimioterapia.

FIG. 1

PROTEINA p53 DEL TUMOR DE HOMO SAPIENS (SINDROME LI-FRAUMENI) (TP53), ARNm
gi | 8400737 | ref | NM_00546.2

```

Hum-TP53  1   ACTTGTCATG GCGACTGTCC AGCTTTGTGC CAGGAGCCTC GCAGGGGTTG ATGGGATTGG GGTTTTCCCC 70
Hum-TP53  71   TCCCATGTGC TCAAGACTGG CGCTAAAAGT TTTGAGCTTC TCAAAAGTCT AGAGCCACCG TCCAGGGAGC 140
Hum-TP53  141  AGGTAGCTGC TGGGCTCCGG GGACACTTTG CGTTCGGGCT GGGAGCGTGC TTTCCACGAC GGTGACACGC 210
Hum-TP53  211  TTCCCTGGAT TGGCAGCCAG ACTGCCTTCC GGGTCACTGC CATGGAGGAG CCGCAGTCAG ATCCTAGCGT 280
Hum-TP53  281  CGAGCCCCCT CTGAGTCAGG AAACATTTTC AGACCTATGG AAACTACTTC CTGAAAACAA CGTTCTGTCC 350
Hum-TP53  351  CCCTTGCCGT CCCAAGCAAT GGATGATTTC ATGCTGTCCC CGGACGATAT TGAACAATGG TTCACTGAAG 420
Hum-TP53  421  ACCCAGGTCC AGATGAAGCT CCCAGAATGC CAGAGGCTGC TCCCCGCGTG GCCCCTGCAC CAGCAGCTCC 490
Hum-TP53  491  TACACCGGCG GCCCCTGCAC CAGCCCCCTC CTGCCCCCTG TCATCTTCTG TCCCTTCCCA GAAAACCTAC 560
Hum-TP53  561  CAGGGCAGCT ACGGTTTCCG TCTGGGCTTC TTGCATTCTG GGACAGCCAA GTCTGTGACT TGCACGTACT 630
Hum-TP53  631  CCCCTGCCCT CAACAAGATG TTTTGCCAAC TGGCCAAGAC CTGCCCTGTG CAGCTGTGGG TTGATTCCAC 700
Hum-TP53  701  ACCCCCGCCC GGCACCCGCG TCCGCGCCAT GGCCATCTAC AAGCAGTCAC AGCACATGAC GGGAGTTGTG 770
Hum-TP53  771  AGGCGTGCC CCCACCATGA GCGCTGCTCA GATAGCGATG GTCTGGCCCC TCCTCAGCAT CTTATCCGAG 840
Hum-TP53  841  TGGAAAGAAA TTTCCGTGTC GAGTATTTGG ATGACAGAAA CACTTTTCGA CATACTGTGG TGGTGCCCTA 910
Hum-TP53  911  TGAGCCGCCT GAGGTTGGCT CTGACTGTAC CACCATCCAC TACAAC TACA TGTGTAACAG TTCCTGCATG 980
Hum-TP53  981  GCGGCATGA ACCGGAGGCC CATCCTCACC ATCATCACAC TGGAAAGACT CAGTGGTAAT CTACTGGGAC 1050
Hum-TP53  1051 GGAACAGCTT TGAGGTGCGT GTTTGTGCTT GTCTGGGAG AGACCGGCGC ACAGAGGAAG AGAATCTCCG 1120
Hum-TP53  1121 CAAGAAAGGG GAGCCTCACC ACGAGCTGCC CCCAGGGAGC ACTAAGCGAG CACTGCCCAA CAACACCAGC 1190
Hum-TP53  1191 TCCTCTCCCC AGCCAAAGAA GAAACCACTG GATGGAGAAT ATTTACCCTC TCAGATCCGT GGGCGTGAGC 1260
Hum-TP53  1261 GCTTCGAGAT GTTCCGAGAG CTGAATGAGG CCTTGGAACT CAAGGATGCC CAGGCTGGGA AGGAGCCAGG 1330
Hum-TP53  1331 GGGGAGCAGG GCTCACTCCA GCCACCTGAA GTCCAAAAG GGTCACTCTA CCTCCGSCA TAAAAACTC 1400
Hum-TP53  1401 ATGTTCAAGA CAGGAGGGCC TGACTCAGAC TGACATTCTC CACTTCTTGT TCCCCACTGA CAGCCTCCCA 1470
Hum-TP53  1471 CCCCCATCTC TCCCTCCCCT GCCATTTTGG GTTTTGGGTC TTTGAACCCT TGCTTGCAAT AGGTGTGCGT 1540
Hum-TP53  1541 CAGAAGCACC CAGGACTTCC ATTTGCTTTG TCCCGGGGCT CCACTGAACA AGTTGGCCTG CACTGGTGTT 1610
Hum-TP53  1611 TTGTTGTGGG GAGGAGGATG GGGAGTAGGA CATACCAGCT TAGATTTTAA GGTTTTFACT GTGAGGGATG 1680
Hum-TP53  1681 TTTGGGAGAT GTAAGAAATG TTCTGCACT TAAGGGTTAG TTTACAATCA GCCACATTCT AGGTAGGTAG 1750
Hum-TP53  1751 GGGCCCACTT CACCGTACTA ACCAGGGAAG CTGTCCCTCA TGTGAATTT TCTCTAACTT CAAGGCCCAT 1820
Hum-TP53  1821 ATCTGTGAAA TGCTGGCATT TGCACCTACC TCACAGAGTG CATTGTGAGG GTTAATGAAA TAATGTACAT 1890
Hum-TP53  1891 CTGGCCTTGA AACCACCTTT TATTACATGG GGTCTAAAAC TTGACCCCTC TGAGGGTGCC TGTTCCTCT 1960
Hum-TP53  1961 CCCTCTCCCT GTTGGCTGGT GGGTTGGTAG TTTCTACAGT TGGGCAGCTG GTTAGGTAGA GGGAGTTGTC 2030
Hum-TP53  2031 AAGTCTTGCT GGCCAGCCA AACCTGTCT GACAACCTCT TGGTCGACCT TAGTACCTAA AAGGAAATCT 2100

```

ES 2 594 083 T3

Hum-TP53 2101 CACCCATCC CACACCTGG AGGATTCAT CTCTGTATA TGATGATCTG GATCCACCAA GACTTGTTTT 2170
Hum-TP53 2171 ATGCTCAGGG TCAATTCTT TTTCTTTTT TTTTTTTTTT TTTCTTTTC TTTGAGACTG GGCTCGCTT 2240
Hum-TP53 2241 TGTTGCCAG GCTGGAGTGG AGTGGCGTGA TCTTGGCTTA CTGCAGCCTT TGCCTCCCCG GCTCGAGCAG 2310
Hum-TP53 2311 TCCTGCCTCA GCCTCCGGAG TAGCTGGGAC CACAGGTCA TGCCACCATG GCCAGCCAAC TTTTGCATGT 2380
Hum-TP53 2381 TTTGTAGAGA TGGGGTCTCA CAGTGTGCC CAGGCTGGTC TCAAACCTCT GGGCTCAGGC GATCCACCTG 2450
Hum-TP53 2451 TCTCAGCCTC CCAGAGTGCT GGGATTACAA TTGTGAGCCA CCACGTGGAG CTGGAAGGGT CAACATCTTT 2520
Hum-TP53 2521 TACATTCTGC AAGCACATCT GCATTTTAC CCCACCCTC CCCTCCTTCT CCCTTTTTAT ATCCATTTT 2590
Hum-TP53 2591 TATATCGATC TCTTATTTA CAATAAACT TTGCTGCCA 2629

Note que los codones de inicio (ATG) y detención están subrayados

FIG. 2

PROTEINA p53 DEL TUMOR DE HOMO SAPIENS (SINDROME LI-FRAUMENI) (TP53)

Hum_TP53_prot 1 MEEPQSDPSV EPPLSQETFS DLWKLLENV VLSPLPSQAM DDLMLSPDDI EQWFTEDPGP DEAPRMPSAA
Hum_TP53_prot 71 PRVAPAPAAP TPAAPAPAP5 WPLSSSVPSQ KTYQGSYGER LGFLHSGTAK SVTCTYSPAL NKMFCQLAKT
Hum_TP53_prot 141 CPVQLWVDST PPGTRVRAM AIYKOSQHMT EVVRCPPHE RCSDSDGLAP PQHLIRVEGN LRVEYLQDRN
Hum_TP53_prot 211 TFRHSVVVPY EPPEVGGDCT TIHYNVMCNS SCMGGMNRRP ILTIITLED5 SGNLLGRNSF EVRVCACPGR
Hum_TP53_prot 281 DRRTEENLR KKGEPPHELP EGSTKRALPN NTSSSPQPKK KPLDGEYFTL QIRGRERFEM FRELNEALEL
Hum_TP53_prot 351 KDAQAGKEPG GSRAHSSHLK SKKGQSTSRH KKLMPKTEGP DST 393

VARIACIONES EN OTRAS ENTRADAS PARA HUMANO EN GeneBank (gi - 23491728; gi - 35209; gi - 13097806):

R72 -> P
R273 -> H
P278 -> A
P309 -> S

FIG. 3

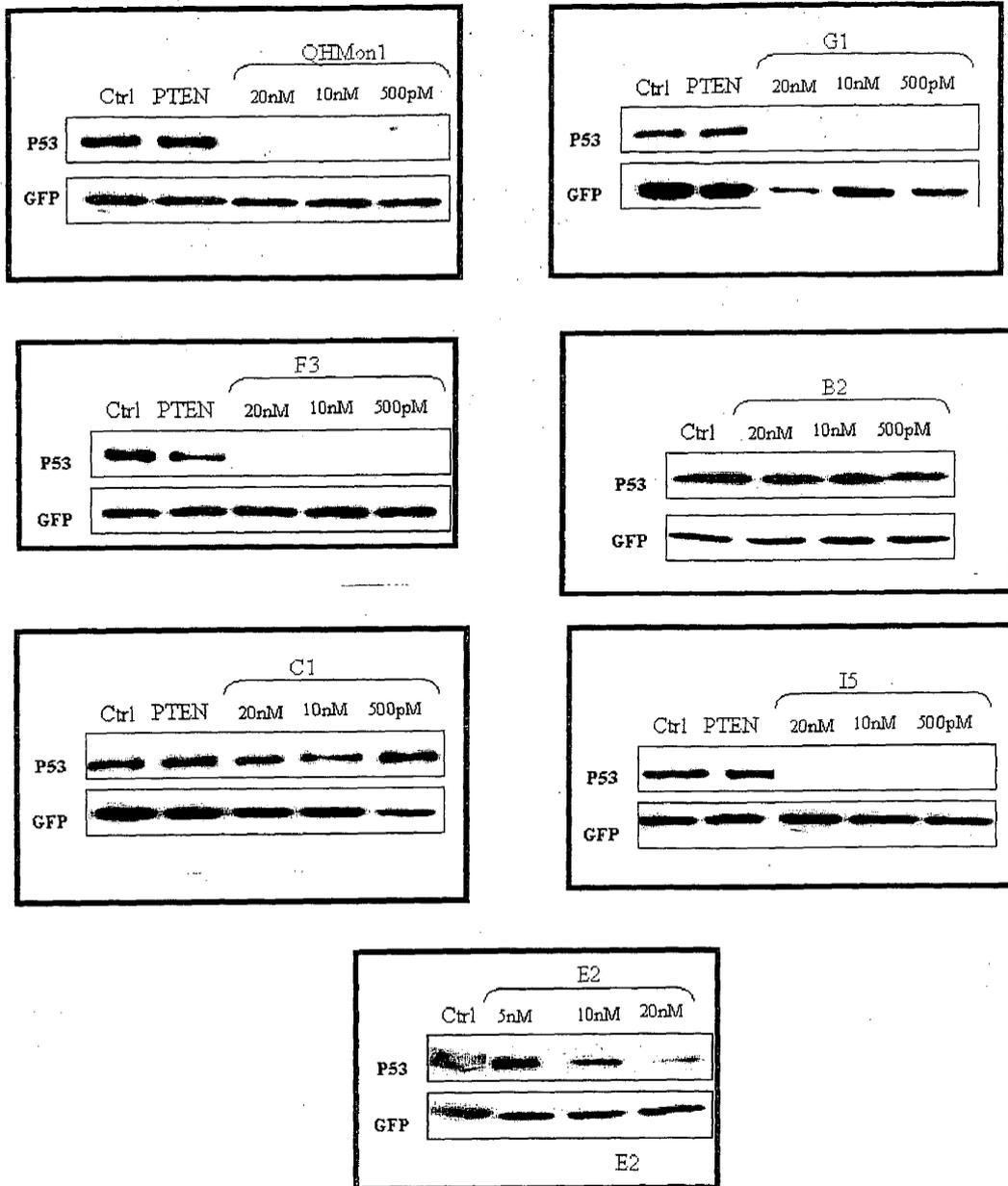


FIG. 4

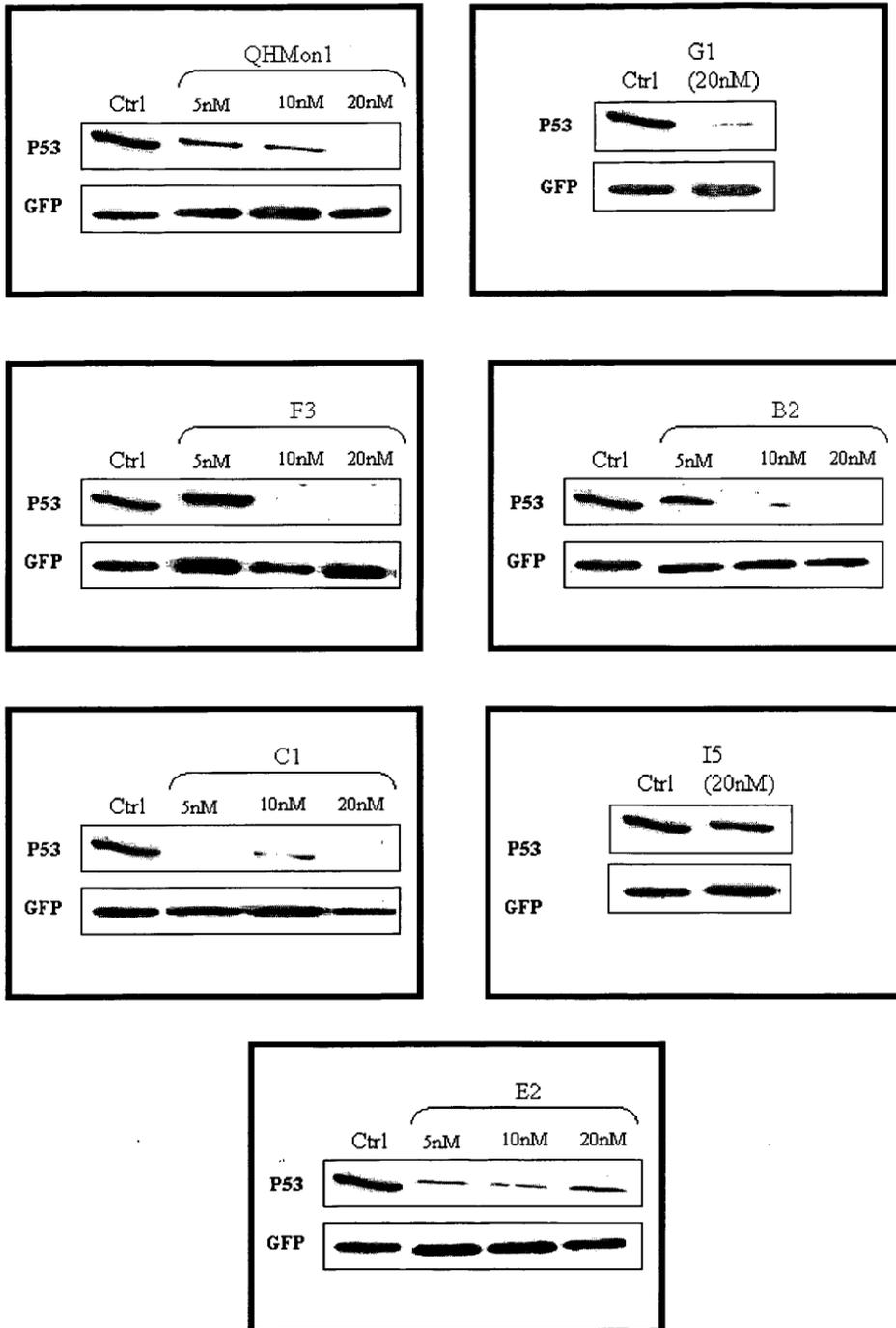


FIG. 5

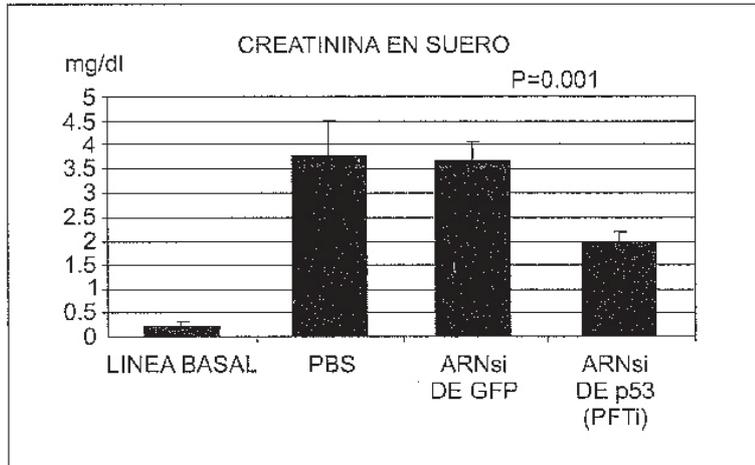


FIG. 6

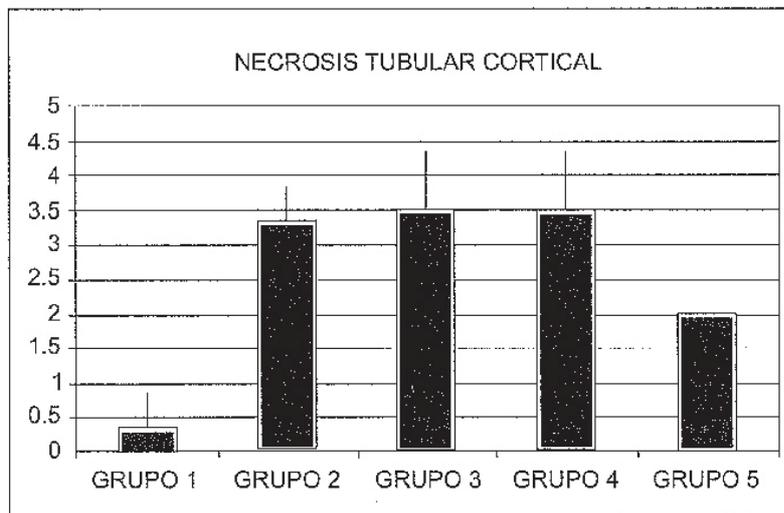


FIG. 7

