

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 357**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61L 31/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/08 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2006 E 06746805 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1900380**

54 Título: **Composición farmacéutica para la vasculopatía oclusiva.**

30 Prioridad:

25.05.2005 JP 2005152346

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

30.05.2013

73 Titular/es:

**CELLMID LIMITED (100.0%)
Level 6, 40 King Street
Sydney NSW 2000 , AU**

72 Inventor/es:

**KADOMATSU, KENJI;
BANNO, HIROSHI;
TAKEI, YOSHIFUMI;
KOMORI, KIMIHIRO;
MURAMATSU, T. y
SAKUMA, SADATOSHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 405 357 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

Composición farmacéutica para la vasculopatía oclusiva.

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar una vasculopatía obstructiva, incluyendo la restenosis vascular tras una angioplastia.

10 [Antecedentes de la técnica]

Las patologías cardíaca y vascular han ido en aumento durante los últimos años. Entre éstas, las patologías angiostenóticas causadas, por ejemplo, por la arterioesclerosis de las arterias coronarias o similares, también han ido en aumento. Por ejemplo, la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP), que se introdujo en 1977 para tratar patologías angiostenóticas de arterias coronarias, se ha convertido desde entonces en un procedimiento de revascularización muy extendido. La angioplastia coronaria transluminal percutánea es un procedimiento para ensanchar los vasos sanguíneos y regenerar el flujo sanguíneo en un sitio estenótico expandiendo un balón unido a la punta de un catéter. Sin embargo, del 30 al 60% de los pacientes muestran restenosis en el sitio regenerado antes de 6 meses. Esto ha devaluado la eficacia de la angioplastia coronaria transluminal percutánea. La combinación adicional de la ACTP con la colocación de un stent vascular, en la que se coloca un stent con la intención de mantener el vaso sanguíneo expandido en el sitio estenótico, permite reducir la frecuencia de restenosis, aunque la tasa de restenosis en el sitio de colocación del stent sigue siendo aproximadamente del 15 al 20%, mientras que en algunos casos, la tasa de restenosis excede del 30 al 60% en pacientes que tienen enfermedades múltiples. El injerto venoso quirúrgico, que se realiza para las enfermedades oclusivas en arterias periféricas, también presenta una tasa de restenosis de aproximadamente el 20%.

También se ha intentado la supresión de las patologías angiostenóticas mediante oligonucleótidos complementarios usando liposomas para la expresión de la midkina (MK), que es un factor de crecimiento/diferenciación (Hayashi y col., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Mayo de 2005;288(5):H2203-9. Publicado en Internet el 6 de enero de 2005). También se ha intentado aplicar oligonucleótidos complementarios, usando liposomas, en modelos caninos de injerto (Matsumoto T, Komori K, Yonemitsu Y, Morishita R, Sueishi K, Kaneda Y, Sugimachi K. Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene transfer of endothelial cell nitric oxide synthase inhibits intimal hyperplasia of canine vein grafts under conditions of poor runoff. *J Vasc Surg.* 1998; 27: 135-144:artículo 49). También se está desarrollando actualmente la aplicación de diversos oligonucleótidos complementarios y/o ácido acetilsalicílico en diversos animales, como conejos y similares, empleando gel plurónico (de BASF), que está en forma de gel a una temperatura próxima a las temperaturas corporales de los mamíferos (Fulton GJ, Davies MG, Koch WJ, Dalen H, Svendsen E, Hagen PO. Antisense oligonucleotide to proto-oncogene c-myc inhibits the formation of intimal hyperplasia in experimental vein grafts. *J Vasc Surg.* 1997; 25: 453-463, Fulton GJ, Davies MG, Barber L, Svendsen E, Hagen PO. Locally applied antisense oligonucleotide to proliferating cell nuclear antigen inhibits intimal hypertrophy in experimental vein grafts. *Ann Vasc Surg.* 1998; 12: 412-417, Suggs WD, Olson SC, Madhani D, Patel S, Veith FJ. Antisense oligonucleotides to c-fos and c-jun inhibit intimal hypertrophy in a rat vein graft model. *Surgery,* 1999; 126:443-449, Torsney E, Mayr U, Zou Y, Thompson WD, Hu Y, Xu Q. Thrombosis and neointima formation in vein grafts are inhibited by locally applied aspirin through endothelial protection. *Circ Res.* 2004; 94: 1466-1473: artículos 14, 15, 23 y 24). También se ha notificado la aplicación de oligonucleótidos complementarios en modelos de injertos, usando adenovirus (Yamashita A, Hanna AK, Hirata S, Dardik A, Sumpio BE. Los factores de crecimiento de fibroblastos básicos antisentido alteran el curso temporal de la proteína quinasa activada por mitógeno en la remodelación del injerto venoso arterializado. *J Vasc Surg.* 2003; 37: 866-873).

50 [Descripción de la invención]

Esta restenosis vascular parece estar causada por una hipertrofia de la íntima derivada de la proliferación y migración de células del músculo liso vascular resultado de la inflamación inducida por la lesión de la pared interna, en especial del endotelio, de los vasos sanguíneos durante los procedimientos quirúrgicos descritos anteriormente. Sin embargo, los stents de liberación sostenida de fármaco anteriores son problemáticos porque, teniendo en cuenta la citotoxicidad inespecífica del fármaco, la regeneración de las células endoteliales es especialmente difícil, lo cual dificulta la reversión a una pared vascular normal, y también problemático porque, aunque es eficaz frente a la restenosis de arterias coronarias en el corazón, su efecto contra la estenosis arterial periférica sigue siendo incierto. Estos problemas aún no se han resuelto. Asimismo, la inhibición de MK por oligonucleótidos complementarios (inhibición de aproximadamente el 60% del control) podría decirse que era insuficiente. Además, los demás procedimientos descritos anteriormente permitían como máximo solo una inhibición de hasta aproximadamente el 60% del control. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de una prevención o tratamiento superior de las vasculopatías obstructivas como la restenosis vascular o similares.

65 Como resultado de la investigación sobre el uso de una construcción de ácido nucleico para inhibir la expresión de la proteína MK mediante interferencia de ARN, en presencia de una molécula de colágeno, los inventores perfeccionaron la presente invención hasta descubrir que la combinación de dicha construcción de ácido nucleico

con una molécula de colágeno producía un efecto inhibitorio inesperadamente superior al efecto inhibitorio convencional descubierto de hipertrofia de la íntima ejercido por los oligonucleótidos complementarios de MK. La presente invención proporciona los métodos que se recogen a continuación.

5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de la vasculopatía obstructiva resultado de la restenosis tras una cirugía vascular reparadora que comprende: una construcción de ácido nucleico que inhibe la expresión del gen midkina mediante interferencia de ARN en el que dicha construcción de ácido nucleico comprende un ARNip que tiene como diana al menos una porción del ARNm que codifica la proteína midkina y una molécula de colágeno, donde el sitio de administración es la capa externa del vaso sanguíneo del sitio de la vasculopatía obstructiva.

10 La construcción de ácido nucleico comprende un ARNip. La molécula de colágeno puede ser una molécula de atelocolágeno. La molécula de colágeno puede comprender una molécula de colágeno fibroso. Esta composición para vasculopatías obstructivas puede estar en una cualquiera de las formas seleccionadas entre polvo, fibras, líquido, gel, pellet, película, esponja y tubo. Esta composición para vasculopatías obstructivas puede usarse para la prevención o tratamiento de enfermedades oclusivas de los vasos sanguíneos, como las arterias coronarias del corazón, vasos sanguíneos del cerebro, vasos sanguíneos renales y vasos sanguíneos periféricos, resultado de la restenosis tras una cirugía vascular reparadora. Dicha composición puede utilizarse para la prevención o tratamiento de la vasculopatía obstructiva resultado de la restenosis tras una cirugía vascular reparadora en humanos. La construcción de ácido nucleico puede tener como diana cualquier secuencia seleccionada entre las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs 11 a 14.

15 La presente invención proporciona un dispositivo médico para el tratamiento o prevención de la vasculopatía obstructiva que comprende un soporte para el tratamiento del vaso y cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para la vasculopatía obstructiva, portada por al menos parte de la superficie del soporte para que se permita su gelificación en el sitio de la vasculopatía obstructiva donde dicha composición se suministra en un sitio colindante con la capa externa de la pared del vaso sanguíneo. El soporte para el tratamiento del vaso puede ser un stent vascular.

20 [Breve descripción de los dibujos]

La fig.1 muestra las secuencias de los sitios diana de los ARNip en el ARNm de rMK.

25 La fig. 2 muestra la estructura de cada ARNip.

30 La fig. 3 es una fotografía en la que se muestra una inmunotransferencia del nivel de expresión de la proteína rMK en células RK13.

35 La fig. 4 es una gráfica en la que se muestra la cuantificación densitométrica de la intensidad de banda detectada mediante la inmunotransferencia mostrada en la fig. 3.

40 La fig.5 es una fotografía en la que se muestra el curso temporal de la inmunotransferencia de la expresión de la proteína rMK en el injerto control.

45 La fig. 6 es una fotografía en la que se muestra el efecto sobre las células RK13 que expresan rMK obtenidas de riñón de conejo (nivel de expresión de rMK 24 horas después de la transfección).

50 La fig. 7 es una gráfica en la que se muestra la cuantificación densitométrica de la relación entre la intensidad de las bandas de la proteína rMK y de la β -actina en la inmunotransferencia del día 7 del postoperatorio del injerto tratado con ARNip #2-ST y el injerto control.

55 La fig.8 es una fotografía en la que se muestra el resultado de la observación inmunohistoquímica del día 14 del postoperatorio de un injerto retirado del modelo de injerto control.

60 La fig.9 muestra el resultado de la observación mediante microscopia láser confocal del día 7 del postoperatorio de cortes congelados de un injerto retirado del modelo de injerto introducido con ARNip #2-ST.

65 La fig. 10 muestra de tejido del modelo de injerto introducido con ARNip #2-ST (a) y del modelo de injerto control (b) 4 semanas después de la cirugía.

La fig. 11 es una gráfica en la que se compara el espesor de la túnica íntima entre los vasos mostrados en la fig. 10(a) y (b).

La fig. 12 es una gráfica en la que se compara la relación entre el espesor de la túnica media y el de la túnica íntima entre los vasos mostrados en la fig. 10(a) y (b).

La fig. 13 es un diagrama en el que se muestra un ejemplo de la estructura de cada ARNip que suprime la expresión de la MK humana mediante interferencia de ARN.

[Mejor modo de realizar la invención]

La composición farmacéutica para la vasculopatía obstructiva de la presente solicitud comprende una construcción de ácido nucleico que inhibe la expresión del gen midkina mediante la interferencia de ARN y una molécula de colágeno. Además, el dispositivo médico para la vasculopatía obstructiva de la presente invención comprende un soporte para el tratamiento del vaso y la composición farmacéutica portada por al menos parte de la superficie del soporte para el tratamiento del vaso.

La composición farmacéutica para vasculopatía obstructiva y el dispositivo médico para vasculopatía obstructiva comprende tanto una construcción de ácido nucleico que inhibe la expresión del gen midkina mediante la interferencia de ARN como una molécula de colágeno. Por tanto, combinando la construcción de ácido nucleico y la molécula de colágeno, la construcción de ácido nucleico suprime de forma eficaz la expresión de la proteína MK y suprime de forma eficaz la hipertrofia de la íntima inducida por lesión. Aunque, convencionalmente, las moléculas de colágeno se han utilizado como soportes para diversos medicamentos, las ventajas de utilizar una combinación de una molécula de colágeno y una construcción de ácido nucleico dirigida a la interferencia del ARN de MK, para el tratamiento de vasculopatías obstructivas, no se habían intuido hasta el momento. La afinidad de las moléculas de colágeno por el tejido vascular, la conservación estable y la liberación sostenida de la construcción de ácido nucleico permitida por las moléculas de colágeno, junto con la inhibición de la expresión de MK llevada a cabo por la construcción de ácido nucleico, permiten la obtención de un efecto inhibitorio de la hipertrofia de la íntima que, aunque no supone una limitación de la presente invención de ningún tipo, podría decirse que exceden de las expectativas. Presumiblemente, la notable inhibición de la hipertrofia de la íntima se produce gracias a la combinación de la construcción del ácido nucleico anterior y una molécula de colágeno, por medio de la construcción de ácido nucleico anterior que se mantiene en la proximidad del sitio afectado mediante una matriz de colágeno, durante un determinado periodo de tiempo en un estadio relativamente temprano tras la lesión del endotelio vascular inhibiendo, de este modo de forma eficaz la expresión de midkina en un estadio temprano tras la lesión. Específicamente, el efecto de inhibición de la hipertrofia de la íntima obtenido más allá de las expectativas, y que es el resultado de la posibilidad de inhibir la expresión de midkina en un momento apropiado para suprimir la hipertrofia de la íntima, se consigue presumiblemente combinando la construcción de ácido nucleico con la molécula de colágeno.

Esto se debe a que la expresión de MK en humanos adultos es, básicamente, muy limitada y débil, por lo que es difícil concebir que la inhibición de la expresión de la proteína MK en las células endoteliales induzca la muerte celular. La invención promete ser eficaz no solo frente a la restenosis de las arterias coronarias en el corazón sino también frente a la estenosis de arterias periféricas.

A continuación se explican las realizaciones preferidas de la composición farmacéutica y del dispositivo médico para la vasculopatía obstructiva de la presente invención. La composición médica y el dispositivo médico de la presente invención pueden usarse en humanos y en mamíferos no humanos.

(Composición farmacéutica para la vasculopatía obstructiva)

(Construcción de ácido nucleico)

La construcción de ácido nucleico de la presente invención se construye de modo que inhiba la expresión del gen de midkina mediante interferencia de ARN. En la presente memoria descriptiva, el término «ácido nucleico» significa un polinucleótido, como un ácido desoxirribonucleico o un ácido ribonucleico. Este término abarca polinucleótidos de cadena sencilla (sentido o complementaria) o de cadena doble, donde los polinucleótidos pueden haberse modificado de forma natural o artificial. En la presente invención, «interferencia de ARN» se refiere al fenómeno por el cual una secuencia de ARN de cadena doble degrada específicamente el ARNm de un gen diana. De este modo, la interferencia de ARN permite inhibir la expresión de un gen diana. En este documento, la inhibición de la expresión del gen midkina significa inhibición de la traducción a polipéptido a partir del ARNm que codifica la midkina o reducción de la cantidad de expresión de la proteína midkina.

La midkina (MK), que es un factor de crecimiento/diferenciación descubierto como producto génico expresado de forma transitoria en el proceso de inducción de diferenciación mediada por el ácido retinoico en células de carcinoma embrionario (CE), es un polipéptido de 13 kDa rico en aminoácidos básicos y en cisteína. (Kadomatsu, K. y col.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318; Tomomura, M. y col.: J. Biol. Chem., 265:10765-10770, 1990). La MK, que se encuentra desde humanos a *Xenopus*, muestra una alta conservación entre especies, con una homología en la secuencia de aminoácidos del 87% entre humanos y ratones. MK posee una actividad biológica diversa. Específicamente, la MK estimula la extensión axonal, la supervivencia neuronal y se cree que participa en la construcción del sistema nervioso. Se ha encontrado MK también en tejidos dañados, en muchos cánceres humanos y en las placas seniles de la enfermedad de Alzheimer, lo que ha atraído también la atención con respecto a su función en la reparación de tejidos, en el poder de activación del sistema fibrinolítico y en procesos patológicos.

Puesto que la expresión de MK aumenta en muchos cánceres humanos (Aridome, K. y col.: Jap. J. Cancer Res., 86: 655-661, 1995) y puesto que las células resultantes de la transfección y expresión del ADNc de MK muestran una transformación maligna (Kadomatsu, K., y col.: Brit. J. Cancer, 75: 354-359, 1997), se plantea la hipótesis de que MK está implicada estrechamente en la génesis y progresión de cánceres humanos. En ratones *knockout* que carecen del gen MK, la formación de neoíntima disminuye drásticamente en modelos de lesión con balón, lo que sugiere la implicación de MK también en la aparición de patologías vasculares (Horiba, M. y col.: J. Clin. Invest., 105: 489-495, 2000).

La construcción de ácido nucleico, que se construye para permitir la inhibición del gen midkina, tiene como diana de la misma al menos una porción del ARNm que codifica la proteína midkina. Una forma de dicha construcción de ácido nucleico incluye una construcción de ARN que tiene un oligorribonucleótido con estructura de cadena doble que se hibrida mutuamente. Específicamente, la construcción de ácido nucleico puede comprender un oligorribonucleótido de cadena doble relativamente corto (ARN de interferencia pequeño: ARNip) que tiene un extremo 3' saliente o un oligorribonucleótido monocatenario (ARN horquillado corto = ARNh_c) que forma (o tiene) una estructura en horquilla.

El ARNip, que tiene una secuencia sentido y una secuencia complementaria que se corresponde con una secuencia diana, tiene formado en su interior una estructura de cadena doble en la que la secuencia sentido y la secuencia complementaria hibridan a lo largo de una determinada longitud. La secuencia sentido y la secuencia complementaria hibridan entre sí, aunque pueden contener parcialmente porciones no apareadas. Por ejemplo, la secuencia sentido puede tener una o más bases no apareadas y/o bases eliminadas. Aunque la secuencia sentido y la secuencia complementaria del ARNip tienen extremos 3' salientes y una porción de cadena doble para su emparejamiento, a lo largo de longitudes respectivas predefinidas, no se requiere necesariamente la identidad de la secuencia sentido ni la complementariedad de la secuencia complementaria con respecto a la secuencia diana del ARNm sobre los extremos 3' colgantes.

El ARNh_c tiene una secuencia sentido en el lado 5' y una secuencia complementaria en el lado 3', que se corresponde con la misma secuencia diana del ARNip. Estas secuencias forman un tallo a lo largo de una longitud determinada y tienen un sitio de lazo con un sitio en mitad de procesamiento de nucleasa. Por tanto, el ARNh_c produce un ARNip mediante un procesamiento intracelular. Como se ha explicado para el ARNip, no es necesario que la secuencia sentido y la secuencia complementaria, que se corresponde con los fragmentos colgantes del ARNip derivado del ARNh_c, sean idénticas o presenten complementariedad con respecto a la secuencia diana.

Típicamente, la longitud de la cadena doble de la secuencia sentido y la secuencia complementaria en esta realización de la construcción de ácido nucleico oscila preferiblemente de 13 a 28 pb, más preferiblemente de 13 a 27 pb, aún más preferiblemente de 19 a 21 pb y, lo más preferiblemente es de 19 o 20 pb. Típicamente, la secuencia sentido y la secuencia complementaria que comprende una estructura de lado 3' que no forma una cadena doble tiene, preferiblemente, de 15 a 30 nt, más preferiblemente de 15 a 29 nt, aún más preferiblemente de 21 a 23 nt y, lo más preferiblemente, 21 o 22 nt. El extremo 3' que sobresale del ARNip comprende, preferiblemente, de 2 a 4 nt y, más preferiblemente, 2 nt. La longitud del lazo del ARNh_c puede ser tal que no entorpezca la formación y el mantenimiento de una cadena doble (tallo del ARNh_c) y una estructura 3' terminal.

La secuencia de ARNm de la MK diana de dicha construcción de ácido nucleico se determina, por ejemplo, según las reglas que aparecen a continuación, lo que permite el diseño de un ARNip adecuado.

1) Estará dirigida a secuencias que produzcan, por ejemplo, AA(N19)TT, AA(N21), NA(N21) en la secuencia codificadora (SC) del gen diana (usando 19 bases entre las bases 3^a y 21^a, como ARNip).

2) Se dejarán al menos de 50 a 100 bases después del extremo 3' del codón inicial para evitar los sitios de unión de los factores de transcripción.

3) Se evitará la proximidad de la región 5'-UTR.

4) Se seleccionarán secuencias que no tengan homología con otros genes mediante búsquedas de homología.

5) Se establecerá un contenido en GC de aproximadamente el 50%.

Métodos de diseño de siRNA, incluidos los métodos para la determinación de otra secuencia diana, se pueden llevar a cabo de forma adecuada de acuerdo con las reglas descritas en, por ejemplo, <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php>, <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html> y Rational siRNA desing for RNA interference (Nature Biotechnology, vol. 22, 326-330 (2004), Angela Reynolds, Devin Leake, Queta Boese, Stephen Scaringe, William S Marshall & Anastasia Khvorova), Improved and automated prediction of effective siRNA (Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 18;319(1):264-74, Chalk AM, Wahlestedt C, Sonhammer EL.).

Por ejemplo, el ARNm de la MK humana ha sido ya publicado (Tsutsui, J. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 176:792-797, 1990; número de acceso a GenBank: NM_001012334). En función de estas secuencias, puede

diseñarse y construirse una construcción de ácido nucleico como ARNip o similares que permitan la inhibición de la expresión del ARNm de la MK humana. Por ejemplo, los sitios diana 1 a 4 descritos en la solicitud de patente japonesa no revisada en trámite N.º 2004-275169 pueden usarse como la secuencia diana. En la fig. 13 se muestra un ejemplo de ARNip para la MK humana que puede usarse como construcción de ácido nucleico capaz de mostrar interferencia de ARN con estas secuencias diana. En el ARNip de MK cada una de las secuencias sentido y de las secuencias complementarias pueden tener una porción de 2 nt que sobresalen en su extremo. La construcción de ácido nucleico, como el ARNip o similar, capaz de inhibir la expresión de MK permite la prevención y el tratamiento de forma eficaz de las vasculopatías obstructivas en humanos. Un sitio diana preferido es el sitio diana 4.

10 Sitio diana del ARNm 1: gaaggaguuuggagccgac; CONTENIDO EN GC DEL 52%)(SEC ID: 11)

Sitio diana del ARNm 2: gaaggcgcgcuacaugcu; CONTENIDO EN GC DEL 52%)(SEC ID: 12)

15 Sitio diana del ARNm 3: gcaaaggccaagccaaga; CONTENIDO en GC DEL 47%)(SEC ID: 13)

Sitio diana del ARNm 4: guuuggagccgacugcaag; CONTENIDO EN GC DEL 52%)(SEC ID: 14)

Esta construcción de ácido nucleico puede sintetizarse según los procedimientos de síntesis química de polirribonucleótidos conocidos, como por ejemplo, el procedimiento de la fosfoamidita. La construcción de ácido nucleico también puede sintetizarse usando transcripción *in vitro*. La transcripción *in vitro* puede llevarse a cabo, por ejemplo, sintetizando ADN que codifica dichos polirribonucleótidos; en base a este ADN, sintetizando un molde de ADN de cadena doble para la transcripción mediante PCR usando ADN polimerasa y un cebador que tenga una secuencia promotora de ARN como el promotor de ARN T7 o similar; empleando a continuación la ARN polimerasa para el molde de ADN de cadena doble para la transcripción. Esto permite obtener un ARN de cadena sencilla deseado. En el caso del ARNip, este puede obtenerse fabricando un ARN de cadena doble mediante la hibridación del ARN complementario y el ARN sentido obtenidos, mediante la degradación de los extremos apropiados usando ARNasas o similares y purificando el ARN de cadena doble obtenido. En el caso del ARNhc, este último puede obtenerse fabricando un ARN de cadena sencilla que comprenda una secuencia sentido, una secuencia complementaria y una secuencia en lazo, recortándolo usando diversas ARNasas específicas de base, entre la secuencia sentido y la secuencia complementaria, seguido de hibridación de la secuencia sentido y la secuencia complementaria. El ARNip puede obtenerse tratando con nucleasas específicas de base la secuencia lazo del ARNhc obtenido de este modo. El procedimiento de transcripción *in vitro* no se limita al anterior. La transcripción *in vitro* puede llevarse a cabo según diversos procedimientos conocidos, empleando kits de transcripción *in vitro* disponibles en el mercado. La construcción de ácido nucleico también puede comprender diversos grupos modificados conocidos por la resistencia a la nucleasa.

Otra forma de la construcción de ácido nucleico es un vector que codifica la construcción de ARN de la forma anterior, es decir, un vector que codifica expresamente el ARNip y/o el ARNhc. De esta forma, el vector de expresión del ARNhc puede estar constituido por una secuencia complementaria, una secuencia sentido y, además, una secuencia lazo, de modo que el ARN de cadena sencilla al cual el ARNhc está conectado por construcción se expresa mediante transcripción intracelular. El vector de expresión del ARNip puede estar construido de modo que se permita la transcripción del ARN que tiene una secuencia sentido y una secuencia complementaria predefinidas. En un vector de expresión del ARNip, la secuencia sentido y la secuencia complementaria puede expresarse mediante un vector único o mediante los respectivos vectores diferentes.

Los promotores utilizados para dichos vectores de expresión pueden ser los promotores de pol II o pol III, siempre que permitan la producción del correspondiente ARN mediante el ADN anterior. Entre los promotores de pol III se incluye, por ejemplo, el promotor U6, el promotor de ARNt, el promotor LTR retroviral, el promotor VA1 de adenovirus, el promotor de ARNr 5S, el promotor del ARN 7SK, el promotor del ARN 7SL, el promotor del ARN H1 y similares. Entre los promotores de pol II se incluyen, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus, el promotor de T7, el promotor de T3, el promotor de SP6, el promotor de RSV, el promotor de EF-1 α , el promotor de β -actina, el promotor de γ -globulina, el promotor de SR α y similares.

El vector de expresión puede estar en forma de un vector plasmídico o un vector vírico. El tipo de vector no está especialmente restringido y puede seleccionarse de acuerdo con, por ejemplo, la célula que se va a transfectar. Entre los vectores para células de mamíferos se incluyen, por ejemplo, vectores víricos como vectores de retrovirus, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados, vectores del virus de la varicelovacuina, vectores de lentivirus, vectores de virus del herpes, vectores de alfavirus, vectores de virus de EB, vectores de papilomavirus, vectores de espumavirus y similares.

La construcción de ácido nucleico usando estos vectores de expresión pueden obtenerse fácilmente, por ejemplo, en base a vectores disponibles en el mercado construidos para fabricar ARNip y/o ARNhc o en base a los protocolos de dichos vectores y/o en base a «RNAi Experiment Protocols, Experimental Medicine, Volumen suplementario» (Yodosha, publicado el 1 de octubre de 2004).

(Molécula de colágeno)

La composición farmacéutica de la presente invención contiene una molécula de colágeno. Como molécula de colágeno puede usarse colágeno soluble o colágeno solubilizado. Como «colágeno soluble» se incluye, por ejemplo, colágeno que es soluble en agua ácida o neutra, o en agua que contiene sales. Como «colágeno solubilizado» se incluye, por ejemplo, colágeno enzima-solubilizado solubilizado por enzimas y colágeno álcali-solubilizado solubilizado por álcalis.

La fuente de colágeno no está especialmente restringida y puede usarse colágeno extraído a partir de vertebrados o recombinantes genéticos del mismo. En este documento puede usarse, por ejemplo, colágeno extraído a partir de mamíferos, aves, peces o recombinantes genéticos de los mismos. El tipo de colágeno, que oscila de I a V, no está especialmente limitado y puede usarse cualquier tipo. Entre los ejemplos del tipo de colágeno se incluye el colágeno de tipo I, obtenido mediante extracción ácida de la dermis de mamíferos o un recombinante genético del mismo. Más deseablemente, el tipo de colágeno puede ser, por ejemplo, colágeno de tipo I obtenido mediante extracción ácida de la dermis de ternero o colágeno de tipo I producido mediante ingeniería genética. El colágeno derivado de dermis de ternero o de dermis humana se usa preferiblemente como el colágeno de tipo I producido mediante ingeniería genética. En términos de seguridad, es preferible utilizar atelocolágeno al que se eliminan enzimáticamente los telopéptidos de alta antigenicidad o atelocolágeno producido mediante ingeniería genética. En este documento, es aún más preferible utilizar atelocolágeno con tres o menos restos de tirosina por molécula.

Preferiblemente, la molécula de colágeno de la composición farmacéutica se convierte en fibras al menos antes de la administración de la composición farmacéutica dentro del organismo, o inmediatamente tras la administración en un sitio de administración predeterminado en las condiciones fisiológicas de este sitio o rápidamente a partir de entonces (al menos, en varias decenas de minutos, preferiblemente en varios minutos) (a partir de aquí, en este documento, dichos periodos de tiempo tras la administración se refieren colectivamente como «tras la administración»). La formación de fibras a partir de las moléculas de colágeno se produce mediante el ensamblaje de las moléculas de colágeno a lo largo del eje longitudinal de las moléculas, dependiendo de la temperatura, el pH y/o la concentración de sales. Se cree que la formación de fibras a partir de las moléculas de colágeno aumenta la estabilidad de la construcción del ácido nucleico dentro del organismo. A través de la formación de fibras a partir de las moléculas de colágeno en el sitio de administración, la molécula de colágeno fibrosa queda soportada de forma estable en el sitio de administración, es decir, en la pared interna y/o en la pared externa de un vaso sanguíneo, o sobre un material médico de colocación intravascular.

La composición farmacéutica, que contiene una molécula de colágeno que se convierte en fibras tras su administración, contiene la construcción de ácido nucleico y la molécula de colágeno antes de la formación de fibras. La composición farmacéutica también puede mezclarse, inmediatamente antes de su administración, con un agente líquido que confiera capacidad de formar fibras a la molécula de colágeno, de modo que se lleve a cabo la formación de fibras a partir de las moléculas de colágeno. La composición farmacéutica también puede ser tal que la formación de fibras se produzca en condiciones fisiológicas en el sitio de administración sin utilizar dicho agente líquido. La composición farmacéutica puede comprender la construcción de ácido nucleico y una molécula de colágeno ya fibrosa. En este caso, la molécula de colágeno se somete al proceso de formación de fibras preferiblemente mezclando de forma homogénea con antelación, antes de la formación de fibras a partir de las moléculas de colágeno, la construcción de ácido nucleico y la molécula de colágeno. Si el caso pudiera requerirlo, la molécula de colágeno tras la formación de fibras puede tomar cualquiera de las diversas formas descritas más abajo, como polvo, pellet, película o esponja, mediante secado o un proceso similar.

La molécula de colágeno fibrosa puede estar convenientemente entrecruzada. Se cree que la presencia de una estructura entrecruzada retrasa su degradación en el organismo y la liberación de la construcción de ácido nucleico. El colágeno puede impartir una estructura entrecruzada mediante diversos procedimientos conocidos, como radiación, por ejemplo radiación UV, o tratamiento con transglutaminasa, siempre que se conserve la eficacia de la composición farmacéutica. También pueden introducirse grupos succinilo en la molécula de colágeno fibroso y no fibroso, con vistas a conferir antitrombogenicidad a la misma.

La presente composición puede formularse en cualquier forma incluyendo, por ejemplo, polvo, fibras, líquido, película, esponja, tubo y similares. Se puede llegar a estas formulaciones como resultado de la forma de las propias moléculas de colágeno o usando aditivos y/o excipientes habitualmente conocidos en el campo de la técnica en cuestión.

Cuando está en forma de solución para gel, la composición farmacéutica oscila de aproximadamente 0,001% a aproximadamente el 10%, preferiblemente de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 5%, y más preferiblemente, de aproximadamente el 1,5% a aproximadamente el 3,75%. Cuando está en forma de polvo, fibras, pellet, película, esponja o tubo, la composición farmacéutica puede oscilar de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 99%, preferiblemente de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 70% y, más preferiblemente, de más del 25% al 50%. La composición farmacéutica puede comprender una sal o similar que contribuya a crear las condiciones para la formación de fibras a partir de las moléculas de colágeno.

La composición farmacéutica se usa a nivel local en una forma apropiada para la formulación de la misma en un sitio donde se ha producido una enfermedad trombótica oclusiva o en sitio en el que puede producirse la enfermedad trombótica oclusiva (dicho sitio es denominado en este documento a partir de ahora, por ejemplo, un sitio de vasculopatía obstructiva). Además de un sitio obstructivo real que se produce en un vaso sanguíneo, el término sitio de vasculopatía obstructiva indica el vaso sanguíneo completo del sitio obstructivo, incluyendo la capa externa de la pared del vaso sanguíneo en el sitio obstructivo. La composición farmacéutica en forma de solución o de gel puede inyectarse dentro, o aplicarse sobre, la capa externa de la pared de un vaso sanguíneo de un sitio de vasculopatía obstructiva; la composición farmacéutica en forma de polvo o de fibra puede extenderse sobre la pared externa de un sitio de vasculopatía obstructiva; mientras que la composición farmacéutica en forma de tubo, pellet, película o esponja puede colocarse y/o adherirse contra la capa interna o externa de la pared de un vaso sanguíneo de un sitio de vasculopatía obstructiva. La composición farmacéutica puede estar soportada fácilmente en un sitio de vasculopatía obstructiva, por ejemplo, configurando la composición farmacéutica como un tubo, película o esponja que pueda ajustarse o adaptarse a la capa interna o externa de la pared de un vaso sanguíneo del sitio de la vasculopatía obstructiva en un sitio de vasculopatía obstructiva. Para la aplicación local de la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse un procedimiento percutáneo que suponga la inyección de una composición farmacéutica empleando un catéter, balón o similar o un procedimiento quirúrgico como microcirugía.

La composición farmacéutica puede convertirse en gel fácilmente en un sitio de vasculopatía obstructiva, tras su administración, cuando la molécula de colágeno de la composición farmacéutica esté contenida en dicha composición de modo que pueda convertirse fácilmente en fibras tras su administración o se hayan convertido de antemano. Como resultado, esto permite mantener la construcción de ácido nucleico, que es el componente activo frente a la hipertrofia de la íntima, localizado de forma estable y en la concentración pretendida.

Como se explicó anteriormente, el uso de la composición farmacéutica que contiene la construcción de ácido nucleico y las moléculas de colágeno anteriores en un sitio de vasculopatía obstructiva permite conseguir un efecto de inhibición de la hipertrofia de la íntima superior a lo esperado. En especial, la composición farmacéutica puede usarse preferiblemente para prevenir o tratar las vasculopatías oclusivas, como en las arterias coronarias del corazón, los vasos sanguíneos cerebrales, los vasos sanguíneos renales y los vasos sanguíneos periféricos, que se produzcan, por ejemplo, debido a restenosis tras una cirugía vascular reparadora o arteriosclerosis.

(Dispositivo médico para la vasculopatía obstructiva)

El dispositivo médico para la vasculopatía obstructiva de la presente invención comprende un soporte para el tratamiento del vaso y la composición farmacéutica portada por al menos parte de la superficie del soporte para el tratamiento del vaso. Dicho dispositivo médico para una vasculopatía obstructiva permite administrar de forma estable la composición farmacéutica a un sitio con vasculopatía obstructiva. Cuando se usa un soporte intravascular insertable para el tratamiento del vaso, la composición farmacéutica puede ser suministrada en un sitio de vasculopatía obstructiva o similar por vía percutánea, sin recurrir a un procedimiento quirúrgico.

El soporte para el tratamiento del vaso incluye materiales de reconstrucción vascular como materiales que refuerzan, funcionan como prótesis, soportan y/o sustituyen al menos parte de un vaso sanguíneo en el organismo, e incluye también dispositivos de inserción intravascular. Entre los ejemplos específicos de materiales de reconstrucción vascular se incluyen, por ejemplo, vasos sanguíneos artificiales y prótesis vasculares, mientras que entre los dispositivos de inserción intravascular se incluyen, por ejemplo, dispositivos de colocación intravasculares como stents o similares, así como catéteres y balones. El uso de un material de reconstrucción vascular o un dispositivo de colocación intravascular, como un stent o similar, permite la aplicación permanente a largo plazo de la composición farmacéutica en un sitio de vasculopatía obstructiva y permite prevenir también las oclusiones vasculares como la restenosis y similares debido a las lesiones en las que se incurre durante la colocación anterior. Cuando se usa un catéter o un balón, la composición farmacéutica puede suministrarse fácilmente también a un vaso sanguíneo periférica, donde la colocación de un dispositivo permanente es difícil. También puede usarse un catéter o un balón para suministrar la composición farmacéutica a un dispositivo permanente como un stent y/o a un material de reconstrucción vascular. Las formas y materiales de estos dispositivos para inserción intravascular pueden ser aquellos usados en dispositivos convencionales para inserción intravascular.

Puede usarse un stent como soporte para el tratamiento del vaso, y permite prevenir de forma eficaz la restenosis que acompaña a la colocación del stent y similar. El stent utilizado puede tener una forma enrollada, una forma de red tubular o similar, y puede ser un stent expandible por balón o un stent autoexpandible.

La composición farmacéutica se proporciona sobre al menos parte de la superficie del soporte para el tratamiento del vaso. Una composición farmacéutica puede proporcionarse en un sitio que se corresponde con la pared interna de un vaso sanguíneo o la pared externa del vaso sanguíneo, o en un sitio colindante a estos sitios. Cuando el soporte para el tratamiento del vaso es un bioinjerto, un vaso sanguíneo artificial o una prótesis vascular, puede proporcionarse una composición farmacéutica sobre la pared interna del vaso sanguíneo o la pared externa del vaso sanguíneo de la anterior. En el caso de un dispositivo de colocación intravascular como un stent o similar, o en el caso de un catéter o balón, puede proporcionarse una composición farmacéutica a un sitio (porción de elongación, porción de expansión o similar) que puede estar contiguo a la pared interna del vaso sanguíneo. Según la presente

invención, el sitio de administración es la capa externa del vaso sanguíneo del sitio de vasculopatía obstructiva.

Antes de su uso, el dispositivo médico está en un estado en el que la composición farmacéutica se soporta, en forma de polvo, fibras, gel, película, esponja o similar, sobre la superficie del soporte. El procedimiento por el cual la composición farmacéutica se soporta sobre la superficie de soporte no está especialmente limitado. La composición farmacéutica en forma de solución o en forma de gel puede estar empapando, o aplicada sobre, el soporte para el tratamiento del vaso, seguido por la gelificación o secado del mismo, quedando soportada de este modo sobre el soporte para el tratamiento del vaso. Si es necesario, también puede llevarse a cabo la formación de fibras de colágeno. Además, la composición farmacéutica en forma, por ejemplo, de gel, película o esponja, adaptado a la forma de la cara externa o a la forma de la cara interna del soporte para el tratamiento del vaso, puede adherirse estrechamente al soporte para el tratamiento del vaso mediante una capa adhesiva adecuada interpuesta opcionalmente entre ambos. En este caso, la molécula de colágeno puede estar entrecruzada.

La composición farmacéutica se suministra quirúrgicamente o por vía percutánea a un sitio de vasculopatía obstructiva según la forma del soporte para el tratamiento del vaso. Puesto que contiene moléculas de colágeno, la composición farmacéutica del dispositivo médico queda soportada sobre la superficie del soporte para el tratamiento del vaso en estado gelificado (preferiblemente, mediante la formación de fibras de moléculas de colágeno) como resultado de la absorción de agua dentro del organismo producida cuando la composición farmacéutica alcanza el sitio de vasculopatía obstructiva, o al menos durante varias decenas de minutos después de entonces.

Puesto que, como se explica anteriormente, la composición farmacéutica se soporta sobre el soporte para el tratamiento del vaso, el dispositivo médico permite que la composición farmacéutica ejerza su efecto de forma estable en el sitio de colocación del soporte para el tratamiento del vaso. Por tanto, el dispositivo médico tiene la composición farmacéutica proporcionada sobre la superficie del soporte para el tratamiento del vaso, que es capaz de producir restenosis vascular y por eso, el dispositivo médico permite la realización simultánea de la reconstrucción vascular y la prevención de la restenosis. En especial, la composición farmacéutica puede usarse preferiblemente para prevenir y tratar las enfermedades oclusivas vasculares, como en las arterias coronarias del corazón, los vasos sanguíneos cerebrales, los vasos sanguíneos renales y los vasos sanguíneos periféricos, que se produzcan, por ejemplo, debido a restenosis tras una cirugía vascular reparadora o arteriosclerosis.

En este documento se describe un procedimiento para prevenir o tratar una vasculopatía obstructiva usando la composición farmacéutica o el dispositivo médico descritos anteriormente.

[Ejemplo 1]

En el ejemplo presente, se prepararon cinco tipos de ARNip en base a la secuencia genética de la MK de conejo (denominada a partir de ahora rMK; N.º de acceso a GenBank AY553907) y se analizaron *in vitro* los efectos de su silenciamiento.

<Preparación de ARNip>

En la fig. 1 se muestran los sitios designados en el ARNm de la rMK para los cinco tipos de ARNip (#1 a #5) que se prepararon. La secuencia de la fig. 1 está en una forma que incluye la CDS (ADN). Las secuencias sentido de los ARNip sintetizados se muestran en las respectivas SEC ID NOs: 1 a 5 y en la fig. 2 se muestran las estructuras de cada uno de los ARNip sintetizados.

(Evaluación del ARNip)

El día antes de la transfección del ARNip, las células RK13 que expresan MK derivadas de células de riñón de conejo se sembraron en placas de 3 cm y se preincubaron hasta justo por debajo del 50% de confluencia. Se mezclaron por anticipado cada una de las mezclas de soluciones que contenían individualmente 5 µl de soluciones de 20 µM de los cinco ARNip preparados y 95 µl de optiMEM, y esta se combinó con una mezcla de solución que contenía 3 ml de LipofectAMINE2000 y 95 ml de optiMEM que se había incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla de la solución resultante se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se añadió a una placa de cultivo celular RK13 en la que se cambió el medio con antelación por 800 ml de FCS al 10%/DMEM. Después de 48 horas, el medio se cambió por DMEM que contenía heparina (sin suero) y se recogió el sobrenadante del cultivo después de 24 horas. El sobrenadante del cultivo recogido se sometió a electroforesis en gel con SDS (PAGE-SDS) (gel al 15%) y, a continuación, se realizó una inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-MK según el procedimiento de Muramatsu y col. (Bukawa, H., y col. Dev. Biol. 159:392-402, 1993). En la fig. 3 se muestran los resultados de la inmunotransferencia y en la fig. 4 se muestra un gráfico originado mediante la digitalización de la concentración de las bandas detectadas mediante inmunotransferencia usando análisis densitométrico. El «control» tenía la misma composición que la mezcla de la solución mencionada anteriormente excepto que no contenía ARNip.

Como se muestra en las figs. 3 y 4, el #1 es aproximadamente el 18%, el #2 es aproximadamente el 8% y el #3 y el #4 eran aproximada el 10% respectivamente donde la banda no tratada se define como el 100%. Por tanto, se

seleccionó el ARNip #2, el ARNip con el efecto supresor más alto. Además, la cadena complementaria del ARNip #2 se tomó como secuencia aleatoria (*scramble*) y se sintetizó un ARN de cadena doble complementario a esta secuencia (ARNip aleatoria; en adelante denominado sencillamente ARNip-SCR). Se realizó una modificación química en estos dos tipos de ARN de cadena doble, ARNip #2 y ARNip-SCR, usando siSTABLE™ (Dharmacon, para estudios *in vitro*) para sintetizar, ARNip #2 siSTABLE (en adelante denominado ARNip #2-ST) y ARNip-SCR siSTABLE (en adelante denominado ARNip-SCR-ST aleatoria)

[Ejemplo 2]

En el presente ejemplo se determinó si los ARNip dirigidos hacia MK podían prevenir la oclusión de un injerto venoso.

(Preparación de un modelo de injerto venoso)

Se tomó la vena yugular externa del conejo con anestesia general y se realizó una cirugía de revascularización (bypass) de carótida mediante interposición común. A continuación, se preparó un modelo de flujo sanguíneo lento ligando todos los vasos sanguíneos periféricos (incluso la vena yugular interna) excepto la primera rama de la vena yugular externa. Se ha descrito que tratamientos como estos potencian la hipertrofia de la íntima disminuyendo el lecho vascular periférico y reduciendo el flujo sanguíneo (Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004; 286:240-245).

(Solución de ARNip)

12 ml de soluciones 500 μ M de cada uno de ARNip #2, ARNip-SCR, ARNip #2-ST y ARNip-SCR-ST preparados en el ejemplo 1 y 12 ml de solución salina fisiológica se mezclaron con una cantidad igual de solución de atelocolágeno al 3,5% (KOKEN). La concentración final de colágeno fue del 1,75% y la concentración de ARNip era de 10 μ M. Cada una de estas soluciones se aplicó a la circunferencia total del injerto venoso tras la anastomosis en el modelo de injerto venoso preparado y tras esperar a que se produjera la gelificación, se cerró la incisión. Se usó el ARNip #2-ST marcado con Cy3 para examinar la eficacia de la introducción en las paredes del injerto venoso.

<Evaluación>

Después de que hubieran pasado un número predefinido de días tras la intervención, se recogieron los injertos venosos de cada tipo de modelo de injerto venoso y se examinaron los siguientes elementos.

(Expresión de la proteína rMK)

La expresión de la proteína rMK se evaluó homogeneizando todos los tejidos del injerto extraído del modelo de injerto venoso y, a continuación, se sometieron estos a inmunotransferencia (anticuerpo primario: anticuerpo de cabra anti-MK humana y anticuerpo secundario: anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra). También se comparó la expresión de la proteína rMK con el nivel de expresión de la beta-actina. En la figura 5 se muestra el cambio en la expresión de proteína rMK a lo largo del tiempo usando una inmunotransferencia de un injerto control al que se aplicó una solución de atelocolágeno que no contiene ARNip y que solo contiene solución salina fisiológica; en la fig. 6 se muestran los efectos sobre las células RK13 derivadas de riñón de conejo que expresan rMK (nivel de expresión de rMK después de 24 horas de transfección) y en la fig. 7 se muestra una gráfica obtenida mediante digitalización, usando análisis densitométrico, la relación de concentración de las bandas de proteína rMK y de la proteína beta-actina en una inmunotransferencia de un injerto en el que se usó ARNip #2-ST y un injerto control, 7 días después de la intervención.

(Localización de la proteína rMK)

La localización de la proteína rMK se evaluó mediante tinción inmunohistológica de cortes de tejido incluido en parafina de un injerto extraído de un modelo de injerto venoso usando anticuerpo de pollo anti-MK de ratón como anticuerpo primario y anticuerpo de conejo anti-IgG de pollo marcado con biotina como anticuerpo secundario. Los resultados de las observaciones hechas en un injerto extraído del modelo de injerto control 14 días después de la intervención se muestran en la fig. 8.

(Localización del ARNip)

Los cortes de tejido congelado de un injerto extraído del modelo de injerto ARNip #2-ST introducido marcado con Cy3 se examinaron directamente usando un microscopio láser confocal. En la fig. 9 se muestran las micrografías láser confocal de los cortes de tejido congelado de un injerto extraído de un modelo 7 días después de la intervención.

(Análisis morfológico de las muestras de tejido)

Los cortes de tejido incluido en parafina de cada uno de los injertos extraídos se tiñeron con Elastica van Gieson.

Las muestras de tejido del modelo de injerto ARNip #2-ST-introducido y el modelo de injerto control cuatro semanas después de la intervención se muestran en la fig. 10 y los diagramas comparativos del espesor de la íntima vascular y la proporción del espesor de la íntima vascular con respecto a la media vascular se muestran en las figs. 11 y 12, respectivamente.

A juzgar por el curso temporal de la expresión de la proteína rMK en el modelo de injerto control mostrado en la fig. 5, la expresión de rMK se inicia pocos días después de la intervención y llega a su máximo entre los 7 y 14 días después de la intervención. Según las imágenes observadas mediante la tinción inmunohistológica mostrada en la fig. 8, se observa una fuerte expresión de rMK (color oscuro) en la neoíntima 14 días después de la intervención, lo que apoya los resultados mostrados en la fig. 5.

La inmunotransferencia de la proteína rMK en los diversos modelos de injerto con ARNip introducido mostrada en la fig. 6 revelaba que MK ARNip #2 y ARNip #2-ST suprimen individualmente de forma específica la expresión de la proteína rMK y al mismo nivel. Asimismo, según la gráfica de la fig. 7, al comparar las densidades de las bandas de la proteína rMK frente a la beta-actina en el modelo control y en el modelo ARNip #2-ST introducido siete días después de intervención, la expresión de rMK en el injerto de ARNip #2-ST introducido se suprimió a aproximadamente un cuarto con respecto a la del injerto control. Más específicamente, se encontró que la expresión de rMK se suprimía de forma eficaz 7 días después de la intervención, cuando se producía normalmente la mayor expresión de rMK.

Adicionalmente, según las micrografías láser confocal de los injertos en los que se había usado ARNip #2-ST marcado con Cy3, que se muestran en la fig. 9, se observó marcaje de Cy3 en todas las capas intramurales del injerto siete días después de la intervención y esto revelaba que el ARNip se había introducido en las células de todas la capas intramurales del injerto.

Según las muestras de tejido del injerto a que se ha aplicado ARNip #2 y el injerto control cuatro semanas después de la intervención, como se muestra en la fig. 10, se encontró que la hipertrofia de la íntima vascular se suprimía significativamente en el injerto al que se había aplicado ARNip #2-ST. Como se muestra en las figs. 11 y 12, en base a estas muestras de tejido, en el injerto al cual se aplicó ARN #2-ST, la proporción entre el espesor de la íntima vascular/espesor medial vascular era de aproximadamente el 6% del injerto control y se encontró que la íntima en sí se había suprimido al 10% aproximadamente del injerto control.

Lo anterior revelaba que administrando ARNip frente a MK con una molécula de colágeno, el ARNip es retenido en el sitio de administración, alcanza la íntima vascular o sitios adyacentes y suprime la expresión de la proteína MK. También se ha encontrado que este tratamiento puede suprimir de forma eficaz el espesor de la íntima vascular.

[Aplicabilidad industrial]

La presente invención está disponible para el tratamiento o prevención de una vasculopatía obstructiva.

[Texto libre del listado de secuencias]

SEC ID NOs. 1 a 5: secuencias diana de ARNip frente a midkina de conejo

SEC ID NOs. 6 a 10: cadenas sentido de los ARNip anti-rMK

SEC ID NOs. 11 a 14: secuencias diana de ARNip frente a midkina humana

SEC ID NOs. 15 a 19: Cadenas complementarias de los ARNip anti-rMK

SEC ID NOs. 20 a 27: secuencias de los ARNip anti-MK humana

SEC ID NOs. 28: Secuencia del ADN de la midkina de conejo

SEC ID NOs. 29: Secuencia de la proteína midkina de conejo

SEC ID NOs. 30 a 32: Secuencias diana en la CDS del gen MK diana

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> National University Corporation Nagoya University Cell Signals Inc.

<120> Composición farmacéutica para vasculopatías oclusivas

<130> FNZZA023 WO

<150> JP2005-152346

<151> 25/05/2005

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana de ARNip de la midkina de conejo
 <400> 1

10 ccaaaaagaa agacaaggt 19

15 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana de ARNip de la midkina de conejo
 <400> 2

20 ctgaagaagg ctcgtaca 19

25 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana de ARNip de la midkina de conejo
 <400> 3

30 agaccaaagc caaggcaa 19

35 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana de ARNip de la midkina de conejo
 <400> 4

40 ccaagaaagg gaaggcaaa 19

45 <210> 5
 <211> 1.9
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia diana de ARNip de la midkina de conejo
 <400> 5

50 aaggaaggc aaaggacta 19

55 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ARNip sentido
 <400> 6

60 ccaaaaagaa agacaaggut t 21

<210> 7

- <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> ARNip sentido
 <400> 7
- cugaagaagg cucgguacatt t 21
- 10 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> ARNip sentido
 <400> 8
- agaccaaagc caaggccaat t 21
- 20 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> ARNip sentido
 <400> 9
- ccaagaaagg gaaggcaaatt 21
- 30 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> ARNip sentido
 <400> 10
- aagggaaggc aaaggacuat t 21
- 40 <210> 11
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> secuencia diana de ARNip de la midkina humana
 <400> 11
- gaaggaguuu ggagccgac 19
- 50 <210> 12
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> secuencia diana de ARNip de la midkina humana
 <400> 12
- gaaggcgcgc uacaaugcu 19
- 60 <210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>

<223> secuencia diana de ARNip de la midkina humana
<400> 13

gcaaaggcca aagccaaga 19

5

<210> 14
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

10

<220>
<223> secuencia diana de ARNip de la midkina humana
<400> 14

guuuggagcc gacugcaag 19

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de la vasculopatía obstructiva resultado de la restenosis tras la cirugía vascular reparadora que comprende: una construcción de ácido nucleico que inhibe la expresión del gen midkina mediante interferencia de ARN en el que dicha construcción de ácido nucleico comprende un ARNip que tiene como diana al menos una porción del ARNm que codifica la proteína midkina, y una molécula de colágeno, en la que el sitio de administración es la capa externa del vaso sanguíneo del sitio de la vasculopatía obstructiva.
- 5
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha molécula de colágeno comprende una molécula de atelocolágeno.
- 10
3. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicha molécula de colágeno contiene una molécula de colágeno fibroso.
- 15
4. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho uso en el tratamiento o prevención de la vasculopatía obstructiva comprende la inhibición de la hipertrofia de la íntima.
- 20
5. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición se administra mediante la formación de gel de dicha composición en la capa externa de la pared del vaso sanguíneo de la vasculopatía obstructiva.
- 25
6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición se usa para la prevención o tratamiento de la restenosis tras la ACTP u oclusiones de vasos incluyendo la arteria coronaria, vascular cerebral, renovascular y de vasos periféricos.
- 30
7. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dichas construcciones de ácido nucleico se dirigen a una cualquiera de las secuencias mostradas en las SEC ID NOs 11 a 14.
- 35
8. Un dispositivo médico para el tratamiento o prevención de la vasculopatía obstructivas, que comprende: un soporte para el tratamiento del vaso, la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, portada por al menos una parte de la superficie del soporte para permitir la formación de gel en el sitio de la vasculopatía obstructiva, donde dicha composición farmacéutica se proporciona en un sitio colindante a la capa externa de la pared del vaso sanguíneo.
9. El dispositivo médico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho dispositivo médico es un vaso sanguíneo artificial o una prótesis vascular.

GGG CCC GGC GCG GGA GGG AGC GAA GCA TCG CCG GCA GCG AGC GAG

1 ATG CAG CAC CGA GGC GTC CTC CTC CTC ACC CTT CTC GCC CTG CTG GCG CTC ACC TCC GCG
 MET Gln His Arg Gly Val Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ser Ala

61 #1
 GTG GCC AAA AAG AAA GAC AAG GTG AAG GGC GGC CCG GGC AGC GAG TGC GCC GAG TGG ACC
 Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Gly Gly Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Thr

121 TGG GGC CCC TGC ACC CCC AGC AGC AAG GAC TGC GGC GTG GGT TTC CCG GAG GGC ACC TGT
 Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys

181 GGC GCC CAG ACA CAG CGC ATC CGG TGC AGG CTG CCC TGC AAC TGG AAG AAG GAG TTT GGA
 Gly Ala Gln Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Leu Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe Gly

241 GCG GAC TGC AAG TAC AAG TTT GAT AGC TGG GGC GCG TGT GAT GGG GGC ACG GGC ACC AAA
 Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Asp Ser Trp Gly Ala Cys Asp Gly Gly Thr Gly Thr Lys

301 #2
 GCC CGC CAA GGC ACC CTG AAG AAG GCT CGG TAC AAT GCC CAG TGC CAG GAG ACC ATC CGC
 Ala Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Try Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg

361 #3 #4 #5
 GTG ACC AAG CCC TGC ACC CCC AAG ACC AAA GCC AAG GCC AAA GCC AAG AAA GGG AAG GCA
 Val Thr Lys Pro Cys Thr Pro Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Ala

421 AAG GAC TAG AGG CCA GAC TGG GAA GCC CAG GAG CCC CGG CCT CAC CTG GGG CCC CGC CAT
 Lys Asp

GGG GCG CCT CCC ACG GGC TGA AGA TAG AAC CCA CCA GTG CCT TTG TCT ATG CTT AGC TTT
 ATC AAT CAC GCC CTG CCT CTT CCC TGT CCT NCC CCC ACA CAC TCC CAA GTG CCC AAA GTG
 GGG AGG GAC AGG GAT TCT GGG AGC TCC CCC GCA AGG GAT TTG ACT CCC ACC ACC CCC TGT
 TGT CCC CCT CTG TAT GAA ATG TTA CTA AGA AAA CAA ATA AAC CAA CTT TTG CCA GTA AAA
 AAA AAA A

Fig.1

- #1** 5'- aaaaagaaagacaaggu dtdt -3'
 3'- dtdt uuuuucuucugucca -5'
- #2** 5'- cugaagaaggcucgguaca dtdt -3'
 3'-dtdt gacuucuuccgagccaugu -5'
- #3** 5'- agaccaaagccaaggccaa dtdt -3'
 3'- dtdt ucugguuucgguuccgguu -5'
- #4** 5'- ccaagaaagggaaggcaaa dtdt -3'
 3'-dtdt gguucuuucccuuccguuu -5'
- #5** 5'- aaggaaggcaaaggacua dtdt -3'
 3'- dtdt uucccuuccguuuccugau -5'

Fig.2

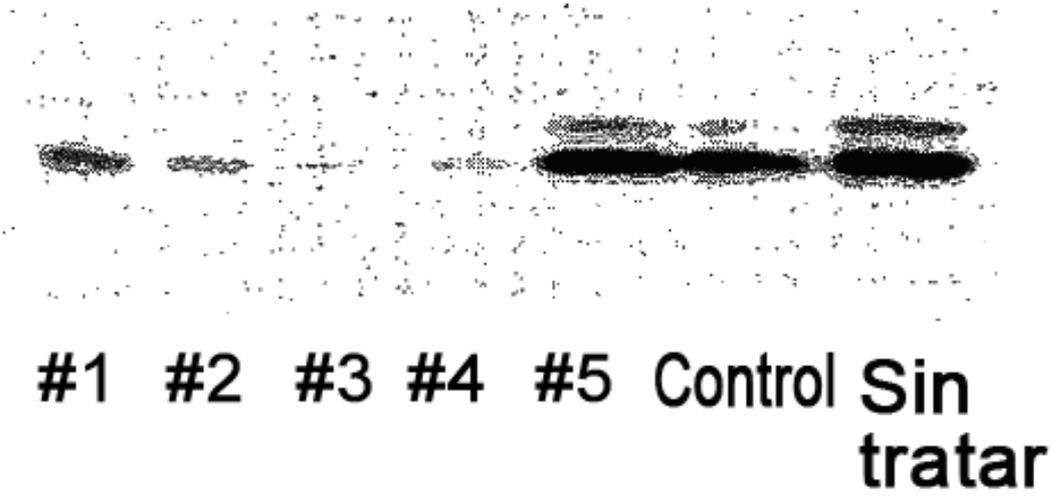


Fig.3

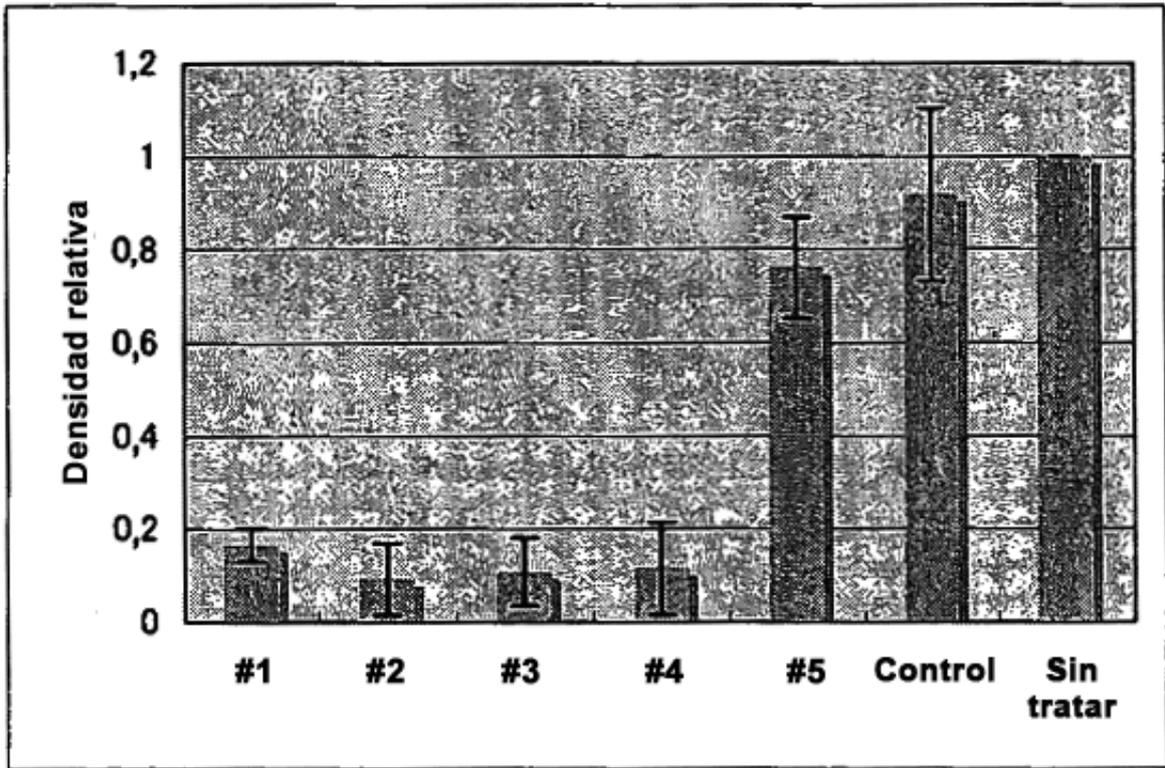


Fig.4

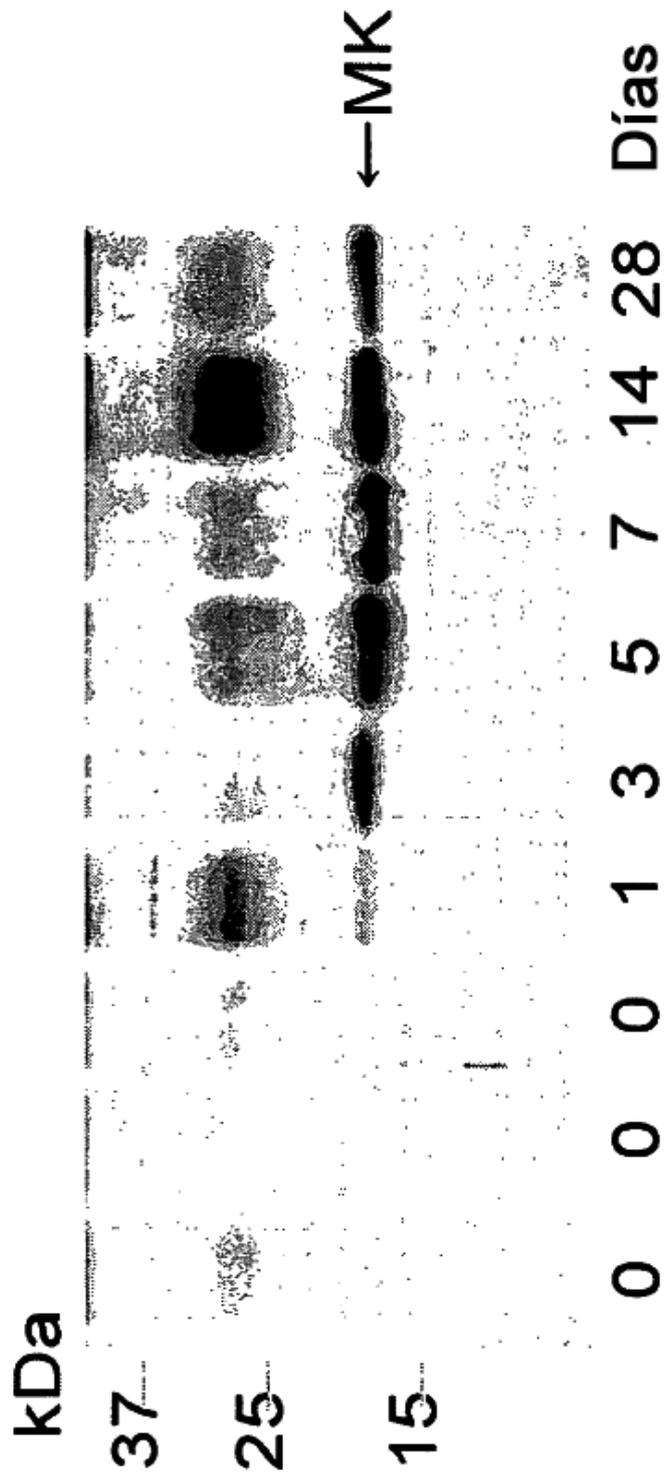


Fig.5

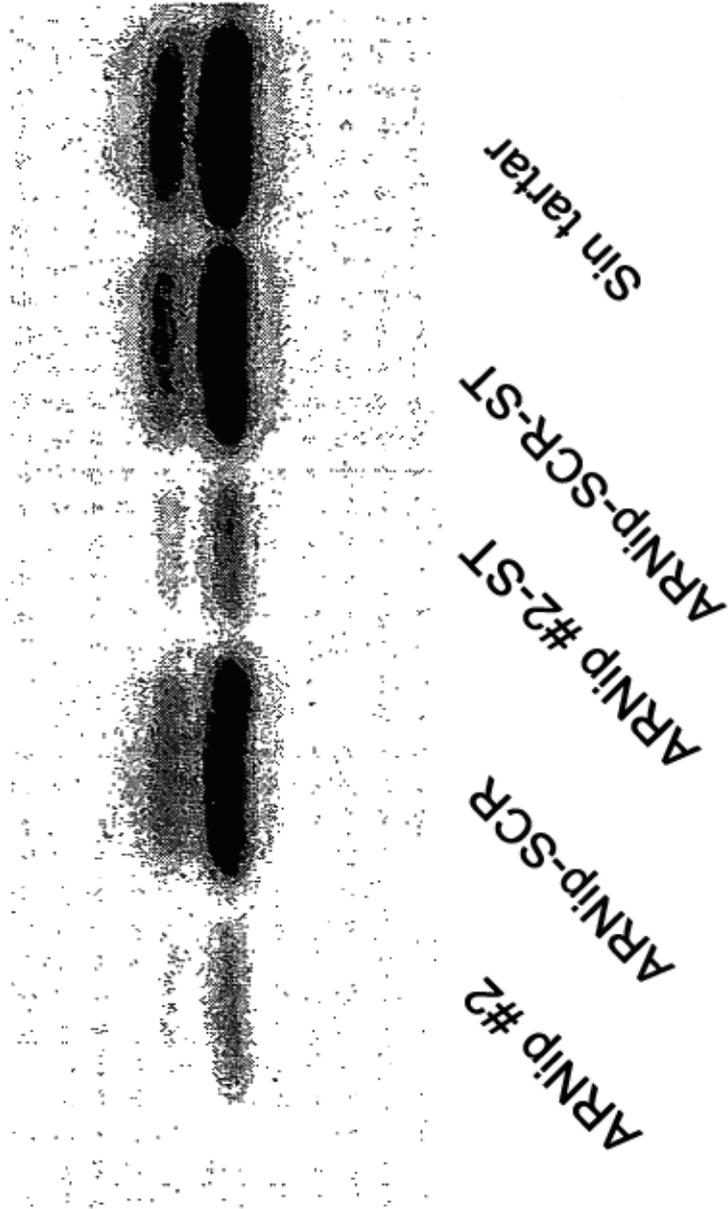


Fig.6

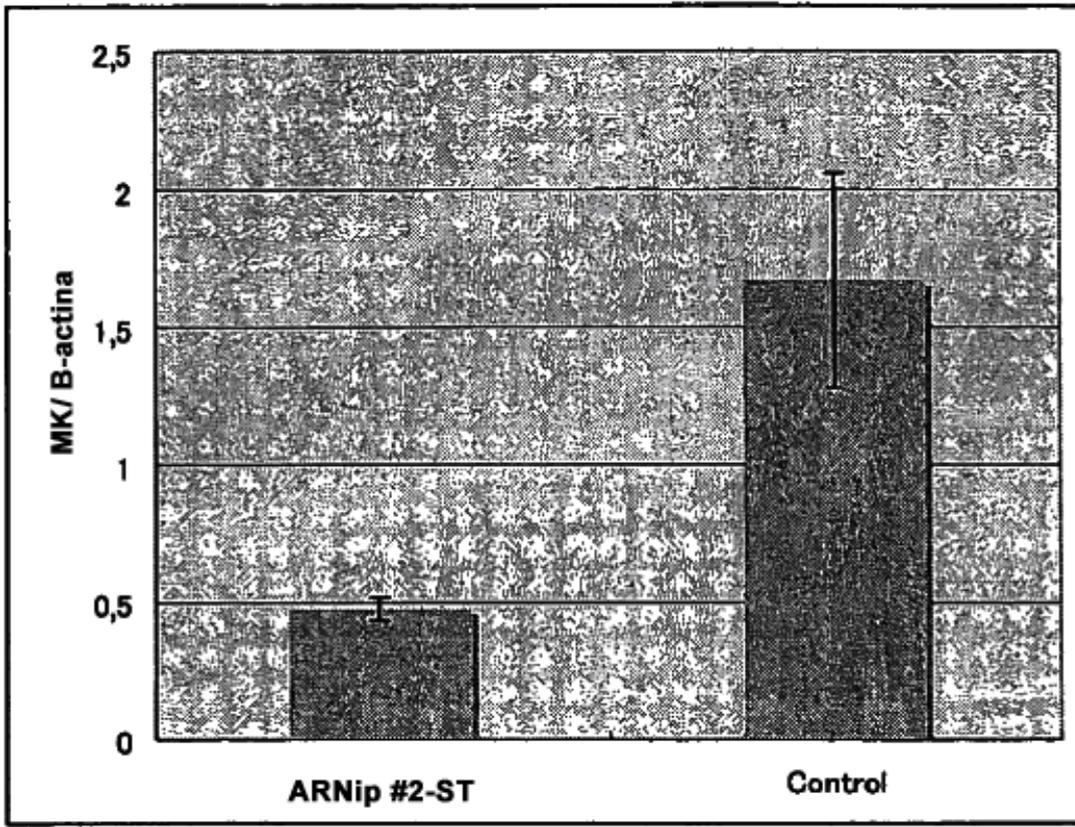


Fig.7

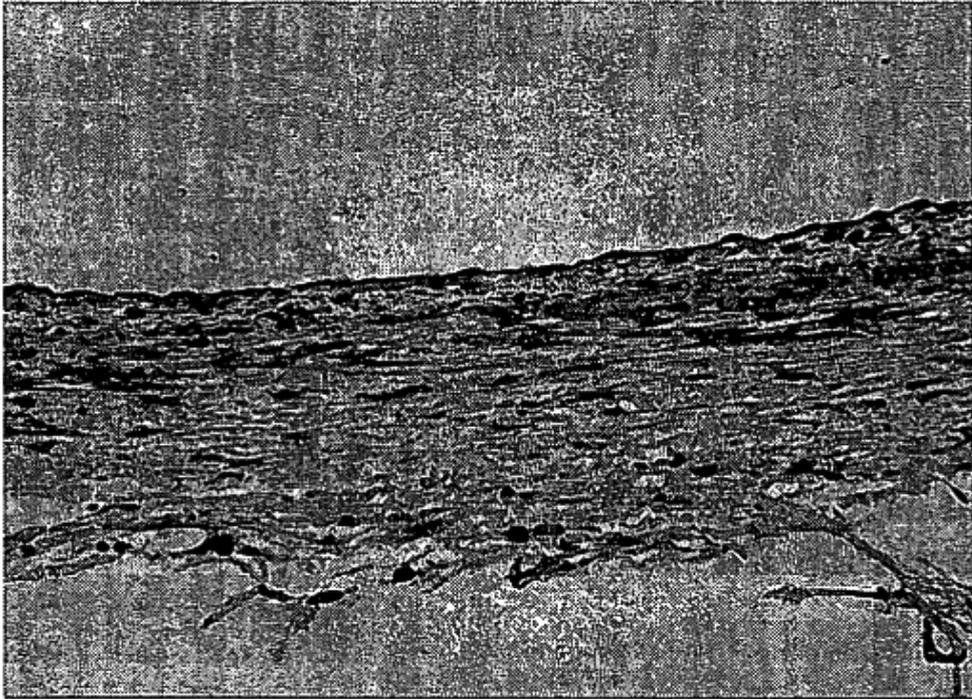


Fig.8

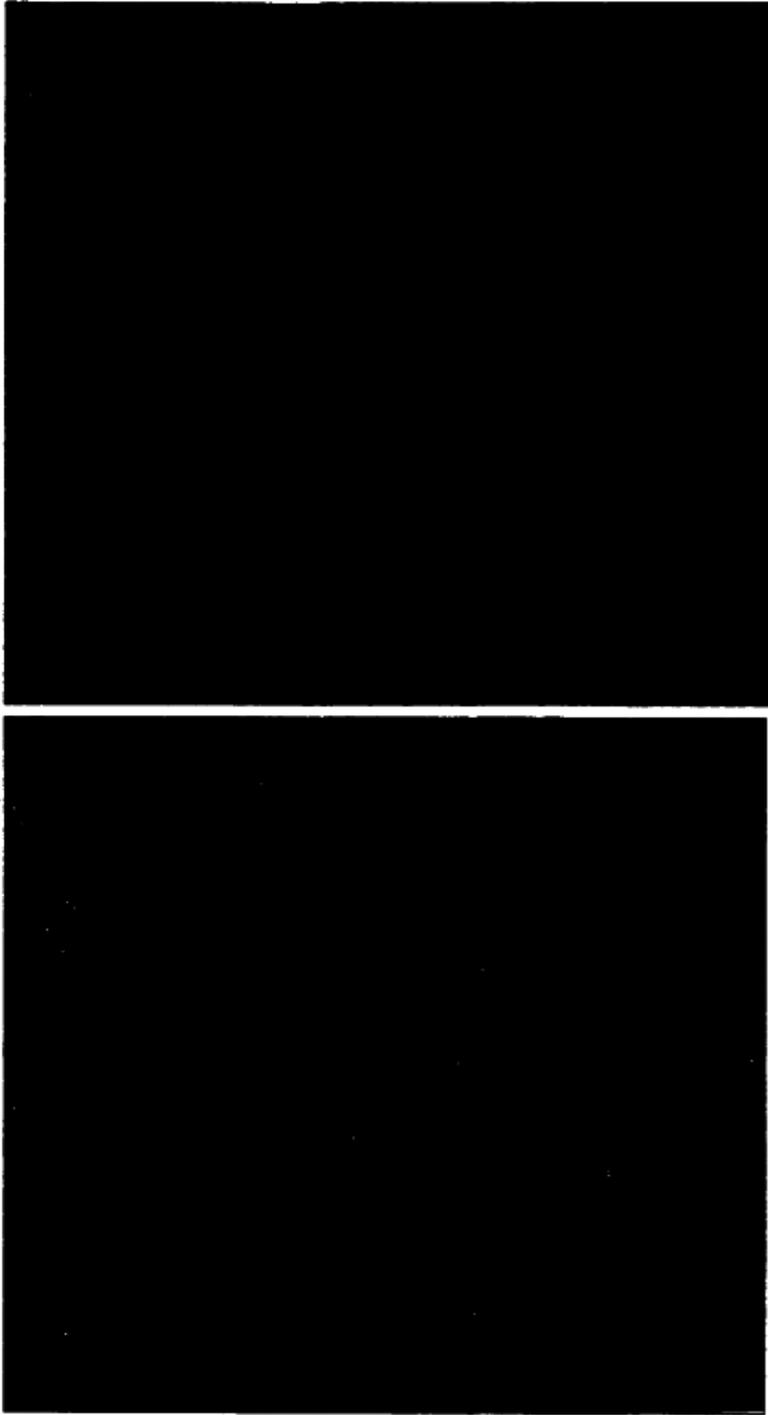
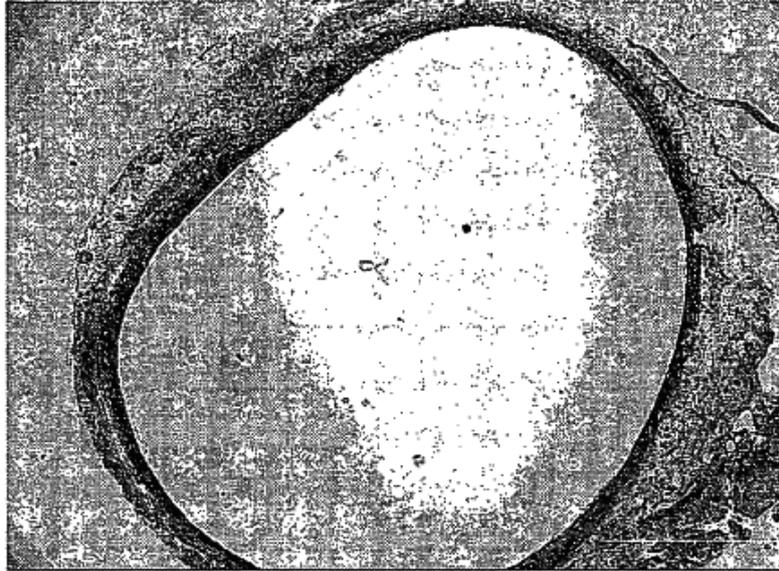


Fig.9

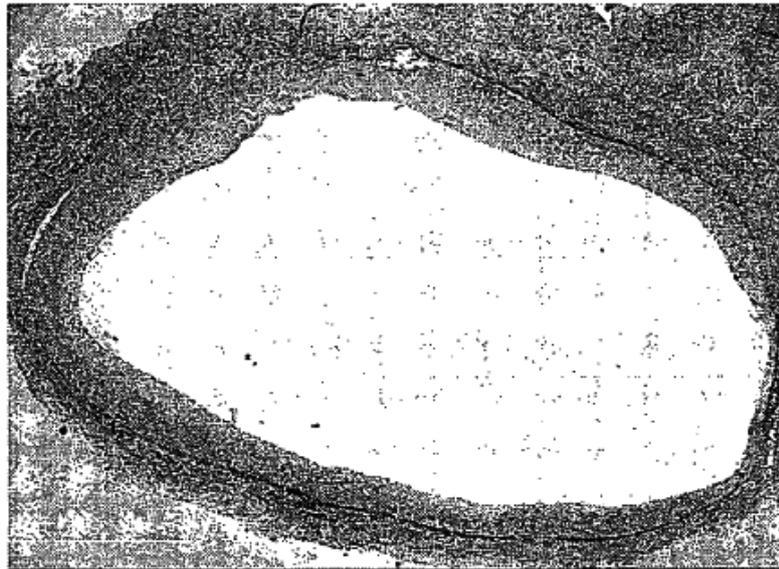
(a)

Injerto aplicado con ARNip #2-ST



(b)

Injerto control



Barra de escala: 1 mm

Fig.10

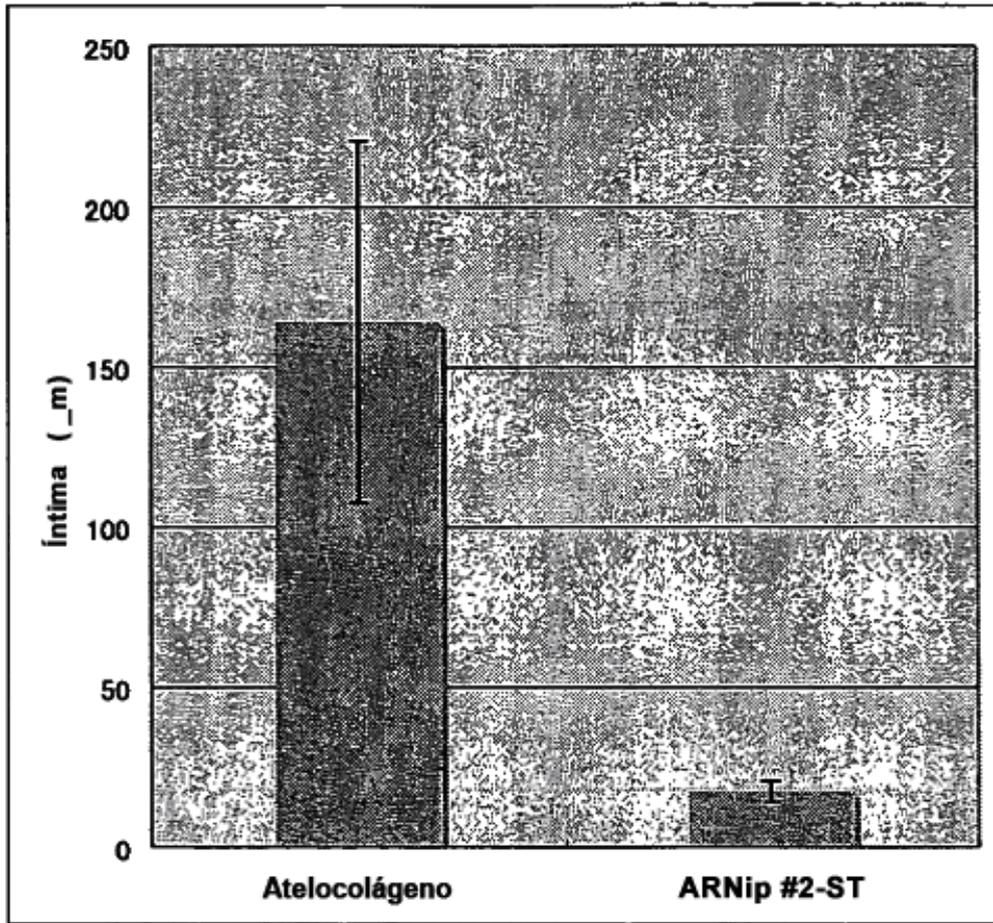


Fig.11

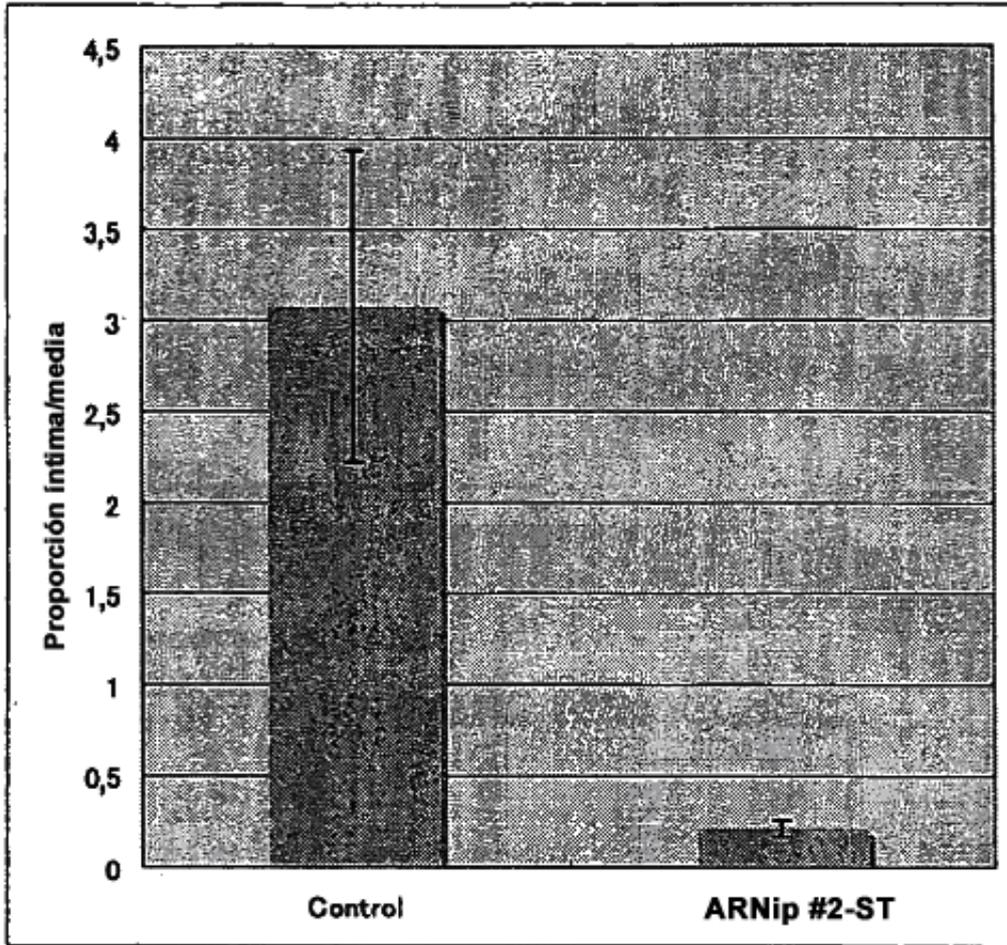


Fig.12

ARNip de MKhumana #1 5'- gaagaaguuuggagccgacdttdt -3'
3'- dttdt cuucucaaaccucggcug -5'

ARNip de MKhumana #2 5'- gaaggcgcgcuacaaugcu dttdt -3'
3'- dttdt cuuccgcgcauguuacga -5'

ARNip de MKhumana #3 5'- gcaaaggccaaagccaaga dttdt -3'
3'- dttdt cguuuccgguuucgguucu-5'

ARNip de MKhumana #4 5'- guuuggagccgacugcaag dttdt-3'
3'- dttdt aaccggcguaccguauucc -5'

Fig.13